



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



mr Ljubica M. Grbović

Izolovanje, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost naftnih kiselina iz Vojvođanske nafte

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2009.

Ova doktorska disertacija je urađena na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu pod mentorstvom dr Vere Ćirin-Novte, redovnog profesora PMF-a u Novom Sadu koja je prodložila temu i rukovodila radom. Rad je urađen u okviru istraživanja na projektu "Sinteza odabranih biološki aktivnih molekula i analoga od potencijalnog interesa za biomedicinu i agronomiju" (br. projekta 142005) finansiranog od strane Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, kojem dugujem zahvalnost.

Zahvalnost dugujem i svima koji su mi pomogli u radu na bilo koji način:

dr **Veri Ćirin-Novti**, ne samo kao mentoru na predloženoj temi, nego i na dragocenim sugestijama, naučnom iskustvu i svemu što je sa njene strane doprinelo da uradim i finalizujem ovaj rad.

dr **Slavku Kevrešanu**, na ukazanom interesovanju za ovaj rad, ljubaznosti i pomoći tokom izrade i pisanja rada.

dr **Kseniji Kuhajdi** i dr **Katarini Penov-Gaši**, za interesovanje i ukazanu pomoć u toku izrade ovog rada.

dr **Mirjani Popsavin**, kako na stručnoj pomoći pri snimanju i tumačenju NMR spektara, tako i na svakodnevnim prijatnim kontaktima.

dr **Mariji Sakač**, na krajnje nesebičnim stručnim savetima i moralnoj podršci.

mr **Milošu Svirčevu**, na bezgraničnom strpljenju i volji da mi pomogne kada god sam mu se obratila za pomoć.

mr **Kseniji Pavlović**, za svu pomoć koju mi je pružala, za sve tople reči u momentima koji su mi izgledali beznađežno.

mr **Andrei Gačković**, mr **Jovani Ajduković**, mr **Marini Savić** i dipl. hemičaru-master **Bojani Prekođravic** na razumevanju i kolegijalnosti.

dr **Jeleni Milić**, saradniku na Max-Planck Institutu za molekularnu fiziologiju u Dortmundu za snimanje masenih spektara.

mr **Branislavu Joviću**, na snimanju IR spektara.

Osoblju Odeljenja za mikroanalizu Hemijskog fakulteta u Beogradu.

Takođe, **Zoran Vidak**, **Tatjana Pejović**, **Ottó Arcson**, **Eszter Forró**, **Jelena Marković**, **Silvia Šeljem** su mi pomogli ne samo u načno-istraživačkom radu nego i na laboratorijskim vežbama sa studentima, stoga im hvala.

Posebno želim i moram da se zahvalim mojim dečacima, **Nikoli** i **Darku**, koji su sa mnom delili sve moje uspehe ali i padove. **Volim vas najviše na svetu!!!**

Hvala mojim dragim roditeljima, Sandri i njenoj porodici na podršci i razumevanju.

Konačno, hvala i svim mojim prijateljima na razumevanju, strpljenju i na zajedničkim trenucima koji su mi beskrajno pomogli za vreme rada na ovoj disertaciji.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. HEMIJSKI SASTAV NAFTE	3
2.2. NAFTNE KISELINE	4
2.2.1. ALIFATIČNE KARBOKSILNE KISELINE	4
2.2.2. CIKLOALKANSKE KARBOKSILNE KISELINE.....	7
2.2.3. AROMATIČNE, HETEROCIKLIČNE I DRUGE KARBOKSILNE KISELINE.....	9
2.3. IZOLOVANJE NAFTNIH KISELINA	11
2.4. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE NAFTNIH KISELINA	12
2.5. MIKROTALASNO KATALIZOVANE SINTEZE	15
2.5.1. EFEKTI MIKROTALASA	16
2.5.1.1. POREKLO MIKROTALASNIH EFEKATA	16
2.5.1.1.1. TERMIČKI EFEKTI	17
2.5.1.1.2. SPECIFIČNI MIKROTALASNI EFEKTI	19
2.5.1.2. EFEKTI MEDIJUMA U MIKROTALASNOJ SINTEZI.....	20
2.5.1.3. EFEKTI NA REAKCIONE MEHANIZME	21
2.5.1.4. EFEKTI NA PRELAZNA STANJA U REAKCIJAMA.....	22
2.5.1.5. EFEKTI NA SELEKTIVNOST	23
2.5.2. PRIMENA MIKROTALASA U SINTEZAMA	23
2.5.2.1. MEHANIZMI MIKROTALASNOG ZAGREVANJA	23
2.5.2.2. UTICAJ MIKROTALASNOG ZAGREVANJA NA RASTVARAČE Faktor gubitka	26
2.5.2.3. UBRZAVANJE HEMIJSKIH REAKCIJA MIKROTALASNIM OZRAČIVANJEM	29
2.5.2.4. TEHNIKE MIKROTALASNO KATALIZOVANIH SINTEZA	30
2.5.3. MIKROTALASNO KATALIZOVANE SINTEZE ESTARA	31
2.5.3.1. MIKROTALASNE SINTEZE ESTARA U HOMOGENOM MEDIJUMU.....	31
2.5.3.2. MIKROTALASNE SINTEZE ESTARA U PRISUSTVU FAZA-TRANSFER KATALIZATORA.....	32
2.5.3.3. MIKROTALASNE SINTEZE I HETEROGENA KATALIZA.....	34
2.5.3.4. MIKROTALASNE SINTEZE ESTARA ENZIMATSKI KATALIZOVANE.....	38
2.5.4. MIKROTALASNE SINTEZE AMIDA	38
2.6. BIOLOŠKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA..	43
3. NAŠI RADOVI	49
3.1. GRUPNO-STRUKTURNA ANALIZA NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA	49

3.2. SINTEZE DERIVATA NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA	59
3.2.1. SINTEZE ESTARA NAFTNIH KISELINA	59
3.2.2. SINTEZE AMIDA NAFTNIH KISELINA	65
3.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA I NJIHOVIH DERIVATA	69
3.3.1. HORMONSKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA AUKSINSKOG TIPA	69
3.3.1.1. HORMONSKA AKTIVNOST UTVRĐENA „ <i>Koleoptil testom</i> ”	69
3.3.1.2. HORMONSKA AKTIVNOST UTVRĐENA „ <i>Testom inhibicije klijanja</i> ”	71
3.3.1.3. HORMONSKA AKTIVNOST UTVRĐENA „ <i>Testom prirasta mase hipokotila</i> ”	74
3.3.2. HORMONSKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA GIBERELINSKOG TIPA UTVRĐENA „ <i>Endosperm testom</i> ”	75
3.3.3. OŽILJAVANJE BILJAKA	76
3.3.3.1. OŽILJAVANJE REZNICA SUNCOKRETA	77
3.3.3.2. UKORENJIVANJE BOČNIH GRANA SUNCOKRETA	78
3.3.3.3. OŽILJAVANJE REZNICA TOPOLE	78
3.3.3.4. UKORENJIVANJE MIKROIZDANAKA HRIZANTEMA	80
3.3.3.5. UTICAJ NAFTENSKIH KISELINA NA AKTIVNOST BILJNIH ENZIMA	82
3.3.4. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA USVAJANJE JONA KOD BILJAKA	86
3.3.4.1. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA SADRŽAJ JONA TEŠKIH METALA KOD SOJE-DETOKSIKACIJA	86
3.3.4.2. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA SADRŽAJ METALNIH JONA KOD SOJE	91
3.3.4.3. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA SADRŽAJ METALNIH JONA KOD CELERA I MRKVE	92
4. EKSPERIMENTALNI DEO	97
4.1. IZOLOVANJE SIROVIH NAFTENSKIH KISELINA	99
4.1.1. IZOLOVANJE NAFTENSKIH KISELINA ADSORPCIJOM NA ALUMINIJUMOKSIDU	99
4.1.2. IZOLOVANJE NAFTENSKIH KISELINA ALKALNOM EKSTRAKCIJOM SA AMONIJAKOM	99
4.1.3. PREČIŠĆAVANJE SIROVIH NAFTENSKIH KISELINA	99
4.2. RAZDVAJANJE NAFTENSKIH KISELINA EKSTRAKCIJOM NA BAZI RAZLIČITE KISELOSTI	102
4.3. DERIVATIZACIJA NAFTENSKIH KISELINA	106
4.3.1. SINTEZE ESTARA NAFTENSKIH KISELINA	106
4.3.1.1. SINTEZE METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA	106
4.3.1.1.1. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA DIAZOMETANOM	106
4.3.1.1.2. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM	107
4.3.1.1.3. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA	108
4.3.1.1.4. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA <i>p</i> - TOLUENSULFONSKOM KISELINOM UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA	108
4.3.1.2. SINTEZE ETIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA	108
4.3.1.2.1. SINTEZA ETIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM	108
4.3.1.2.2. SINTEZA ETIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA	109
4.3.1.3. SINTEZE <i>n</i> -BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA	110

4.3.1.3.1. SINTEZA <i>n</i> -BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM.....	110
4.3.1.3.2. SINTEZA <i>n</i> -BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA	110
4.3.1.4. SINTEZE <i>terc</i>-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA.....	110
4.3.1.4.1. SINTEZA <i>terc</i> -BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA IZ HLORIDA KISELINA.....	110
4.3.1.4.2. SINTEZA <i>terc</i> -BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA	111
4.3.1.5. SINTEZE BENZIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA	111
4.3.1.5.1. SINTEZA BENZIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA IZ HLORIDA KISELINA.....	111
4.3.1.5.2. SINTEZA BENZIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA	112
4.3.2. SINTEZE AMIDA NAFTENSKIH KISELINA.....	112
4.3.2.1. SINTEZA AMIDA NAFTENSKIH KISELINA SA AMONIJKOM	112
4.3.2.2. SINTEZA ANILIDA NAFTENSKIH KISELINA	113
4.4. BIOLOŠKI TESTOVI NA AUKSINE	115
4.4.1. „ <i>Koleoptil test</i> ”	115
4.4.2. „ <i>Test inhibicije klijanja</i> ”	116
4.4.3. „ <i>Test prirasta mase hipokotila</i> ”	117
5. ZAKLJUČAK	119
6. SUMMARY.....	125
7. PRILOG	132
8. LITERATURA	157
9. SKRAĆENICE	161

1. UVOD

Naftu kao prirodni materijal sačinjava smeša ugljovodonika čvrstog, tečnog i gasovitog agregatnog stanja. U hemijskom pogledu njen sastav čine C (83-88%), H (11-15%), S (0.1-5.5%), N (0.1-2.5%), O (0.1-3.5%) i mineralne soli (0.1-1.25%). U naftnim frakcijama identifikovana su strukturno slična jedinjenja. To su ugljovodonici u najvećem procentu, zatim heterociklična jedinjenja, aldehidi i ketoni i slobodne karboksilne kiseline kojima smo se bavili u okviru ovog rada. Karboksilne kiseline koje su prisutne u nafti pretežno su alkanske i cikloalkanske strukture i nazivaju se naftnim kiselinama. Pošto su u ispitivanoj nafti „*Velebit*” najzastupljenije kiseline cikloalkilkarboksilnih struktura njihov uobičajeni naziv je „naftenske kiseline”, a naftni ugljovodonici se nazivaju „nafteni”. Određivanje struktura karboksilnih kiselina u kompleksnim smešama naftnih kiselina daje važne podatke o genezi i prirodi ispitivane nafte.

Naftne kiseline različitog stepena čistće i različite srednje molekulske mase imaju danas veoma široku primenu. One predstavljaju značajnu industrijsku sirovinu, a potrebe za njima premašuju njihove prirodne resurse, pa se već dugo ispituju putevi za njihovo sintetičko dobijanje iz naftnih ugljovodonika. Interesantan je podatak da one spadaju u fiziološki najaktivnije konsituente nafti, u malim koncentracijama pokazuju aktivnost analognu nekim biljnim hormonima, ali ukoliko se ne eliminišu iz otpadnih voda naftne industrije, zagađuju životnu sredinu i utiču negativno i na floru i faunu eko sistema.

S ogromnim opravdanjem, poslednjih godina, velika pažnja se posvećuje „zelenoj” tj. „eco-friendly” hemiji. „Zelena” hemija je po definiciji Američke agencije za zaštitu okoline (EPA-e) definisana kao hemija koja podrazumeva hemijske produkte i procese neškodljive za okolinu, te na taj način sprečava nastajanje zagađenja. „Zelena” hemija zasnovana je na 12 načela kojima se upotreba ili proizvodnja supstanci opasnih za ljudsko zdravlje i okolinu redukuje ili eliminiše. Ciljevi „zelene” hemije u zaštiti životne sredine i ekonomskoj dobiti ostvaruju se kroz nekoliko dominantnih pravaca kao što su kataliza, biokataliza, upotreba alternativnih obnovljivih sirovina (biomasa), alternativnih reakcionih medijuma (voda, jonske tečnosti, superkritične tečnosti), alternativnih reakcionih uslova (aktivacija mikrotalasnim i ultrazvučnim zračenjem) kao i novim fotokatalitičkim reakcijama. Istovremeno, radi se i na smanjenju upotrebe rastvarača, kako u samim reakcionim sredinama tako i pri izolovanju i prečišćavanju proizvoda reakcija.

Cilj ovog rada je izolovanje naftnih kiselina naftenskog tipa iz vojvođanske nafte „*Velebit*”, njihova frakcionacija, strukturna analiza, derivatizacija i određivanje njihove biološke aktivnosti. Sinteze nekih kiseoničnih i azotnih derivata naftenskih kiselina rađene su u klasičnim reakcionim uslovima kao i u uslovima mikrotalasne katalize. Dizajniranje sinteza derivata naftenskih kiselina u ovom radu upotrebom mikrotalasne katalize planski se uklapa u ciljeve „zelene hemije”.

OPŠTI DEO obuhvata pregled radova koji se odnose na strukture naftnih kiselina, njihovo izolovanje, fizičko-hemijske osobine i fiziološku aktivnost. Prikazani su i radovi u kojima su predstavljeni principi mikrotalasne katalize kao i sinteze estara i amida uz angažovanje mikrotalasa.

U **NAŠIM RADOVIMA** opisane su metode izolovanja, prečišćavanja i frakcionacije naftnih kiselina, sinteze njihovih estarskih i amidnih derivata (konvencionalne i uz ko-katalitičko dejstvo mikrotalasa), kao i detaljna analiza spektroskopskih podataka dobijenih iz odgovarajućih IR-, NMR- i ESI HPLC-MS spektara. Takođe, detaljno su prikazani testovi kojima je utvrđena fiziološka aktivnost čistih naftnih kiselina kao i njihovih frakcija različitih koncentracija. Fitohormonska aktivnost naftnih kiselina auksinskog tipa utvrđena je na osnovu tri testa („*Koleoptil test*”, „*Test inhibicije klijanja*” i „*Test prirasta mase hipokotila*”) a aktivnost giberelinskog tipa pomoću „*Endosperm testa*”. Testovi koji su dalje opisani a odnose se na ožiljavanje reznica suncokreta i topole, na ukorenjivanje bočnih grana suncokreta i mikroizdanaka hrizantema kao i na aktivnost biljnih enzima takođe potvrđuju fiziološku aktivnost naftnih kiselina. Konačno, predstavljeni su i testovi kojima je utvrđen uticaj naftnih kiselina na usvajanje metalnih jona kod soje, celera i mrkve.

EKSPERIMENTALNI DEO sadrži detaljne postupke izolovanja, prečišćavanja i razdvajanja naftnih kiselina, zatim postupke derivatizacija naftnih kiselina (uz klasično i mikrotalaso zagrevanje), a konačno i postupke pripremanja rastvora za biološke testove, kao i same testove.

2. OPŠTI DEO

2.1. HEMIJSKI SASTAV NAFTE

Sve do 1920. godine o hemijskom sastavu nafte znalo se vrlo malo, a nafta je bila korišćena isključivo u energetske svrhe. Danas se zna da nafta vodi poreklo od organskog, biljnog i životinjskog istaloženog materijala koji se u početku raspadao pod dejstvom bakterija u aerobnim i anaerobnim uslovima pod velikim pritiscima u naftnim bazenima. Nafta je smeša velikog broja različitih ugljovodonika (95% - 98%), a ostatak su uglavnom kiseonična, sumporna i azotna jedinjenja. Osnovne komponente ugljovodonika koji pretežno čine naftu su parafini, nafteni i aromati. Od odnosa ovih komponenata, intervala destilacije kao i sadržaja primesa zavisi kvalitet nafte odnosno njena korisnost za proizvodnju komercijalnih proizvoda. Danas je ona glavni izvor organskih hemikalija¹, a pojedini derivati predstavljaju sirovine za vrlo veliki broj tehnoloških procesa.

Teorije o nastanku nafte mogu se svrstati u dve grupe:

- teorija koja je manje priznata, odnosno danas je skoro sasvim odbačena je teorija o neorganskom poreklu nafte tj. o mineralnom poreklu nafte
- teorija o organskom poreklu nafte tj. o biljnom i životinjskom poreklu nafte

Po prvoj teoriji o neorganskom poreklu, nafta leži duboko u utrobi zemlje. Ugljenik i vodonik su užarene mase koje prodirući u zemljinu koru pod visokim pritiskom i visokim temperaturama i u prisustvu raznih supstanci kao katalizatora sintetizuju ugljovodonike koji su osnovni sastojci svake nafte. Tako nastala nafta iz velikih dubina postepeno migrira kroz pukotine stena i skuplja se u podzemnim ležištima. Nedostaci vezani za ovu teoriju se odnose na primese u prirodnoj nafti, a to su azotne optički aktivne supstance ili specifični parafini vezani za biljni i životinjski svet.

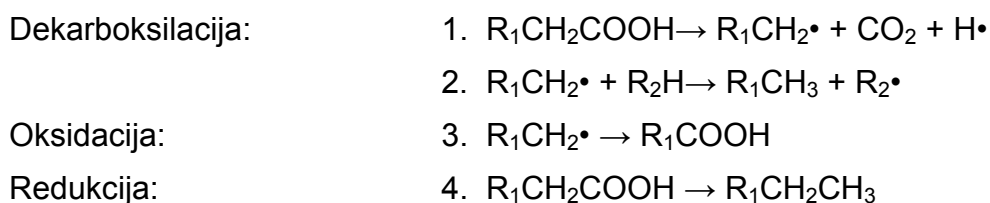
Prema teoriji o organskom poreklu, čiji je utemeljitelj Treibs², nafta je nastala iz masti uginulih organizama nagomilavanih vekovima ispod zemlje. Raspadanjem i nestajanjem mnogih sastojaka ostaju masti i voskovi koji hidrolizuju u prisustvu fermentata gradeći organske kiseline koje pri visokim pritiscima i visokim temperaturama lako gube ugljen-dioksid i prelaze u ugljovodonike.

Ispitivanjem parafinskih nafti različite geološke starosti, utvrđeno je da nafte najmlađih formulacija imaju najveći sadržaj masnih kiselina što je dovelo do zaključka da su masne kiseline prekursori ugljovodonika³. U mlađim sedimentima primarno su prisutne *n*-masne kiseline sa parnim brojem C-atoma kao što je u prirodi. Izučavanjem parafina iz sedimenata različitih geoloških formacija konstatovano je da je u mlađim sedimentima izraženija količina parafina sa neparnim brojem C-atoma, što se takođe uklapa u teoriju o organskom poreklu nafte.

2.2. NAFTNE KISELINE

Dugo se nije znalo za prisustvo karboksilnih kiselina u nafti. Prvo su otkrivene masne kiseline, zatim su identifikovane cikloparafinske kiseline (tzv. naftenske kiseline), a tek znatno kasnije i karboksilne kiseline drugih struktura.

Zrenjem nafte vrši se lagano dekarboksilovanje koje je razlog manjeg sadržaja kiselina u starijim naftama. Postoji mogućnost i stalnog laganog procesa mikrobiološke i hemijske oksidacije tokom zrenja nafte što dovodi do izjednačavanja odnosa ugljovodonika sa parnim i neparnim brojem C-atoma. Mogući procesi u toku zrenja nafte predloženi su od strane Kvenvolden-a i Weiser-a⁴:



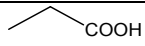
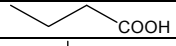
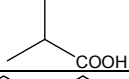
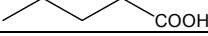
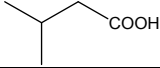
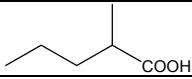
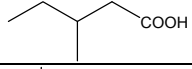
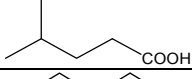

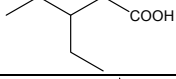
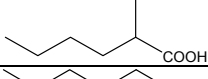
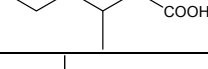
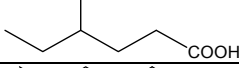
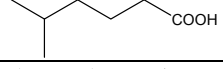
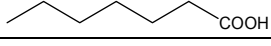
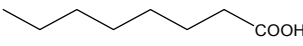
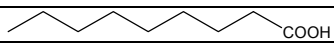


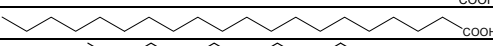
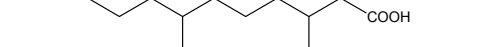
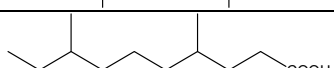
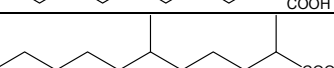
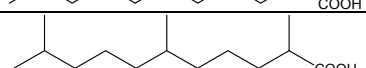
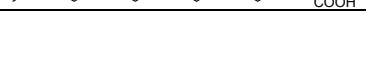
Shema 2.1.

Jednačine 1. i 2. predstavljaju vezu masnih kiselina sa parnim ($2n$) i neparnim ($2n-1$) brojem C-atoma u molekulu ugljovodonika. Jednačina 3. predstavlja dalje transformacije ugljovodonika koje vode smanjenu relativnog odnosa parnih prema neparnim masnim kiselinama, a dati odnos je važan geohemičarima jer im omogućuje određivanje starosti naftnog nalazišta. Jednačina 4. je proces redukcije u toku zrenja nafte jer se smatra da postoje i uslovi za hidrogenovanje.

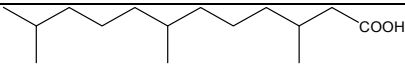
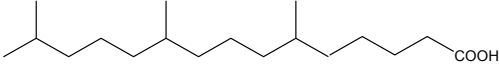
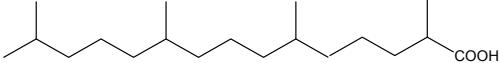
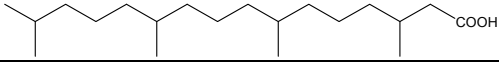
2.2.1. ALIFATIČNE KARBOKSILNE KISELINE

Alifatične karboksilne kiseline su najzastupljenije u parafinskim naftama. Parafinske nafte imaju najmanji ukupni sadržaj karboksilnih kiselina. Upotreba masene spektroskopije omogućila je kvalitativnu i kvantitativnu analizu n -masnih kiselina u nafti. U različitim naftama u odnosu na poreklo i nalazište mogu se naći karboksilne kiseline sa različitim brojem C-atoma (1-36 C). Date kiseline su normalne i račvaste, izoprenoidne i pseudoizoprenoidne, izo- i anteizo- kao i kiseline hibridnih struktura koje sadrže aromatične cikloalkanske ili heterociklične ostatke. Neke od alkilkarbonskih kiselina normalne i račvaste strukture identifikovane u naftama su prikazane u tabeli 2.1..

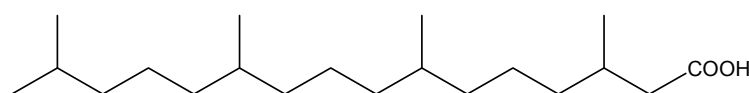
Tabela 2.1. Alkil-karboksilne kiseline račvaste i normalne strukture

Broj C-atoma u molekulu	Naziv kiseline	Formula kiseline	Nalazište
1	2	3	4
1	Mravlja	HCOOH	Kalifornija
2	Sirćetna	—COOH	Kalifornija
3	Propionska		Kalifornija
4	Buterna		Kalifornija
4	Izobuterna		Kalifornija
5	<i>n</i> -Valerijanska		Kalifornija
5	izo-Valerijanska		Kalifornija
6	2-Metilvalerijanska		Kalifornija
6	3-Metilvalerijanska		Kalifornija
6	izo-Kapronska		Kalifornija
6	Kapronska		Kalifornija
7	3-Etilvalerijanska		Rumunija, Azerbejdžan
7	2-Metilkapronska		Kalifornija
7	3-Metilkapronska		Kalifornija, Rumunija
7	4-Metilkapronska		Kalifornija
7	5-Metilkapronska		Kalifornija, Azerbejdžan
7	Enantna		Kalifornija
8	Kaprilna		Kalifornija
9	Pelargonska		Kalifornija
14	Miristinska		Japan
16	Palmitinska		Japan
18	Stearinska		Japan
20	Arahidonska		Japan
12	3,7-Dimetildekanska		Švajcarska
12	4,8-Dimetildekanska		Švajcarska
13	2,6-Dimetilundekanska		Švajcarska
14	2,6,10-Trimetilundekanska		Kalifornija

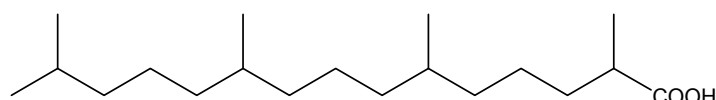
Nastavak tabele 2.1.

1	2	3	4
15	3,7,11-Trimetildodekanska		Kalifornija
18	6,10,14-Trimetilpentadekanska		Kalifornija
19	2,6,10,14-Tetrametilpentadekanska (pristanska)		Kalifornija
20	3,7,11,15-Tetrametilheksadekanska (fitanska)		Kalifornija

Izoprenoidne kiseline su prvi put otkrivene u smeši komercijalnih naftnih kiselina dobijenih procesom rafinacije kalifornijske nafte^{5,6}. Idenifikovane su izoprenoidne strukture kao što su fitanska i pristanska kiselina, koje su prisutne i u lipidima sisara.



Fitanska kiselina



Pristanska kiselina

Shema 2.2.

Za izoprenoidne karboksilne kiseline koje se u nafti nalaze u malom procentu se smatra da su nastale naknadnom mikrobiološkom transformacijom viših izoprenoidnih kiselina. Najbitnije kiseline ove grupe su 6,10,14-trimetilpentandekanska i 3,7-dimetildekanska kiselina.

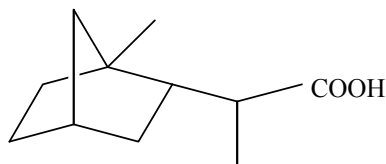
Dikarboksilne i polikarboksilne kiseline se retko javljaju u nafti. Put njihovog formiranja je mikrobiološka oksidacija, ali se one zbog nestabilnosti dalje transformišu⁷.

Nezasićenih masnih kiselina koje su identifikovane u naftama ima u veoma malom procentu, nasuprot njihovoj velikoj zastupljenosti u biljnom svetu. Smatra se da se anaerobnim bakterijskim procesima transformišu u zasićene masne kiseline u najranijim fazama sedimentacije⁸.

Hlorofil može biti biološki prekursor hibridnih struktura kiselina koje sadrže heterociklične ostatke, koje su nađene u mladim sedimentima, a fitolni bočni niz molekula može biti glavni izvor izoprenoidnih kiselina⁹.

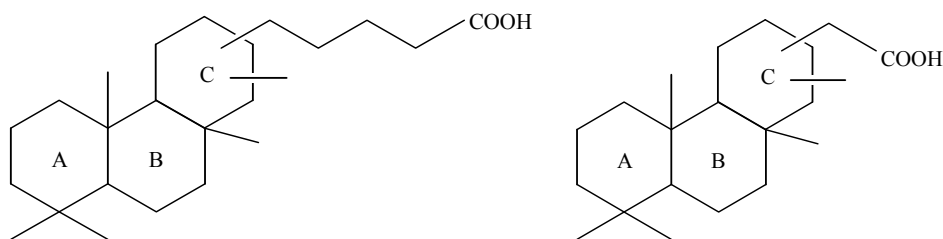
Druga mogućnost je da je 2,2,6-trimetil-cikloheksan karboksilna kiselina proizvod naknadne bakterijske oksidacije.

Bi-, tri- i policiklične kiseline su bitne jer mogu dati informacije o mogućim prekursorima ovih kiselina. Identifikaciju bicikličnih naftnih kiselina Seifert i saradnici¹⁵ su vršili preko estara naftnih kiselina sa 11 C-atoma, proučavanjem pikova dobijenih masenom spektrometrijom, predložena je najverovatnija konformaciona struktura za kiselinu sa bruto formulom $C_{11}H_{18}O_2$.



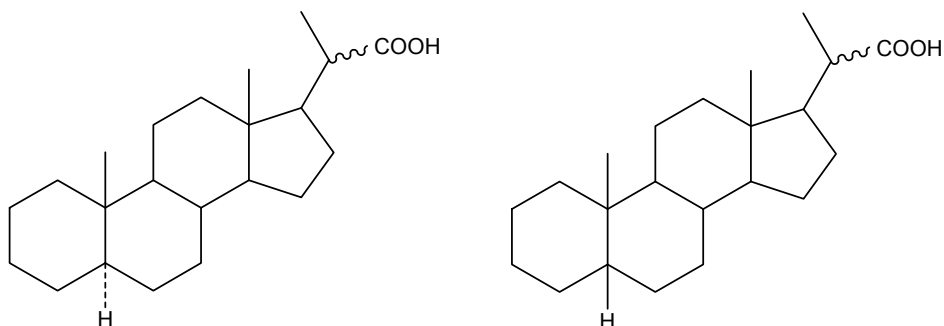
Shema 2.5.

Triciklične naftne kiseline otkrivene su u kalifornijskoj nafti posle bicikličnih kiselina od strane Teeter-a i saradnika^{16,17}. Oni su zaključili da je zastupljenost ovih kiselina nešto manja od zastupljenosti bicikličnih kiselina. Analiziranjem izolovanih tricikličnih naftnih kiselina sa 21 i 24 C-atoma utvrđena je terpenoidna struktura.



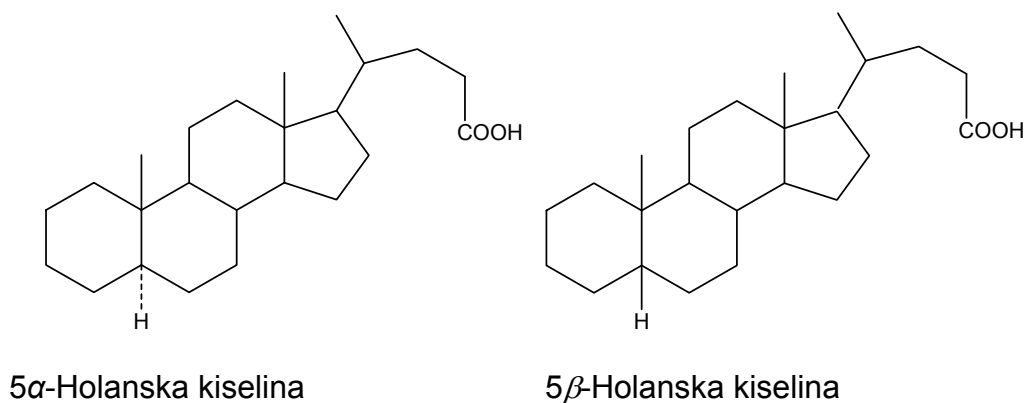
Shema 2.6.

Strukture tetracikličnih naftnih kiselina izolovanih iz kalifornijske nafte odredili su ponovo Seifert i saradnici¹⁷ i time su u raznovrsnu familiju karboksilnih kiselina u nafti uvrstili i steroidne kiseline.



5 α -Pregnan-20- ξ -karboksilna kiselina

5 β -Pregnan-20- ξ -karboksilna kiselina

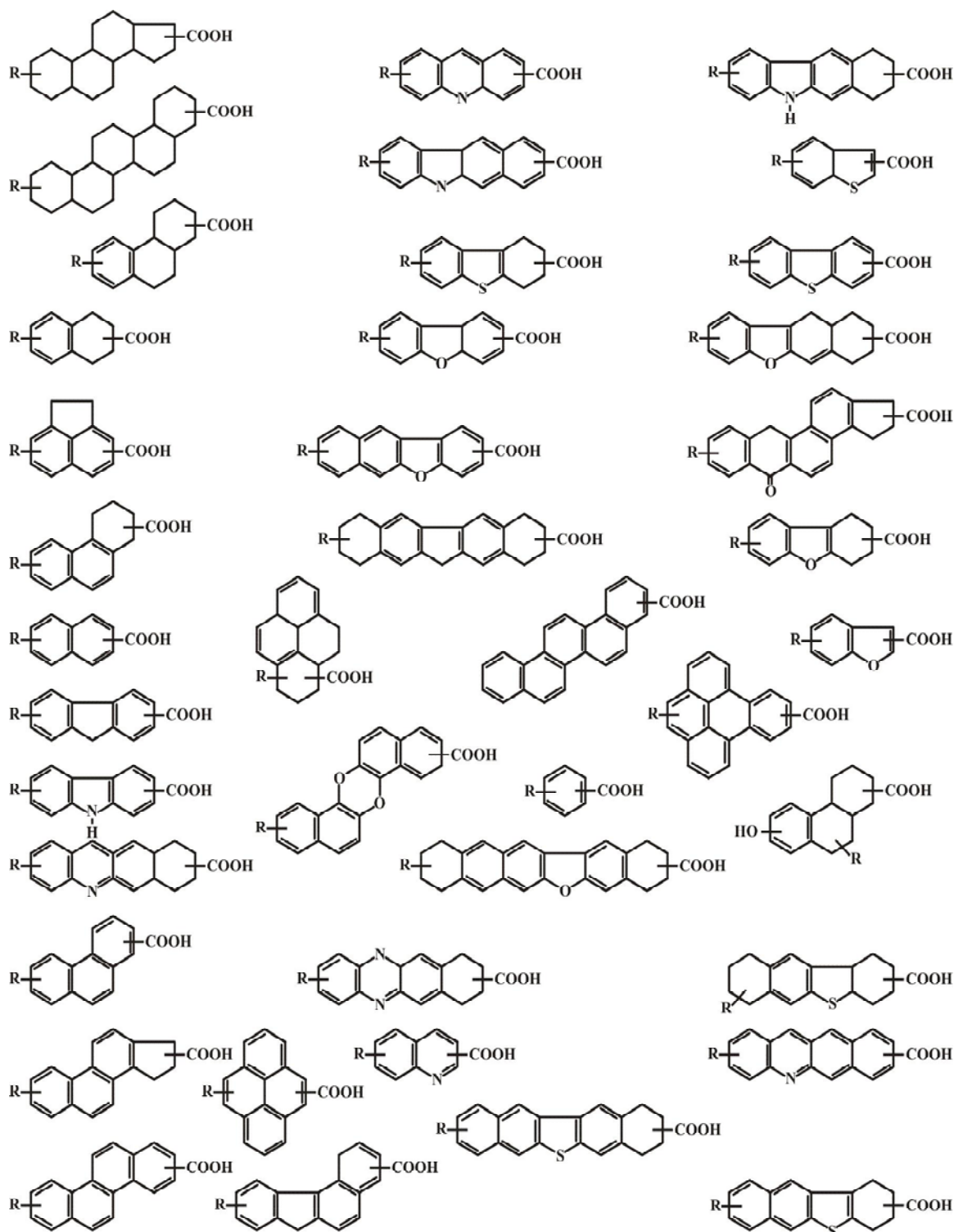


Shema 2.7.

Steroidne kiseline nađene u kalifornijskoj nafti zastupljene su u vrlo malim količinama i većini bi se moglo pripisati životinjsko poreklo što u suštini ne menja teoriju o predominantnom biljnom poreklu nafte a uključuje i njeno delimično animalno poreklo.

2.2.3. AROMATIČNE, HETEROCIKLIČNE I DRUGE KARBOKSILNE KISELINE

Pored alifatičnih i cikloalkanskih kiselina u nafti su pronađene i čisto aromatične, heterociklične kao i heterociklično-aromatične strukture¹⁸. Shodno tome nafte sa velikim brojem aromatičnih kiselina su „aromatične nafte”. Najrasprostranjenije kiseline ove klase su supstituisane benzoewe kiseline kao i kondenzovane višeciklične aromatične kiseline. U kalifornijskoj nafti je određeno više od četrdeset novih klasa kiselina i to uglavnom aromatičnih tipa indola, benzofurana, benzotiofurana, krizena, tionaftalena, karbazola, hinolina, akridina, fenantrena, naftalena^{19,20,21,22} (Shema 2.8.).



Klase karboksilnih kiselina u kalifornijskoj nafti

Shema 2.8.

Zaključak je da kod naftnih kiselina mali broj kiselina ima direktnu vezu sa biološkim prekursorima, znatno je više kiselina koje su delimično izgubile svoje primarne strukturne karakteristike u procesu geneze nafte, a najviše je onih naftnih kiselina koje su isključivi proizvod geohemijskih i bioloških transformacija što je specifičnost svake nafte.

2.3. IZOLOVANJE NAFTNIH KISELINA

Naftne kiseline su rasprostranjene u svim tipovima nafti, a njihov sadržaj se može kretati od tragova pa do 3%. Još mnogo pre početka komercijalne proizvodnje naftnih kiselina one su morale biti uklonjene iz pojedinih uljnih destilata kao toksične i korozivne primese. U tehnološkim razmerama čišćenje frakcija nafte od agresivnih i korozivnih naftnih kiselina je složena operacija, zato je od velikog značaja bila kasnije nađena primena naftnih kiselina koje su do tada bile otpadni proizvodi.

Najčešće korišćene metode pri izolovanju naftnih kiselina su:

- alkalna ekstrakcija
- metode jonske izmene
- adsorpcione metode
- metode zasnovane na različitoj rastvorljivosti kiselina i njihovih soli u vodi i organskim rastvaračima

Komercijalne naftne kiseline se izoluju iz pojedinih destilata nafte dejstvom vodenog rastvora natrijum-hidroksida. Ovaj način alkalne ekstrakcije tzv. „mokri postupak” najzastupljeniji je kao industrijska metoda izolovanja prirodnih naftnih kiselina iako je vezan za niz tehničkih problema. Veća koncentracija rastvora natrijum-hidroksida uvećava koncentraciju nesaponifikovanih materija u izolovanim kiselinama, jer se obrazuju stabilne emulzije, pa je stepen razdvajanja slojeva ponekad veoma nizak. Upotrebom povišenih temperatura može se delimično izbeći stvaranje stabilnih emulzija kod uljnih frakcija veće zapremine.

Za ekstrakciju naftnih kiselina iz kerozina, dizel goriva i svetlih uljnih frakcija radna temperatura je od 35-70⁰C, za trafo destilate, vretenska i mašinska ulja je i do 160⁰C.

Koncentracija baze treba da je niža kada se ekstrahuju naftne kiseline iz težih uljnih frakcija. Mogućnost obrazovanja emulzija je znatno umanjena dodatkom manje količine alkohola koji istovremeno smanjuje i rastvorljivost ulja. Kao sredstvo za ekstrakciju naftnih kiselina iz destilata nafte pored kalijum- hidroksida i natrijum-hidroksida sa manje ili više uspeha može se primeniti natrijum-karbonat, gašeni kreč, amonijak ili magnezijum-hidroksid¹⁰.

Pored ovog načina ekstrakcije postoje i mnogi drugi radovi gde su učinjeni pokušaji da se naftne kiseline dobiju i na drugačiji način.

Alekperova i saradnici²³ su koristili dietilen-glikol, etilen-glikol, izopropil-alkohol i dimetilformamid, a najboljim se pokazala upotreba dimetilformamida i izopropil-alkohola pri radnoj temperaturi od 20-21⁰C i prinosom od 87% - 95% .

Mardanov i saradnici²⁴ su razradili i predložili tehničko rešenje za industrijsku proizvodnju sirovih naftnih kiselina (asidola) izvlačenjem naftnih kiselina u vidu adiconog jedinjenja sa piperidinom.

2.4. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE NAFTNIH KISELINA

Naftne kiseline su uljaste tečnosti svetlo ili mrko žute boje, često lepljive i karakteristično neprijatnog mirisa. Fizičko-hemijske osobine su veoma različite i zavise od nalazišta nafte, a i sastava karboksilnih kiselina.

Izvršena je gruba podela na osnovu molekulskih masa naftnih kiselina na:

- niskomolekularne (≤ 16 C-atoma)
- srednjemolekularne (od 16-26 C-atoma)
- visokomolekularne (≥ 26 C-atoma)

Niskomolekularne naftne kiseline, koje su izolovane iz lakih frakcija nafte, su svetlo žute, lepljive, lako isparljive tečnosti, oštrog i neprijatnog mirisa. Visokomolekularne naftne kiseline, izolovane iz težih uljnih frakcija, su svetlo do tamno žute boje, manje izraženog oštrog mirisa, manje lepljive, uljaste, a ponekad i polučvrste.

Naftne kiseline su nerastvorne u vodi, ali rastvorne u velikom broju organskih rastvarača, gustina im je uglavnom manja od 1.

U pitanju su relativno slabe kiseline, a kiselost im opada sa porastom molekulskih težina.

Najvažnija fizičko-hemijska i tehnička osobina naftnih kiselina je kiselinski broj. Što je veći kiselinski broj manja im je molekulska masa i obrnuto. Znajući kiselinski broj možemo izračunati srednju molekulsku masu po formuli:

$$Mr = 56.1 \times 1000 / K_b$$

K_b = Kiselinski broj [mg KOH/g]

Mr = Srednja molekulska masa

Za grupno-strukturnu analizu naftnih kiselina koriste se različite instrumentalne metode¹¹:

- Infracrvena spektroskopija (FT-IR)
- Gasna hromatografija (GC)
- Negativni i pozitivni jon mod elektrosprej jonizacija-masena spektroskopija (ESI-MS)
- Tečna hromatografija visoke rezolucije (HPLC)

Sve korišćene analitičke metode tretiraju date kiseline kao grupu ili podgrupu zasnovanu na broju C-atoma ili Z-broju. Z predstavlja broj eliminisanih vodonika pri formiranju prstena, tako Z= 2 znači da postoji monociklična struktura. Maseno spektroskopske metode se koriste za određivanje molekulske kompozicije naftnih kiselina. Poznavanje molekulske strukture i kompozicije naftnih kiselina je potrebno da bi se u potpunosti razumeli toksični efekti i korozivnost naftnih kiselina.

Elektrosprej jonizacija (ESI) je tehnika koja se koristi u masenoj spektrometriji za dobijanje jona. Ona je naročito korisna za dobijanje jona iz makromolekula jer odoleva sklonosti ovih molekula da se fragmentuju pri jonizaciji (jer se njenom upotrebom izbegava fragmentacija ovih molekula). Za otkriće elektrosprej jonizacije John Fenn je 2002. godine dobio Nobelovu nagradu za hemiju^{25,26}.

U elektrosprej jonizaciji tečnost se ubrizgava kroz veoma malu naelektrisanu, najčešće metalnu kapilaru. Ta tečnost sadrži supstancu koja će biti proučavana (uzorak), rastvorenu u velikoj količini rastvarača koji je obično mnogo isparljiviji od uzorka. Isparljive kiseline, baze ili puferi često se takođe dodaju u te rastvore. Uzorak egzistira u rastvoru kao jon, ili u protonovanoj formi ili kao anjon. Odbijanjem naelektrisanja, tečnost sama sebe istiskuje iz kapilare i formira izmaglicu ili aerosol malih kapljica oko 10 μm .

U elektrosprej procesima posmatrani joni su kvazimolekularni joni koji su jonizovani dodatkom protona (vodonikovog jona) dajući $[M+H]$ (M = molekul uzorka, H = vodonikov jon), ili drugog katjona kao što je natrijumov jon $[M+Na]$, ili uklanjanjem protona $[M-H]$ naprimer. U elektrospreju višestruko naelektrisani joni, kao što su $[M+2H]$, su često posmatrani.

Elektrosprej tehnika je postala nenadmašna tehnika za unošenje tečnosti za masenu spektrometriju. Niska ili „meka” jonizacija, visoka transmisija jona, povećana osetljivost pri niskim brzinama toka, mogućnost analize velikih biomolekula i kompleksnih smeša jedinjenja poput nafte, povećana masena tačnost (preciznost) kao i povećana upotreba masenih spektrometara sa niskim masenim opsegom zajedno sa višestrukim naelektrisavanjem su sve dobri razlozi za izbor ESI kao jonizacione metode.

Sa svim prednostima ESI neophodno je naglasiti i njenu potpunu pouzdanost u analitičkoj hemiji. Bolje razumevanje mnogobrojnih mehanizama u toku ESI procesa je jedini način da se dobiju validni rezultati. Zato je neophodno znati sve o materijalima, dizajnu hardvera, dinamici protoka, sastavu tečne sredine i električnim osobinama.

Hemijske osobine naftenskih kiselina su slične hemijskim osobinama masnih kiselina. Lako daju soli alkalnih, zemnoalkalnih i teških metala, a to se koristi u industriji, zanatstvu i poljoprivredi. Grade estre, amide, hloride i druge derivate kiselina.

Alkalne soli naftenskih kiselina su uljaste tečnosti, dobro rastvorne u vodi i alkoholu. Snižavaju površinski napon na faznoj granici ulje-voda što dovodi do njihovog koncentrovanja na površinskom sloju i do obrazovanja emulzija. Analogno solima viših masnih kiselina u vodenom rastvoru hidrolizuju, pene i imaju osobine detergenata, a iz rastvora se mogu ukloniti dodatkom jakog elektrolita (natrijum-hlorid).

Zemnoalkalne soli naftenskih kiselina, kao i soli teških metala, mogu se dobiti reakcijom izmene natrijum-naftenata i odgovarajućih soli metala. To su lepljivo-uljaste ili kristalne supstance, slabo rastvorne u vodi ali dobro rastvorne u biljnim uljima i derivatima nafte. Neki trovalentni metali kao što su hrom i aluminijum obrazuju uglavnom soli sa jednim ili dva molekula naftenske kiseline.

Estri naftenskih kiselina se dobijaju sa raznim alkoholima u prisustvu konsentrovane sumporne kiseline kao katalizatora. Tačke ključanja su im za 40-50⁰C niže od tačaka ključanja odgovarajućih kiselina što olakšava rad na izolovanju i identifikaciji naftenskih kiselina. Estri su svetlo žute tečnosti sa manje neprijatnim mirisom od kiselina.

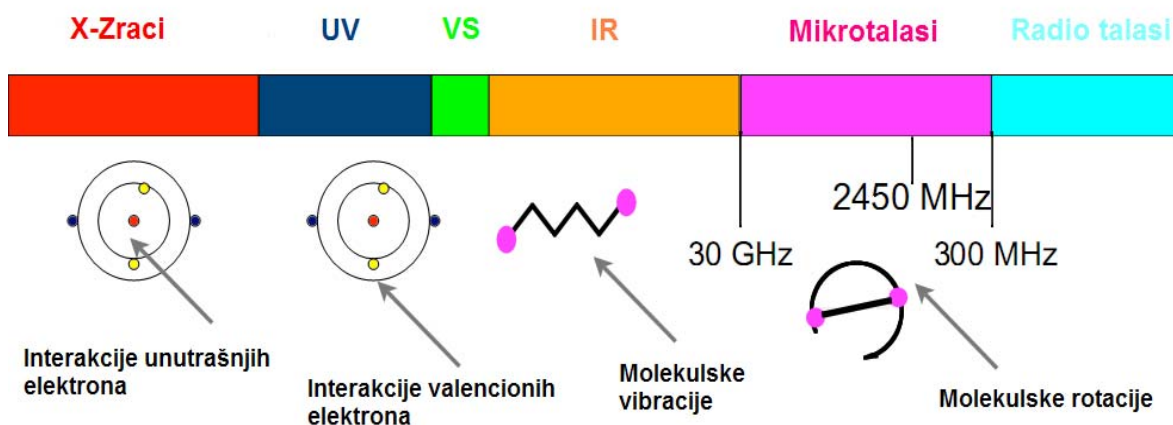
Hloridi naftenskih kiselina nastaju reakcijom sa fosfortrihloridom ili fosforpentahloridom. To su vema reaktivne tečnosti, neprijatnog mirisa i znatno nižih tačaka ključanja od odgovarajućih kiselina. Često se koriste za prevođenje naftenskih kiselina u druge derivate, npr. amide.

Amidi naftenskih kiselina nastaju iz hlorida kiselina dejstvom amonijaka. Amidi se koriste za izdvajanje čistih naftenskih kiselina iz smeša, kristalizacijom, jer dobro kristališu iz vode, benzena, acetona i nekih drugih rastvarača. Amidi naftenskih kiselina mogu poslužiti i za dobijanje drugih derivata kao što su nitrili ili amini. Zagrevanjem amida sa fosforpentoksidom nastaju nitrili naftenskih kiselina. Dejstvom broma i natrijum-hidroksida na amide naftenskih kiselina *Hofman*-ovom degradacijom dobijaju se amini.

Danas se jedan deo „komercijalnih naftenskih kiselina” dobija sintetički, oksidacijom naftenskih ugljovodonika iz nafte. U tehnološkim procesima oksidacija se vrši vazduhom, a kao katalizatori se koriste kalijum- i mangan-naftenati. Dobri rezultati se dobijaju samo ako se sirovina pre oksidacije dearomatizuje. Ovako dobijene naftenske kiseline imaju strukture i osobine slične prirodnim naftenskim kiselinama.

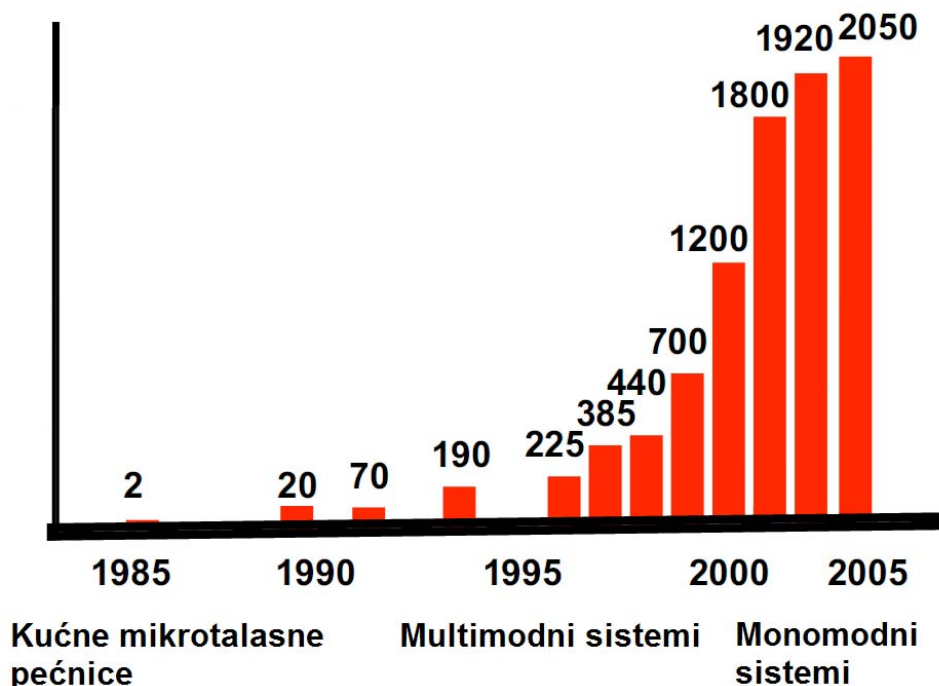
2.5. MIKROTALASNO KATALIZOVANE SINTEZE

U elektromagnetnom spektru oblast mikrotalasnog (MT) zračenja se nalazi između infracrvenog zračenja i radio talasa (Slika 2.1.). Mikrotalasi poseduju talasnu dužinu od 1mm-1m, što odgovara frekvenciji između 300 MHz i 30 GHz.



Slika 2.1. Elektromagnetni spektar

Mikrotalasna aktivacija, kao jedan nekonvencionalan izvor energije, postaje sve popularnija i korisnija tehnologija u organskoj hemiji. Broj godišnjih publikacija u oblasti mikrotalasno katalizovane organske i neorganske sinteze rapidno raste. Od pionirskog rada Gedye-a u 1986. godini ekspanzija interesovanja za ovu sintetsku tehniku neprestano raste, tako je već 2000. godine broj objavljenih radova preko hiljadu a taj trend se i dalje nastavlja (Slika 2.2.).



Slika 2.2. Broj publikovanih članaka, koji obuhvataju mikrotalasno katalizovane sinteze, u periodu od 1985. do 2005. godine

Većina ovih publikacija akcentat stavlja na značajno ubrzanje reakcija naročito kada se one izvode u uslovima bez prisustva rastvarača. Kombinacija reakcionih uslova bez rastvarača uz mikrotalasno ozračivanje karakteriše uvek veliko skraćanje reakcionog vremena, povećanje prinosa proizvoda a često su reakcije selektivnije nego kada su izvođene uz konvencionalno zagrevanje. Pored svega ovog bitno je naglasiti niz prednosti i sa ekološkog aspekta, odnosno sa aspekta „zelene hemije”.

Značajan broj ovih radova je međutim baziran na netačnim ili nepotvrđenim poređenjima sa klasičnim uslovima koji daju dvosmislene zaključke u pogledu mikrotalasnih efekata. Iz tih razloga očigledne kontradikcije i kontraverze se pojavljuju u literaturi. Neophodna je bila racionalizacija svih ovih rezultata da bi se predložila interpretacija efekata koja bi bila zasnovana na preciznim i pouzdanim podacima koji su rezultat striktnog poređenja između reakcija izvedenih konvencionalnim zagrevanjem i reakcija pod dejstvom mirotalasnog ozračivanja, pod sličnim uslovima (reakcioni medijum, temperatura, vreme, pritisak). Tako, preporučuje se upotreba monomodnog reaktora jer fokusira talase (obezbeđuje homogenost električnog polja) i obezbeđivanje precizne kontrole temperature (korišćenjem optičkog vlakna ili infracrvenom detekcijom) u toku reakcije. Ovo pruža mogućnosti za rad sa prilično ujednačenim profilima temperaturnih povećanja u obe vrste aktivacije. Tako definisana poređenja omogućavaju da se izvedu zaključci o prednostima upotrebe mikrotalasnog ozračivanja na različite reakcione tipove i eksperimentalne uslove.

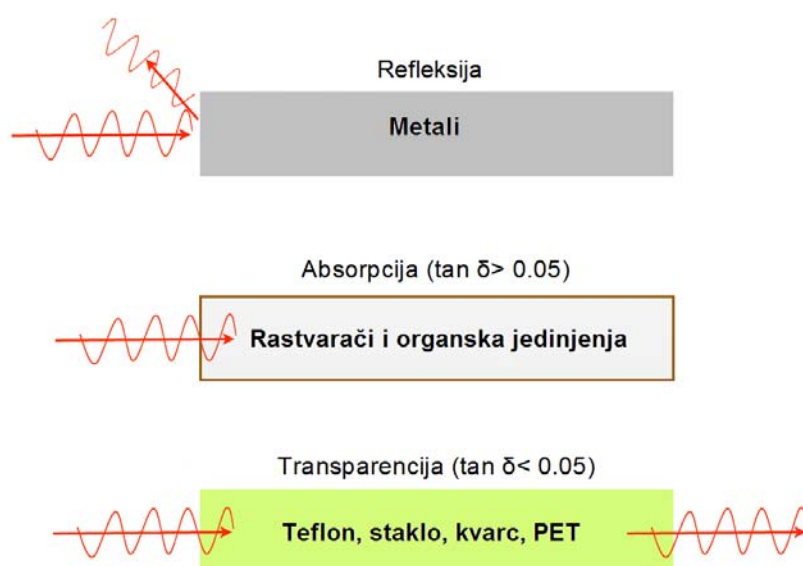
2.5.1. EFEKTI MIKROTALASA

2.5.1.1. POREKLO MIKROTALASNIH EFEKATA

Ubrzavanje reakcija izlaganjem mikrotalasima proizilazi iz materijal-talas interakcija (Slika 2.3.) koje izazivaju:

- 1) termičke efekte (koji mogu lako biti procenjeni merenjima temperature)
- 2) specifične (ne-potpuno termičke) efekte.

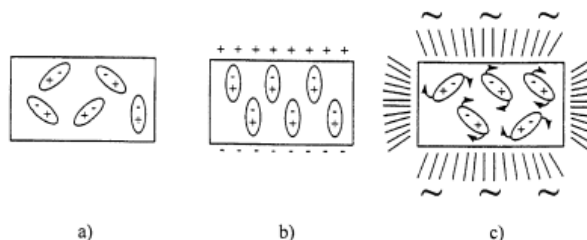
Kombinacija ova dva doprinosa je odgovorna za posmatrane efekte.



Slika 2.3. Interakcije materijala sa mikrotalasima

2.5.1.1.1. TERMIČKI EFEKTI

Termički efekti (dielektrično zagrevanje), mogu biti rezultat dipolarne polarizacije kao posledica dipol-dipol interakcija između polarnih molekula i elektromagnetnog polja. Pretvaranje ove energije u toplotu je rezultat intermolekulskog trenja molekula kada dipoli menjaju svoju međusobnu orijentaciju pri svakoj izmeni električnog polja, pri veoma visokoj frekvenciji ($\nu = 2450$ MHz) (Slika 2.4.).



Slika 2.4. Efekti „opkoljavanja” električnog polja na međusobnu orijentaciju dipola: a) bez uticaja električnog polja, b) izloženih kontinualnom električnom polju, c) izloženih naizmeničnom električnom polju visoke frekvencije

Ovo pretvaranje energije unutar materije obezbeđuje mnogo pravilniju raspodelu temperature nego pri klasičnom zagrevanju. Klasični termički fenomen provođenja igra samo sekundarnu ulogu u konačnom uravnoteženju temperature.

U ovom opsegu frekvencija polarizacije naelektrisanog prostora može takođe uticati i biti od primarnog značaja kod poluprovodnika pošto se to tiče materijala koji sadrži slobodne elektrone. Ovaj fenomen je jako vidljiv pri zagrevanju čvrstih čestica, više ili manje magnetičnih, kao što su različiti mineralni oksidi ili metali (Tabela 2.2. i 2.3.).

Tabela 2.2. Termički efekti molekula rastvarača nakon mikrotalasnog dejstva („domestic” pećnica, 600 W)

Tečnost	Temperatura posle 1 min ozračivanja [°C]	Tačka ključanja [°C]	Dipolni momenat [Debye]
voda	81	100	5.9
etanol	78	78	5.8
<i>n</i> -pentanol	106	137	5.7
sirćetna kiselina	110	119	5.6
dimetilformamid	131	153	10.8
<i>n</i> -heksan	25	98	0.0
ugljentetrahlorid	28	77	0.0

Tabela 2.3. Termički efekti nekih atoma i molekula čvrstih supstanci nakon mikrotalasnog dejstva („*domestic*” pećnica, 600 W)

Čvrsta konzistencija	Vreme ozračivanja [min]	Konačna temperatura [°C]
Al	6	577
C	1	1283
Co	3	697
Cu	7	228
Fe	7	768
Zn	3	581
CuO	6	67
Cu ₂ O	6	1012
Fe ₃ O ₄	3	1258
MnO	6	113
ZnO	5	1270

Za tečne supstance (rastvarače) jedino polarni molekuli selektivno absorbuju mikrotalase, nepolarni molekuli su inertni za mikrotalasnu absorpciju, pa se tako sporije i znatno teže zagrevaju. Takođe, u ovom kontekstu efikasnosti mikrotalasne absorpcije, uočene su veće vrednosti tačkaka ključanja kada su rastvarači izloženi mikrotalasnom ozračivanju u poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem. Ovaj efekat, nazvan „efekat pregrevanja” pripisan je nekoj vrsti usporavanja jezgra (Tabela 2.4.).

Tabela 2.4. Tačke ključanja nekih tipičnih polarnih rastvarača pri normalnim uslovima i uz mikrotalasno zagrevanje u multimod „*domestic*” sistemu

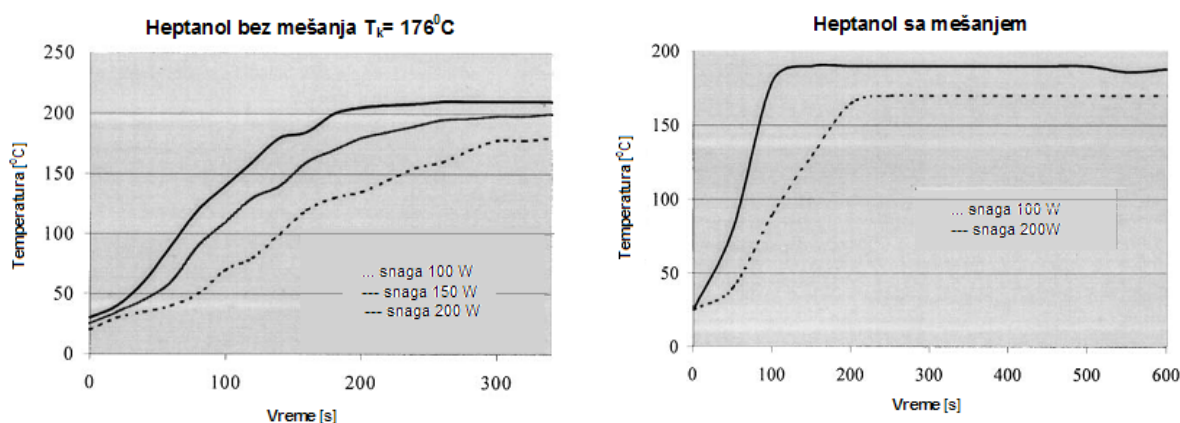
Rastvarač	Normalni uslovi	MT izlaganje	Razlika
voda	100	105	5
1-butanol	117	138	21
2-butanol	98	127	29
metanol	65	84	19
aceton	56	89	33
etil-acetat	77	102	25
tetrahidrofuran	67	103	36
acetonitril	82	120	38

Ovaj „efekat pregrevanja” često je primećen pri upotrebi multimodnih „*domestic*” sistema, u odsustvu mešanja. U tabeli 2.5. prikazani su rezultati merenja u monomodnim sistemima u odsustvu i prisustvu efikasnog mešanja.

Tabela 2.5. Tačke ključanja [$^{\circ}\text{C}$] nekih polarnih rastvarača pod mikrotalasnim ozračivanjem u prisustvu ili odsustvu jezgara za mešanje

Rastvarač	T_k	Mikrotalasno izlaganje		
		Multimodni sistem	Monomodni sistem (100 W)	Monomodni sistem + jezgra za mešanje
voda	100	105	100	100
1-heptanol	176	208	180	173
etil-acetat	77	102	92	77
hloroform	61	89	85	62
cikloheksanon	155	186	168	155

Tipični profili povećanja temperatura i merenja tačaka ključanja, korišćenjem monomodnih sistema prikazani su na slici 2.5..

**Slika 2.5.** Profili temperaturnog povećanja kod heptanola izloženog mikrotalasnom ozračivanju

„Efekat pregrevanja” je jasno povezan sa efektima mešanja, tj. prisustvom jezgara za mešanje i sa snagom upotrebljenih mikrotalasa. Za očekivati je da će ovaj „efekat pregrevanja” nestati ako se eksperimenti izvode u smešama kojima je obezbeđeno dobro mešanje, koristeći pri tom nisku mikrotalasnu snagu. „Efekat pregrevanja” je dominantno prisutan u odsustvu mešanja tj. u zatvorenim posudama pri upotrebi „domestic” mikrotalasnih pećnica.

2.5.1.1.2. SPECIFIČNI MIKROTALASNI EFEKTI

Poreklo specifičnih mikrotalasnih efekata se deli na one koji nisu čisto termički (A. i B.) i na termičke (C.) povezane sa intervencijom „vrućih tačaka” tj. lokalnim pregrevanjem. Efekti koji nisu čisto termički, odnosno svi osim jednostavnog dielektričnog zagrevanja imaju višestruko poreklo. Ovi efekti mogu biti objašnjeni preko *Arrhenius*-ove jednačine (1) i modifikacijama nekih od izraza u ovoj jednačini.

$$K = A e^{-\Delta G/RT} \quad (1)$$

A. Tako, povećanje pre-eksponencijalnog faktora A zavisi o mogućnosti molekulskih sudara. Efikasnost sudara može biti uspešno izazvana međusobnom

orientacijom polarnih molekula koji učestvuju u reakciji. Kako ovaj faktor zavisi od vibracione frekvencije atoma može se pretpostaviti da ga mikrotalasno polje može podražavati.

- B. Smanjenje energije aktivacije ΔG je sigurno glavni efekat. Kada se razmatra doprinos entalpije i entropije na vrednost ΔG u jednačini (2) može se predvideti da će veličina izraza $-T\Delta S$ biti povećana u mikrotalasno-indukovanoj reakciji u odnosu na klasično zagrevanje, kao posledica dipolarne polarizacije.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

- C. Intervencija mikroskopski lokalizovane visoke temperature je zaslužna u sonohemiji da opravda sonohemijski efekat. To sugeriše da u nekim slučajevima mikrotalasna aktivacija može poticati od „vrućih tačaka” generisanih dielektričnom relaksacijom na molekulskoj skali.

2.5.1.2. EFEKTI MEDIJUMA U MIKROTALASNOJ SINTEZI

Mikrotalasni efekti mogu dodatno biti proučavani uzimajući u obzir reakcioni medijum. Efekti rastvarača su prilično značajni. Svaki rastvarač (kao i reagens) koji se koristi u reakciji različito stupa u interakciju sa mikrotalasnom energijom. Iako polarnost rastvarača nije jedini faktor za određivanje veličine apsorpcije mikrotalasne energije polarnost je koristan podatak za utvrđivanje koliko dobro će medijum biti zagrejan kada se premesti u mikrotalasno polje. Što je rastvarač polarniji on će posedovati snažniji dipol te će prouzrokovati veće rotaciono kretanje i stoga više i brže zagrevanje. Napolarni rastvarači ne apsorbuju energiju jer nisu zahvaćeni promenama u mikrotalasnom polju, pa se generalno ne zagrevaju toliko dobro kao polarni. Međutim, pri odabiru rastvarača za mikrotalasnu sintezu tačke ključanja nisu odlučujući faktor jer se delovanjem mikrotalasne energije (300 W) svi rastvarači zagreju do tačke ljučanja za nekoliko sekundi. Ipak, treba uzeti u obzir da kada su rastvarači izloženi mikrotalasima, naročito u odsustvu mešanja, tačke ključanja su više u poređenju sa klasičnim zagrevanjem što je posledica ranije već opisanog „efekta pregrevanja”.

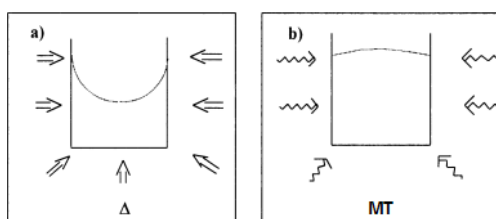
- A. Primenom polarnih rastvarača, bilo protičnih (kao alkohol) ili aprotičnih (kao DMF, CH_3CN , DMSO itd.) glavna interakcija može se odvijati između mikrotalasa i polarnih molekula rastvarača. Transfer energije vrši se sa molekula rastvarača na reakcionu smešu i reaktante i za očekivati je da neki specifični mikrotalasni efekti na reaktantima mogu biti maskirani apsorpcijom polja od strane rastvarača. Zbog toga bi brzina reakcije mogla da bude približno ista kao pri konvencionalnom zagrevanju (Δ).
- B. Još je zanimljivija upotreba napolarnih rastvarača (npr. ksilen, toluen, CCl_4 , ugljovodonici) jer su oni transparentni za mikrotalase i slabije ih apsorbuju. Oni ipak dozvoljavaju specifičnu apsorpciju od strane reaktanata. Ako su reaktanti polarni, energija se prenosi sa reaktanata na rastvarač i rezultati mogu biti drugačiji kada se radi sa mikrotalasima u odnosu na konvencionlno zagrevanje. Ovaj efekat ukazuje na jasan uticaj rastvarača na reakciju i stoga je subjekat kontraverze. Jasno, uticaj rastvarača ima veliki značaj i imajući u vidu njegove mogućnosti ili pak mogućnosti mikrotalasnih specifičnih efekata mogu se unapred dirigovati uslovi promenom rastvarača.

C. Mikrotalasni efekti se mogu posmatrati u reakcijama bez rastvarača, „*solvent-free*” reakcije. Preparativni interes za upotrebu ovih metoda leži u separaciji i ekonomičnosti, bezbednosti i čistoći procedura, a absorpcija mikrotalasnog zračenja je tada ograničena samo na reaktivne vrste. Specifični efekti su stoga optimalni, pošto nisu izazvani prisustvom rastvarača. Ove reakcije mogu biti izvedene na tri načina:

- reakcije između nerazblaženih („*neat*”) reagenasa u kvazi-ekvivalentnim količinama, uz zahtev za bar jednom tečnom fazom u heterogenoj sredini
- uslovi katalize čvrsto-tečnog faznog transfera (*PTC*, „*phase transfer catalysis*”), u ovom slučaju anjonskih reakcija upotrebom tečnih elektrofila, reaktanta, organske faze i katalitičke količine tetralkilamonijumovih soli kao transfer-agensa
- reakcije uz upotrebu reagenasa nanetih na čvrste mineralne nosače (aluminijum- i silicijum-oksidi, celit) u suvoj sredini („*dry media*”).

Ove procedure primenjene uz mikrotalasnú aktivaciju su veoma delotvorne i vode mnogim uspešnim hemijskim transformacijama opisanim u literaturi.

Neki očigledni specifični efekti mogu ipak nastati i od nosača. Mineralni nosači su generalno loši toplotni provodnici tj. značajni gradijenti temperature mogu biti razvijeni u posudama pri konvencionalnom zagrevanju, a pošto se oni ponašaju kao efikasni absorbenti mikrotalasne energije time obezbeđuju više homogenosti u temperaturi (Slika 2.6.).

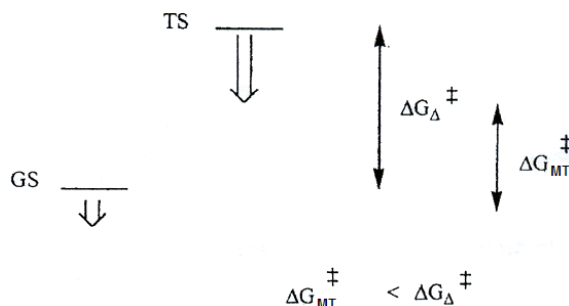


Slika 2.6. Gradijenti u temperaturi za materijale izložene a) konvencionalnom zagrevanju (Δ) ili b) mikrotalasnú zračenju

2.5.1.3. EFEKTI NA REAKCIONE MEHANIZME

Mikrotalasni efekti kao rezultat interakcije materijal-talasi usled fenomena dipolarne polarizacije i velike polarnosti molekula ili rastvarača više su izraženi sa porastom temperature. U odnosima reaktivnosti i kinetike, specifični efekat dakle mora biti razmatran u skladu sa reakcionim mehanizmom i s posebnim osvrtom na to kako polarnost sistema utiče na napredak reakcije.

Specifični mikrotalasni efekti mogu biti očekivani kod polarnih mehanizama, kada polarnost raste u toku reakcije od osnovnog stanja prema prelaznom stanju. Rezultat zavisi i od medijuma i od reakcionog mehanizma. Ako je stabilizacija prelaznog stanja (*TS*) efikasnija nego kod osnovnog stanja (*GS*) to dovodi do povećanja reaktivnosti i smanjenja aktivacione energije ΔG_{MT} (Slika 2.7.).



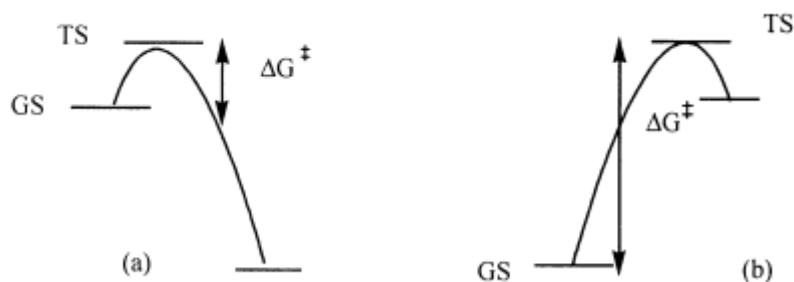
Slika 2.7. Snižavanje energije aktivacije mikrotalasnim angažovanjem, odnosno stabilizacija prelaznog (TS) u odnosu na osnovno (GS) stanje.

2.5.1.4. EFEKTI NA PRELAZNA STANJA U REAKCIJAMA

Razmatran je položaj prelaznog stanja duž reakcionih koordinata u relaciji poznatoj kao *Hammond*-ov postulat.

Ako reakcija zahteva samo malu aktivacionu energiju, ΔG^{\ddagger} , TS liči na GS, ostvaruje se „*reaktant-slično prelazno stanje*”. Stoga je polarnost neznatno modifikovana između GS i TS u toku reakcije i mogu se očekivati samo slabi specifični mikrotalasni efekti.

Nasuprot tome, reakcije koje teku teže podrazumevaju veću aktivacionu energiju. TS stoga dolazi kasnije u toku reakcionog puta i usled toga uticaj polarnih efekata može biti značajno poboljšan. Pretpostavka je da mikrotalasni efekat mora biti izraženiji kada TS dolazi kasnije duž reakcionih koordinata, to je opisano kao „*proizvod-slično prelazno stanje*” i stoga značajnije utiče na povećanje razlike u polarnosti između GS i TS u toku reakcije (Slika 2.8.).



Slika 2.8. a) Malo ΔG^{\ddagger} => ranije TS => mala promena u polarnosti TS/GS => efekat mikrotalasa je mali

b) Veliko ΔG^{\ddagger} => kasnije TS => značajna promena u polarnosti TS/GS => efekat mikrotalasa je velik

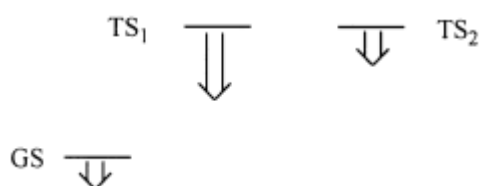
Ovaj zaključak je u skladu sa opažanjem Lewis-a koji kaže da: „nepolarniji reakcioni sistemi teže da pokažu veći efekat pod mikrotalasnim zračenjem”.

Zahvaljujući tome, mikrotalasni efekat može biti veoma važan kada su sterni efekti uključeni u reakciju, odnosno za stereoselektivne i stereospecifične reakcije.

2.5.1.5. EFEKTI NA SELEKTIVNOST

U literaturi se može naći nekoliko primera povećane selektivnosti u kojima sterna tok, hemo- i regioselektivnost reakcija može biti poboljšana pod mikrotalasnim ozračivanjem u poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem.

Kada su sporedne (konkurentne) reakcije prisutne GS je zajednička za oba procesa. Mehanizam odigravanja reakcije preko polarnijeg TS bi stoga mogao biti favorizovan pod mikrotalasnim zračenjem (Slika 2.9.).



Slika 2.9. Polarnije TS₁ je stabilizovanije dipol-dipol interakcijama sa električnim poljem i više podložno mikrotalasnom efektu

Teoretske kalkulacije ukazuju da će mikrotalasno ozračivanje favorizovati polarniji put koji odgovara prelaznom stanju koje nastaje teže²⁷.

2.5.2. PRIMENA MIKROTALASA U SINTEZAMA

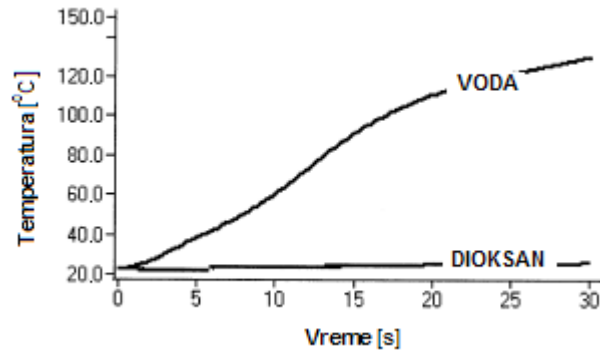
Mikrotalasno zagrevanje je veoma pogodno za primenu u organskoj sintezi. Zagrevanje je trenutno, veoma specifično i ne postoji potreba za kontaktom između izvora energije i reakcione posude.

Mikrotalasno katalizovana organska sinteza je tehnika koja može biti upotrebljena za istraživanje „hemijske vasiona“, mogućnosti za sintetsku raznolikost su samim tim jako velike i s pravom neki autori misle da su tako otvorene još neslućene mogućnosti.

Razvojem tehnika u mikrotalasnim sintezama postaje sve realnija pretpostavka da bi sve konvencionalno zagrevane reakcije mogle biti izvedene upotrebom ove tehnike i naravno brže, sa većim prinosima i manje sporednih proizvoda, tj. čistije.

2.5.2.1. MEHANIZMI MIKROTALASNOG ZAGREVANJA

Ako se dva uzorka koji sadrže vodu i dioksan, respektivno, zagrevaju u monomodnoj mikrotalasnoj aparaturi na fiksnoj snazi radijacije i isto vreme konačna temperatura će biti veća u vodenom uzorku (Slika 2.10.).

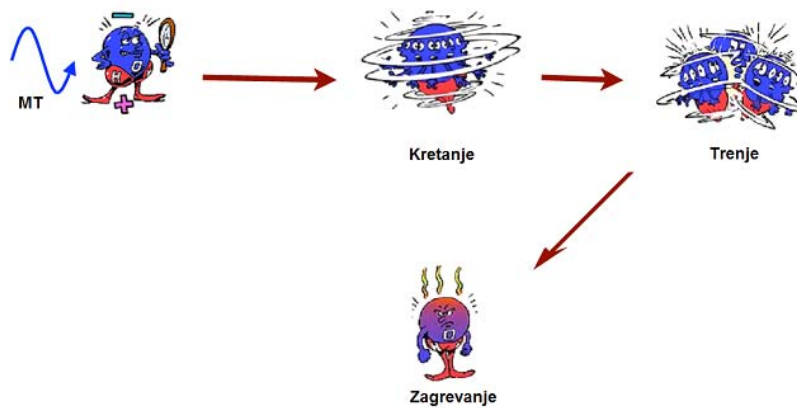


Slika 2.10. Povećanje temperature vode i dioksana ozračivanjem sa mikrotalasima snage 150 W

U cilju objašnjenja ovog fenomena neophodno je shvatiti mehanizam mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja. Kao i svako elektromagnetno zračenje i mikrotalaska radijacija može biti podeljena na komponentu električnog polja i komponentu magnetnog polja, koje su odgovorne za dielektrično zagrevanje. To zagrevanje se odigrava preko dva osnovna mehanizma tj. dipolarnog polarizacionog i kondukcionog mehanizma.

A. DIPOLARNI POLARIZACIONI MEHANIZAM

Jedna od interakcija električne komponente polja sa medijumom zove se dipolarni polarizacioni mehanizam. Da bi supstanca generisala toplotu kada se ozračuje mikrotalasima mora da poseduje dipolni momenat, kao u slučaju molekula vode. Dipol je osetljiv na spoljne električno polje i stoga će nastojati da se orijentiše u pravcu električnog polja rotacijom (Slika 2.11.).

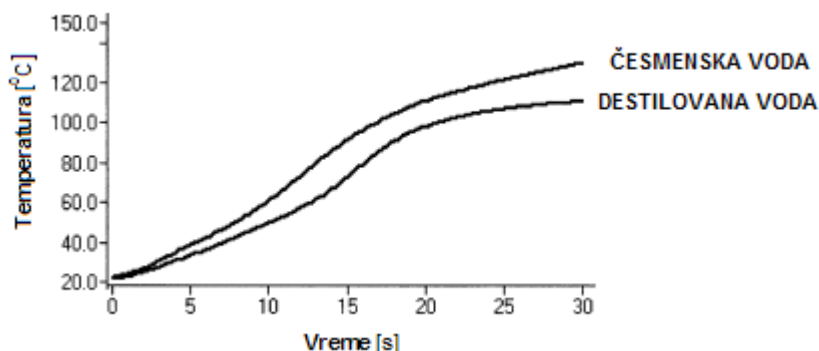


Slika 2.11. Dipolarni molekuli koji nastoje da se orijentišu u pravcu oscilujućeg električnog polja

Primenjeno polje obezbeđuje neophodnu energiju za tu rotaciju. U gasovima, gde su molekuli prostorno udaljeni jedni od drugih, orijentacija u pravcu primenjenog polja se odvija daleko brže za razliku od tečnosti gde je ono smanjeno usled prisustva ostalih molekula. Sposobnost molekula u tečnostima za orijentisanje u prisustvu primenjenog električnog polja može da varira u zavisnosti od frekvencije i viskoziteta tečnosti. Pod nižim frekvencijama ozračivanja molekuli rotiraju u skladu sa oscilujućim električnim poljem. Molekul dobija izvesnu energiju pri ovakvom ponašanju ali globalni toplotni efekat usled ovog centriranja je mali. Pod dejstvom visoke frekvencije električnog polja dipoli ne poseduju dovoljno vremena za odgovor na oscilacije polja i ne rotiraju. Pošto kretanje nije indukovano u molekulima ne dolazi ni do transfera energije, pa ni do zagrevanja. Ukoliko je primenjeno polje u mikrotalasnom radijacionom regionu pomenuti fenomen se javlja između ova dva ekstrema. U mikrotalasnom radijacionom prostoru frekvencija primenjenog zračenja je dovoljno niska tako da dipoli imaju vremena za rotaciju i precizno praćenje polja. Međutim, dok se dipol reorijentiše poravnavajući se sa električnim poljem, polje se već menja i stvara faznu razliku između orijentacije polja i dipola. Pomenuta fazna razlika prouzrokuje gubitak energije kod dipola, dobijene molekulskim trenjem i sudarima, dajući povod za dielektrično zagrevanje. Tako, u ranijem primeru postaje jasno zašto se dioksan, koji nema karakteristike dipola neophodne za mikrotalasno dielektrično zagrevanje, ne zagreva a voda, koja poseduje velik dipolni momenat, se lako zagreva. Takođe, ovo objašnjava i nemogućnost zagrevanja gasova pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, pošto je udaljenost između dva rotirajuća molekula dovoljno velika da bi bili sposobni da prate električno polje tako da fazna razlika bude generisana.

B. MEHANIZAM PROVOĐENJA

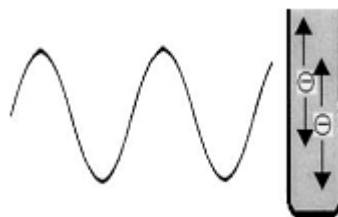
Ako se dva uzorka koji sadrže destilovanu i česmensku vodu, respektivno, zagrevaju u monomodnoj mikrotalasnoj aparaturi na istoj snazi radijacije i isto vreme konačna temperatura će biti veća u uzorku česmenske vode (Slika 2.12.).



Slika 2.12. Povećanje temperature destilovane i česmenske vode ozračivanjem sa mikrotalasima snage 150 W

Ovaj fenomen je posledica druge važne interakcije električne komponente polja sa uzorkom, kondukcionog mehanizma.

U rastvoru koji sadrži jone, joni će se kretati kroz rastvor pod uticajem električnog polja što dovodi do povećanja stepena sudara, trenja i prevođenja kinetičke energije u toplotu (Slika 2.13.).



Slika 2.13. Naelektrisane čestice u rastvoru će pratiti primenjeno električno polje

Ovaj mehanizam provođenja energije je daleko jača interakcija nego dipolni mehanizam s obzirom na toplotno-generišući kapacitet. Tako, toplota dobijena mehanizmom provođenja usled prisustva jona povećava ukupnu toplotu adiranjem na toplotu dobijenu preko dipolarnog mehanizma, što dovodi do povećanog zagrevanja česemske vode.

2.5.2.2. UTICAJ MIKROTALASNOG ZAGREVANJA NA RASTVARAČE

Faktor gubitka

Kao što je gore naglašeno, polarni rastvarači i/ili joni su neophodni za mikrotalasno zagrevanje. Kako mikrotalasno zagrevanje utiče na različite rastvarače? Dielektrična polarizacija zavisi primarno od sposobnosti dipola da se reorjentišu u primenjenom električnom polju. Logična je pretpostavka da polarniji rastvarač, odnosno onaj koji poseduje veću dielektričnu konstantu, lakše absorbuje mikrotalasno zračenje i dobija višu temperaturu. To bi bilo u skladu sa primerom vode i dioksana (Slika 2.10.). Međutim, ako se dva rastvarača sa uporedivim dielektričnim konstantama ϵ_s , kao što su aceton i etanol (Tabela 2.5.) zagrevaju pri istim uslovima (snaga radijacije i vreme) konačna temperatura će biti mnogo veća kod etanola nego kod acetona.

Tabela 2.5. Dielektrične konstante i vrednosti tangensa gubitka za pojedine rastvarače

Rastvarač	Dielektrična konstanta (ϵ) ^a	tan ugla gubitka (tan δ) ^b
heksan	1.9	
benzen	2.3	
hloroform	4.8	
tetrahidrofur	7.6	0.059
metilenhlorid	9.1	0.047
aceton	20.6	0.042
etanol	24.6	0.054
metanol	32.7	0.941
acetonitril	36.0	0.659
dimetilformamid	36.7	0.062
dimetilsulfoksid	47.0	0.161
voda	80.4	0.123

^a Dielektrična konstanta, ϵ_s , odgovara relativnoj dielektričnoj konstanti, ϵ' , na sobnoj temperaturi i pod uticajem statičkog električnog polja

^b Vrednosti tangensa gubitka δ određene na frekvenciji 2.45 GHz i sobnoj temperaturi

Da bi mogli porediti sposobnosti različitih rastvarača da generišu toplotu od mikrotalasnog zračenja moramo uzeti u razmatranje njihove kapacitete absorpcije mikrotalasne energije i prevođenja absorbovane energije u toplotu. Ove faktore

možemo posmatrati korišćenjem ugla gubitka, δ , koji je obično izražen u obliku njegovog tangensa predstavljenog u jednačini 3:

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon' \quad (3)$$

Dielektrična konstanta (ϵ') predstavlja sposobnost dielektričnog materijala da uskladišti potencijalnu energiju pod uticajem nekog električnog polja. Na sobnoj temperaturi pod uticajem statičkog električnog polja ϵ' je identična dielektričnoj konstanti ϵ_s . Faktor gubitka (ϵ'') određuje efikasnost kojom se absorbovana energija prevodi u toplotnu. Za rastvarače sa uporedivim ϵ' i niskim vrednostima $\tan \delta$, faktor gubitka predstavlja uobičajeni parametar za poređenje mogućnosti različitih materijala da konvertuju mikrotalasnu u termičku energiju. Dielektrične konstante etanola i acetona su svakako u istom rangu (Tabela 2.5.) ali etanol poseduje daleko veći tangentski gubitak. Iz ovog razloga kupovanje etanola sa mikrotalasnim zračenjem je bolje što rezultuje u daleko bržem povećanju temperature reakcionog sistema.

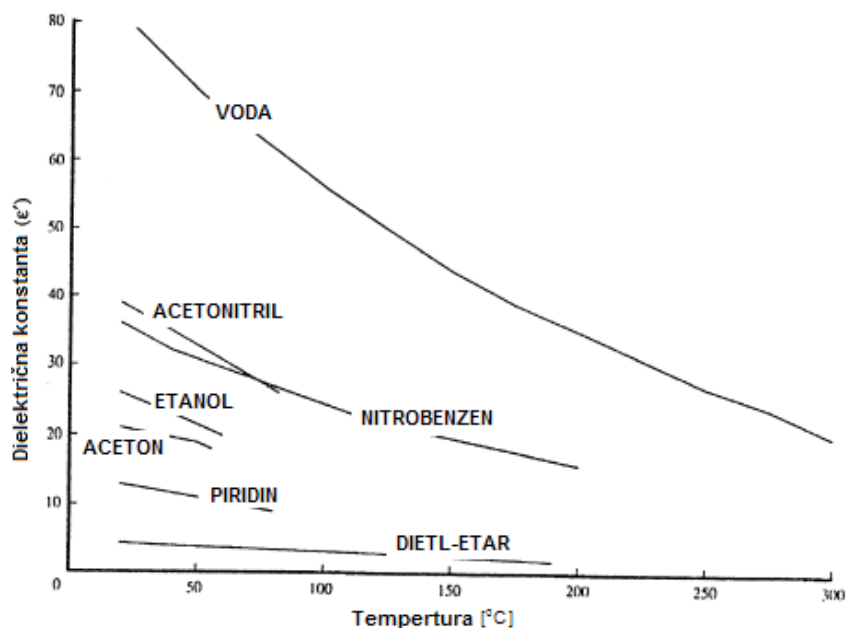
Pored fizičkih osobina sadržaja reakcionih posuda i njihovih zapremina, na uniformnost i uspešnost zagrevanja presudan uticaj imaju i fizičke osobine, geometrija molekula reaktanata, priroda rastvarača, ali i zapremina same reakcione posude. Dramatične posledice mogu biti izazvane korišćenjem većih ili manjih zapremina od onih koje je preporučio proizvođač mikrotalasne aparature.

EFEKAT PREGREVANJA

Relaksaciono vreme τ definiše se kao vreme potrebno da se molekul vrati u svoje polazno stanje nakon prestanka delovanja električnog polja. Ono zavisi od temperature i povećava se s opadanjem temperature. Pošto i ϵ' i ϵ'' zavise od τ sposobnost rastvarača da pretvara mikrotalasnu energiju u toplotu neće zavisiti samo od frekvencije nego i od temperature. Stoga, organski rastvarač sa relaksacionim vremenom >65 ps ozračen sa 2.45 GHz imaće tangenski gubitak koji se povećava s temperaturom. Stepem zagrevanja za ovakve rastvarače će rasti u toku mikrotalasnog dielektričnog zagrevanja, najverovatnije zbog ograničavanja formiranja „ključajućih jezgara”. Ovaj efekat je opisan kao „efekat pregrevanja” i može se manifestovati povećanjem tačke ključanja rastvarača čak i za više od 26°C u odnosu na njihove konvencionalne vrednosti. U čistom rastvaraču viša tačka ključanja može biti održana za vreme dok traje mikrotalasna radijacija. Supstrati, molekuli ili joni prisutni u rastvaraču će ipak pomagati formiranje „ključajućih jezgara” i temperatura će eventualno biti vraćena na normalnu tačku ključanja rastvarača. Za „efekat pregrevanja” se veruje da je odgovoran za mnoge stepene povećanja temperature medijuma koji često prate faze rastvaranja mikrotalasno katalizovanih reakcija na atmosferskom pritisku.

RASTVARAČI U MIKROTALASNO KATALIZOVANIM ORGANSKIM SINTEZAMA

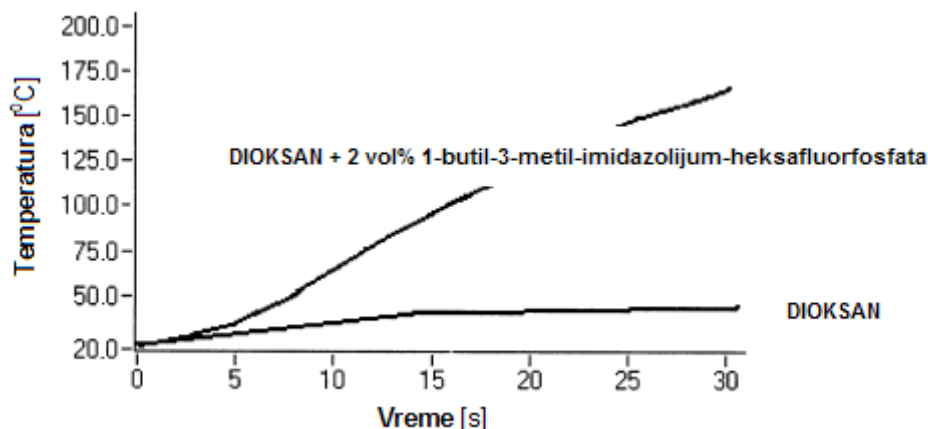
Pošto je frekvencija većine mikrotalasnih aparatura postavljena na 2.45 GHz, dielektrična konstanta se može menjati samo sa temperaturom. Kada je rastvarač zagrejan dielektrična konstanta se smanjuje sa povećanjem temperature. Voda poseduje dielektričnu konstantu koja se smanjuje sa 78 (na 25°C) na 20 (na 300°C) (Slika 2.14.), stoga se voda ponaša kao pseudo-organski rastvarač na povišenoj temperaturi, ali ova osobina je validna samo u sistemima pod pritiskom.



Slika 2.14. Zavisnost dielektričnih konstanti različitih rastvarača od temperature

Ranije je pomenuto da se nepolarni rastvarači ne zagrevaju pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. Dodatak male količine polarnog rastvarača, sa velikim tangensom gubitka, ipak obično vodi ka većem stepenu zagrevanja za celu smešu. Transfer energije između polarnih molekula, koji je posledica mikrotalasnog zračenja, i nepolarnih veoma zastupljenih molekula rastvarača je brz. Ovaj metod obezbeđuje efektivan način upotrebe nepolarnih rastvarača u mikrotalasnoj organskoj sintezi. Drugi način povećanja stepena zagrevanja jeste dodatak soli rastvaraču. Nažalost, problem rastvorljivosti soli kod većine organskih rastvarača rezultuje stvaranjem heterogenih smeša. U mikrotalasno-asistiranoj sintezi homogene smeše su poželjne za obezbeđivanje ravnomernog zagrevanja. Jonske tečnosti se pojavljuju kao nove ekološki prihvatljive i pogodne za reciklovanje alternative dipolarnim aprotičnim rastvaračima za organske sinteze. Izvanredne dielektrične osobine ovih jonskih tečnosti (tečnosti koje su potpuno sastavljene od jona) obezbeđuju velike mogućnosti kada se upotrebe kao rastvarači u mikrotalasno katalizovanim organskim sintezama.

Jonske tečnosti absorbuju mikrotalasno zračenje na veoma efikasan način i pokazuju veoma nizak pritisak pare što je pogodno za njihovu upotrebu kada se vrši mikrotalasno zagrevanje. Za razliku od soli koje imaju relativno malu rastvorljivost u organskim rastvaračima neke jonske tečnosti su rastvorne u većini nepolarnih organskih rastvarača i mogu biti upotrebljene kao mikrotalasno kuplujući agensi kada su mikrotalasno transparentni rastvarači upotrebljeni (Slika 2.15.).



Slika 2.15. Uticaj dodatka jonskih tečnosti na povećanje temperature dioksana na 300 W mikrotalasnog ozračivanja

2.5.2.3. UBRZAVANJE HEMIJSKIH REAKCIJA MIKROTALASNIM OZRAČIVANJEM

Osnovna prednost upotrebe mikrotalasa u organskim sintezama je skraćenje reakcionog vremena. Brzina reakcije može biti opisana preko *Arrhenius*-ove jednačine date u poglavlju 2.5.1.1.2.. Postoje dva puta za povećanje brzine hemijske reakcije pod dejstvom mikrotalasa. Prvi, povećanjem pre-eksponencijalnog faktora *A*, koji opisuje mobilnost molekula i mogućnost molekulskih sudara i koji zavisi od vibracione frekvencije molekula reaktanta u reakcionoj sredini i drugi put je mikrotalasnim zračenjem izazvana promena u eksponencijalnom faktoru koja doprinosi sniženju energije aktivacije, ΔG .

U većini slučajeva „specifični efekti mikrotalasa” uvedeni su kao pojam koji se koristi u reakcijama kada se ishod reakcije izvedene upotrebom mikrotalasnog zagrevanja razlikuje od ishoda termički zagrevanog uzorka, ali su ukupni efekti u reakciji pripisani i termičkim efektima. Mikrotalasno zagrevanje može biti veoma brzo i proizvodi profile zagrevanja koji nisu lako ostvarivi drugim tehnikama zagrevanja. Eksperimenti izvedeni pod dejstvom mikrotalasa mogu takođe rezultovati različitim ishodom kada se porede sa konvencionalno zagrevanim reakcijama, čak i ako je konačna temperatura ista. Ovo ukazuje na to da profil zagrevanja može uticati na regioselektivnost.

U oskudnije dizajniranim monomodnim sistemima može se naići na „vruće tačke”, koje su generalno problem u multimodnim sistemima. U ovim sistemima može doći do lokalnog povećanja temperature koja je onda veća nego temperatura merena u ostatku reakcione sredine. Tako ovaj „superzagrevajući efekat” može takođe rezultovati temperaturama mnogo višim od očekivanih, kada se izvode refluks reakcije u mikrotalasnim aparaturama. Ovi efekti ponekad mogu dovesti do neočekivanih tokova reakcije. Dodatno, preciznost merenja temperature može posatati problem, naročito kada se reakcije izvode u pećnicama za domaćinstvo ili na čvrstim nosačima.

2.5.2.4. TEHNIKE MIKROTALASNO KATALIZOVANIH SINTEZA

A. KUĆNE MIKROTALASNE PEĆNICE – „SOLVENT-FREE” REAKCIJE, ODNOSNO REAKCIJE BEZ PRISUSTVA RASTVARAČA U OTVORENIM POSUDAMA

Velik broj ranijih publikacija se odnosio upravo na upotrebu kućnih mikrotalasnih aparata kao hemijskih reaktora, a osnovni razlog je bio dostupnost i niska cena pećnica. Ovaj tip eksperimenata je povezan sa prilično velikim rizikom za eksperimentatora i dovodio je do velikog broja incidenata, uključujući i eksplozije. Jedan od načina za prevazilaženje ovih problema je izostavljanje rastvarača u reakciji i izvođenje reakcije na čvrstim nosačima kao što su aluminijum- i silicijum-oksidi ili celit. Na ovaj način izvedene su veoma interesantne sinteze, a „solvent-free” tehnika postaje sve značajnija kako iz ekoloških razloga tako i zbog samog izbegavanja upotrebe rastvarača kao i obezbeđivanja jednostavnijih metoda obrade. Ipak, pored ovih prednosti činjenica je da upotreba rastvarača nemože biti u potpunosti izbegnuta-oni su neophodni kako za nanošenje supstrata na nosače tako i za ispiranje proizvoda sa njih. Lakša obrada se može očekivati ako nosač koji učestvuje u reakciji može biti uklonjen iz reakcione smeše jednostavno filtracijom. Međutim, moguć je i jak uticaj čvrstog nosača na ishod reakcije.

Pored toga, može biti veoma teško obezbediti dobru kontrolu temperature na čvrstoj površini kada se ova tehnika koristi. Ovo vodi problemima u predviđanju reakcionog ishoda, njene reproduktivnosti i kontrolisanja.

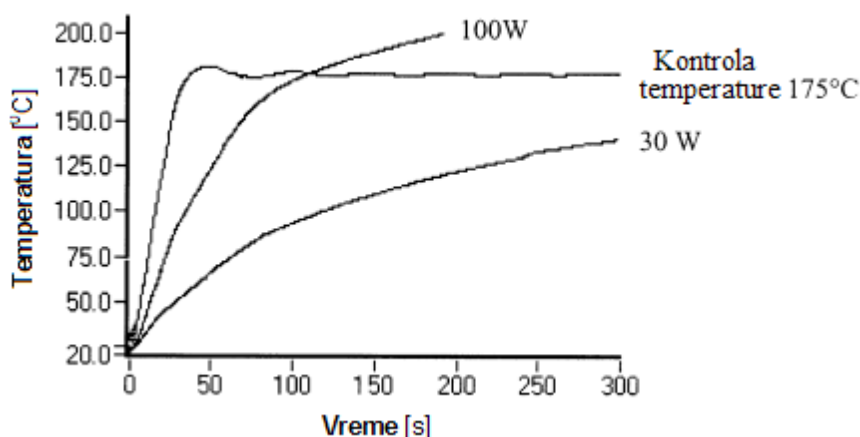
Ipak, postoje i druge prednosti upotrebe „solvent-free“ metode, kao što je povećanje bezbednosti, izbegavanjem upotrebe rastvarača niskih tačaka ključanja koji uzrokuju nepoželjno povećanje pritiska u toku zagrevanja.

B. REFLUKS SISTEMI

Da bi se omogućila upotreba rastvarača u mikrotalasno angažovanim organskim sintezama bez opasnosti od eksplozije razvijen je izvestan broj refluks sistema. Rizik od eksplozije kod refluks sistema je mali dok je sistem na atmosferskom pritisku i dok zapaljive pare ne dospevaju u unutrašnjost mikrotalasnog reaktora. Ipak, temperatura nemože biti povećana za više od 13-26⁰C u odnosu na normalnu tačku ključanja rastvarača i to samo za ograničeno vreme. Iako će ovaj „efekat pregrevanja”, naravno, ubrzati reakciju do nekog stepena, to neće rezultovati istim efektima koje bi mogli očekivati na mnogo višim temperaturama.

C. SISTEMI POD PRITISKOM

Mikrotalasne aparature u kojima se reakcije izvode pod pritiskom su takođe korisne za postizanje brzog i ravnomernog dielektričnog zagrevanja. Ipak, nemogućnost kontrole može učiniti ove eksperimente veoma nepredvidivim i rezultovati eksplozijama. U današnje vreme, moderne aparature prevazilaze ove probleme. Većina aparatura je opremljena uređajima za dobru kontrolu temperature i merenje pritiska, čime se izbegavaju mnogi neuspesi usled termičkog toka reakcija i slabog zagrevanja (Slika 2.16.). Ova tehnika obezbeđuje jednostavno izvođenje brzih sinteza ali do sada nije dovoljno iskorišćena.



Slika 2.16. Različiti temperaturni profili DMF-a zagrevanog uz temperaturnu kontrolu i kontrolu primenjene mikrotalasne snage

D. KONTINUALNI PROTOČNI SISTEMI

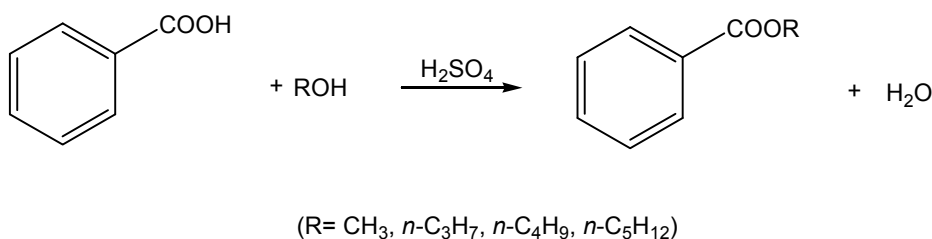
Kada se radi sa zapreminama >500 mL upotrebljavaju se kontinualni protočni sistemi u kojima se reagensi ubrizgavaju pomoću pumpi u unutrašnjost reaktora, dozvoljavajući tako porcijama uzorka da budu ozračeni u to vreme. Tako je moguće obezbediti isti profil zagrevanja, čak i za sinteze na velikim skalama. Osnovni problem je taj što neke supstance nisu rastvorne pre ili nakon mikrotalasnog ozračivanja i mogu izazvati zaustavljanje protoka blokiranjem ubrizgavača²⁸.

2.5.3. MIKROTALASNO KATALIZOVANE SINTEZE ESTARA

2.5.3.1. MIKROTALASNE SINTEZE ESTARA U HOMOGENOM MEDIJUMU

Mikrotalasno katalizovane reakcije u homogenom medijumu (bilo korišćenjem nerazblaženih reagenasa "bez rastvarača" ili u prisustvu rastvarača) izvode se uglavnom pri povišenom pritisku, u zatvorenim teflonskim ili staklenim posudama, zbog činjenice da većina dostupnih radova pokazuje da je povećanje brzina ovih reakcija u mikrotalasnim reaktorima na atmosferskom pritisku (u otvorenim ili refluks sistemima) malo ili da čak i ne postoji.

Pritisak se generiše u reakcionom sudu pa stoga i ubrzanje reakcije zavisi od faktora kao što su nivo primenjene mikrotalasne snage, isparljivost rastvarača, dielektrični gubitak reakcione smeše, veličina posude i zapremina reakcione smeše. Utvrđeno je da se pri esterifikaciji benzojeve kiseline sa serijom alifatičnih alkohola, u zatvorenim teflonskim posudama, najviše povećava brzina pri esterifikaciji sa metanolom, najisparljivijim rastvaračem²⁹.



Ubrzanje reakcije esterifikacije benzojeve kiseline sa metanolom bilo je blizu 100 puta, u odnosu na klasično zagrevanje uz refluks. S druge strane, ubrzanje esterifikacije sa *n*-pentanolom, uz upotrebu istog nivoa snage MT od 560 W, bilo je samo 1.3 puta. Reakciona temperatura je bila skoro ista za oba alkohola (134⁰C i 137⁰C). Treba naglasiti, međutim, da se stepen ubrzanja za esterifikaciju u pentanolu povećao 6 puta kada je upotrebljen veći nivo snage (630 W) a i da je tada reakciona temperatura postala viša (162⁰C).

Interesantno je naglasiti da je u slučaju reakcije sa pentanolom (t_k 138⁰C), kada su temperature reakcije uz mikrotalasno i konvencionalno zagrevanje bile skoro iste, postojala veoma mala razlika u reakcionim brzinama, što sugerise da brzina reakcije zavisi pre od reakcione temperature nego od načina zagrevanja.

Sinteze estara u mikrotalasnim uslovima su rađene i korišćenjem *Mitsunobu*-ovog protokola³⁰, koji podrazumeva kondenzaciju alkohola sa različitim kiselinskim nukleofilima potpomognutu trifenilfosfinom i dietil- ili diizopropilazodikarboksilatom (TPP, DEAD ili DIAD; *Mitsunobu*-ovi reagensi).

Osnovni nedostatak *Mitsunobu*-ove reakcije je faza prečišćavanja, koja zahteva pažljivu hromatografiju za odvajanje proizvoda od mnogih nuz-proizvoda ovih transformacija (trifenilfosfin oksid, hidrazid, višak alkohola itd.). Za prevazilaženje ovog problema ispitivana je mogućnost upotrebe fluorovanih *Mitsunobu*-ovih reagenasa (F-TPP, F-DIAD). *Mitsunobu*-ovi reagensi vezani za polimerni nosač, grade heterogene reakcione smeše i vode ka sporijim reakcijama, dok su fluorovani *Mitsunobu*-ovi reagensi rastvorni u većini organskih rastvarača (THF, CH₂Cl₂ ili MeOH) dajući tako homogene reakcione uslove, pa se očekivalo da bi i izolovanje proizvoda moglo biti lakše. Međutim, iako je upotreba fluorovanih *Mitsunobu*-ovih reagenasa dovela do željene konverzije u prinosu od oko 80% (HPLC), prinos izolovanog proizvoda je bio oko 40%. Dalja istraživanja su se odnosila na proučavanje reaktivnosti F-*Mitsunobu*-ovih reagenasa. U tu svrhu eksperimenti su izvedeni sa klasičnim *Mitsunobu*-ovim reagensima (TPP/DIAD) i estar je izolovan u prinosu od 75%, zatim sa F-TPP/DIAD pri čemu je dobijeno oko 71% proizvoda i konačno sa TPP/F-DIAD što je dovelo do samo 49% prinosa željenog estara. Autori zaključuju da F-DIAD ima znatno manju reaktivnost u ovim esterifikacijama od standardnog DIAD. Produžavanje reakcionog vremena, kao ni izvođenje reakcije na sobnoj temperaturi uz konvencionalno zagrevanje nije dalo veće prinose.

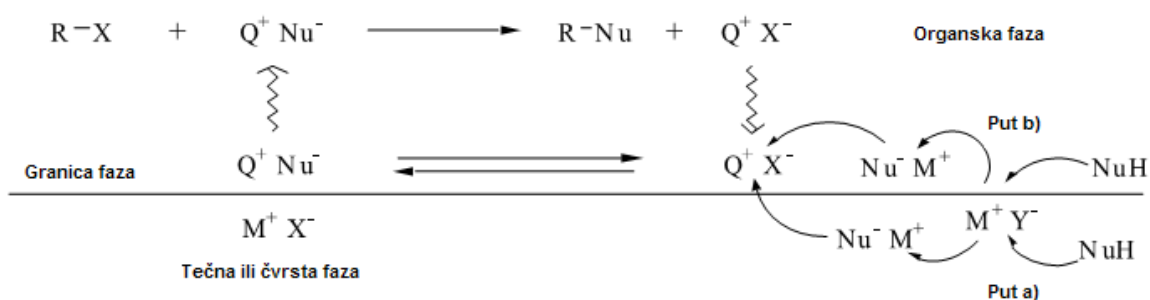
Pošto nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati preko F-*Mitsunobu*-ove reakcije Desai i saradnici su se vratili pronalaženju optimalnih reakcionih uslova za dobijanje željenih estara upotrebom klasičnih *Mitsunobu*-ovih reagenasa. Najbolji rezultati (do 99% prinosa) su dobijeni upotrebom TPP/DIAD, u THF kao rastvaraču, na sobnoj temperaturi, za 0.5-10 minuta.

2.5.3.2. MIKROTALASNE SINTEZE ESTARA U PRISUSTVU FAZA-TRANSFER KATALIZATORA

Ovo je tehnika u kojoj su reagensi prisutni u dve odvojene faze, tečna-tečna ili čvrsta-tečna. Pošto su faze međusobno nerastvorne, jonski reagensi (soli, baze ili kiseline) su rastvarani u vodenoj fazi dok je supstrat ostajao u organskoj fazi (tečna-tečna PTC). U sistemu čvrsto-tečno PTC, jonski reagensi mogu biti upotrebljeni u njihovom čvrstom stanju suspendovani u organskom medijumu. Transport anjona iz vodene ili čvrste faze u organsku fazu, gde se reakcija odigrava, obezbeđen je

upotrebom katalitičkih količina liofilnih agenasa, najčešće kvaternarnih -onijum soli ili katjon-kompleksirajućih agenasa, kao što su kruna etri. Zato što reakcije ne napreduju ili veoma sporo teku bez prisustva katalizatora, katalizatori faznog transfera su se pokazali kao najvažniji u ekstrakciji reakcionih vrsta između faza tako da reakcija može da napreduje, povećavajući tako značajno i prinose i brzine reakcija.

Uopšteno, pod PTC uslovima, tri tipa katalitičkih procedura mogu biti primenjena (Shema 2.9.).



Tipovi katalitičkih sintetskih shema uz faza transfer katalizatore

Shema 2.9.

- A. Tečna-tečna PTC u kojoj su neorganski anjoni ili anjonske vrste generisane iz relativno jakih organskih kiselina, locirani u vodenoj fazi reaguju sa organskim jedinjenjima u tečno-tečnom dvofaznom sistemu prelaženjem u organsku fazu u obliku jonskih parova, intervencijom katalizatora faznog transfera, koji kontinualno prenosi anjonske vrste iz vodene u organsku fazu, u kojoj se reakcija odigrava (Shema 2.9.; Put a)).
- B. Tečno-tečni PTC uslovi u kojima slabe organske kiseline reaguju u prisustvu koncentrovanog vodenog rastvora natrijum- ili kalijum-hidroksida koji je u kontaktu sa organskom fazom koja sadrži neki anjonski prekursor i organske reaktante. Anjoni su stvoreni na faznoj granici i kontinualno se uvode, sa katjonima katalizatora u organsku fazu, u kojoj se dalje reakcija odigrava (Shema 2.9.; Put b)).
- C. Čvrsto-tečni PTC uslovi u kojima se nukleofilne soli (organske ili mineralne) prenose od čvrstog stanja (pošto su nerastvorne) do organske faze na način agenasa faznog transfera. Najčešće organske nukleofilne vrste mogu biti formirane reakcijom njihovih konjugovanih kiselina sa čvrstim bazama (natrijum- ili kalijum-hidroksidima ili kalijum-karbonatom) (Shema 2.9.; Put b)). Drugi predloženi mehanizam sugeriše da se međufazna reakcija odigrava kao rezultat absorpcije tečne faze na površinu čvrste.

Organska faza može biti nepolarni organski rastvarač npr. benzen, toluen, heksan, dihlormetan ili hloroform, ili može biti nerazblaženi tečni supstrat, obično elektrofilni reagens, koji je ujedno i reaktivni supstrat i tečna faza.

U hemijskim sintezama pod dejstvom mikrotalasnog zračenja neophodno je ispuniti velik broj zahteva kako bi se izvele reakcije u odsustvu rastvarača. U takvim sistemima, mikrotalasi interaguju direktno sa reagensima i mogu, stoga, učiniti hemijske reakcije

mnogo efikasnijim. Ubrzavanje nekih reakcija može biti optimalno jer one nisu ometane od strane rastvarača.

Reakcije na čvrstim mineralnim nosačima zbog interakcija mikrotalasa sa reagensima na površini čvrste faze koja može značajno povećati brzinu reakcija, su od posebnog interesa.

O-ALKILOVANJE KISELINA

Kalijum-acetat može lako biti alkilovan u „*domestic*” mikrotalasnoj pećnici upotrebom ekvivalentnih količina soli i alkilujućeg agensa u prisustvu *Aliquat 336* (10 mol%; *Aliquat 336* je $n\text{Oct}_3\text{N}^+\text{Me Cl}^-$). Neki važni rezultati, na primeru ove reakcije prema dati su u tabeli 2.6.

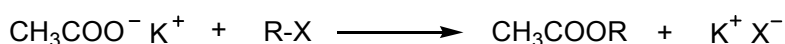


Tabela 2.6. Alkilovanje $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{K}^+$ pod uticajem MT i PTC katalizatora; „*domestic*” peć (600 W)

RX	Vreme [min]	Finalna temperatura [$^{\circ}\text{C}$]	Prinos [%]
<i>n</i> -C ₈ H ₁₇ Br	1	187	98
<i>n</i> -C ₈ H ₁₇ Cl	1	162	98
<i>n</i> -C ₈ H ₁₇ I	2	165	92
<i>n</i> -C ₁₆ H ₃₃ Br	1	169	98

Prinosi su uvek skoro kvantitativni u toku 1-2 min., bez obzira na dužinu alkil-niza i prirodu halogena kao odlazećih grupa.

Alkilovanjem kalijum-acetata sa halogenidima dugog alkil-niza³¹, pod dejstvom mikrotalasa dobijeni su kvantitativni prinosi estara za veoma kratko vreme (1-2 min.) bilo da je reakcija izvedena u „suvim” uslovima sa reagensima nanetim na aluminatne ili u uslovima čvrsto-tečne PTC katalize bez prisustva rastvarača.

Isti uslovi primenjeni na kalijum-benzoat daju manje prinose kada se koriste reagensi naneti na aluminatne (47%) nego kada se primene PTC uslovi (99% za 5 min.). Reaktivnost benzoatnog anjona može biti limitirana kiselosti benzojeve kiseline ili njegovom nukleofilnošću.

2.5.3.3. MIKROTALASNE SINTEZE I HETEROGENA KATALIZA

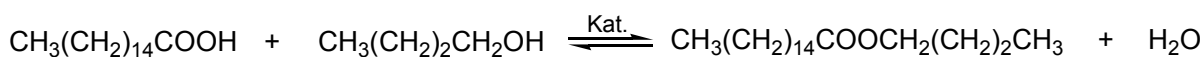
Mehanizam heterogeno katalizovanih procesa nije još u potpunosti razjašnjen. U ovim katalitičkim procesima, u prisustvu mikrotalasnog polja, katalizator se ponaša kao „konvertor” energije. Da bi mikrotalasno zagrevanje bilo uspešno u katalitičkim sistemima sam katalizator mora absorbovati mikrotalasnu energiju. Većina katalitičkih nosača kao što su metali, metalni oksidi itd. absorbuju ovu energiju, ali neki nosači kao silikati i aluminati nemaju tu osobinu. Aktivacija može biti posledica superzagrevanja katalizatora ili selektivnog zagrevanja aktivnih vrsta, što nemože biti postignuto konvencionalnim zagrevanjem.

Interakcija mikrotalasa sa čvrstim materijalima je značajna za pripremanje i aktivaciju heterogenih katalizatora. To sugeriše da mikrotalasno ozračivanje može modifikovati

katalitičke osobine čvrstih katalizatora, što rezultuje povećanjem brzine hemijskih reakcija. Evidentno je da se na ovaj način modifikuju katalizatori, ali vrlo često to dovodi do povećane selektivnosti. Priprema katalizatora obično uključuje impregnisanje nosača rastvorom aktivnih metalnih soli. Impregnisani nosač se tada suši, kalciniše da se razloži metalna so i zatim aktivira katalizator. Mikrotalasi se koriste u svim ovim fazama pripreme ovakvih katalizatora. Na ovaj način se formiraju stabilne čvrste strukture na niskim reakcionim temperaturama sa neobično velikim aktivnim površinama, čineći ih tako vrlo korisnim katalizatorima ili nosačima katalizatora. Kalcinisanje čvrstih prekursora u mikrotalasnom polju je mnogo efikasnije nego priprema katalizatora pri konvencionalnom zagrevanju.

Najčešće korišćeni heterogeni katalizatori na površini zeolita (*NaZSM-5*, *NaY*, *NaBeta*) i aluminata sadrže različite neorganske soli ili okside (npr. CuCl_2 , NiCl_2 , AuCl_3 , RuCl_3 , itd.) koji su veoma aktivni u NO_x razgradnji; MgO i KF veoma efikasni za dehidrogenizaciju 2-propanola i izomerizaciju *cis*-2-butena itd.).

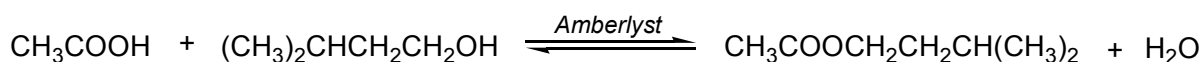
Ispitivana je brzina esterifikacije stearinske kiseline sa butanolom, kao model reakcije za poređenje razlika između homogeno i heterogeno katalizovanih reakcija.



Poznato je da je reakcija u mikrotalasnim uslovima brža nego kada se zagrevanje vrši na konvencionalan način, uz upotrebu heterogenih katalizatora. Prinosi su jako povećani: 50-82% za konvencionalno zagrevanje, ali čak i do 95% za mikrotalasno zagrevanje, kada je upotrebljen heterogeni katalizator. Katalizatori $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, TiBu_4 , KF , KSF i *p*- TsOH su upotrebljeni u reaktoru sa kontinualnim protokom, uz istovremenu upotrebu grafitnog regulatora zagrevanja i ultrazvuka. Bolji rezultati pod mikrotalasnim uslovima primećeni su, takođe, i u drugim esterifikacionim reakcijama stearinske i sirćetne kiseline u prisustvu heterogenog katalizatora ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) adsorbovanog na površini katjonskog jonoizmenjivača, prečnika zrna od 4-5 mm. Brzina reakcije je povećana za 50-150% u poređenju sa konvencionalnim zagrevanjem. Ovo povećanje je najverovatnije posledica superzagrevanja voluminoznih zrna (5 mm) a temperatura s kojom se kalkuliše viša je za 9-18^oC od temperature okoline.

Kada je esterifikacija bila homogeno katalizovana sa sumpornom kiselinom, koristeći pri tom oba načina zagrevanja, nisu primećene velike razlike u prinosima i brzinama reakcija.

Efekat koji zavisi od načina zagrevanja proučavan je i u heterogeno katalizovanoj esterifikaciji sirćetne kiseline sa izopentil-alkoholom, u prisustvu *Amberlyst-15* katjonske izmenjivačke smole kao katalizatora:



Pošto reakcija počinje protonovanjem karbonilne funkcije, očekuje se da reaktivne vrste budu lokalizovane na površini kiselog katalizatora izloženoj mikrotalasnom zračenju. Heksan, kao nepolarni rastvarač, je bio upotrebljen da bi se smanjila absorpcija i superzagrevanje od strane rastvarača. Eliminisanje superzagrevanja katalizatora u reaktoru sa kontinualnim protokom najverovatnije je razlog što značajnije razlike u

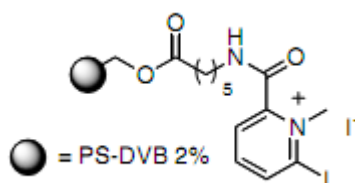
brzinama reakcija pod dejstvom mikrotalasa i konvencionalnog zagrevanja nisu primećene.

Slični rezultati su dobijeni pri esterifikaciji sirćetne kiseline sa 1-propanolom, izvedenoj u prisustvu heterogenog silikatnog katalizatora. Proučavanjem reakcija esterifikacije različitih karboksilnih kiselina i reakcija transesterifikacija metil-estara³² sa većim brojem alkohola, u prisustvu različitih čvrstih kiselih nosača (*Spherosil-S*, *Zeolit 13X*, *Amberlyst-15*) na koje se nanose karboksilne kiseline i čiste *p*-toluensulfonske kiseline kao katalizatora ili nanete na čvrste nosače (silikate ili aluminate) utvrđeno je da je daleko najbolji agens za pomeranje ravnoteže ovih reakcija u pravcu građenja estara *p*-toluensulfonska kiselina. Maksimalni prinosi su dobijeni pri upotrebi 0.5 ekvivalenata *p*-toluensulfonske kiseline (veće ili manje količine vode značajnom smanjenju prinosa). Takođe, kada se nanese na silikagel a još više kada je naneta na aluminate, *p*-toluensulfonska kiselina gubi aktivnost, pa i druge vrste nosača sulfonskih kiselina *Amberlyst-15* (polisulfonska kiselina joniizmenjivačka smola) i *Spherosil-S* (sulfonska kiselina naneta na silikat) vode ograničenim prinosima.

Bazne katalize u uslovima čvrsto-tečne katalize faznog transfera su efikasnije nego u prisustvu baza na nosačima: K_2CO_3 + *Aliquat* daje prinos 90% a KOH/aluminat samo 72% u reakciji metil-benzoata sa *n*-oktanolom.

Alkilovanje karboksilata je takođe efikasnije u PTC uslovima (korišćen je *Aliquat 336*; prinosi estara su kvantitativni čak i za manje od 2 min), nego kada se reakcije izvode kalijum-karboksilatima nanetim na aluminate.

2-Ilor-1-metilpiridinium jodid (*Mukaiyama* reagens) je jedan od najefikasnijih reagenasa za aktivaciju karboksilnih kiselina i „one-pot” dobijanje estara. Donati i saradnici³³ su opisali upotrebu 2-jod-1-metilpiridinium jodida nanetog na PS-DVB smolu kao polimerni nosač.



Slika 2.17. Katalizator *Mukaiyama*-tipa, na polimernom nosaču

Reakcije esterifikacije proučavane su i na složenijim supstratima kao što su npr. žučne kiseline³⁴ i D-glukonska kiselina³⁵. Rezultati eksperimenata na žučnim kiselinama ukazuju na to da je metansulfonska kiselina efikasna kao HCl, H_2SO_4 ili *p*-toluensulfonska kiselina za esterifikaciju a njena upotreba se preporučuje jer kao slabija kiselina izaziva manje degradacije reaktanata, nije skupa i kao rastvorna u vodi lako se uklanja prilikom obrade reakcione smeše ispiranjem sa vodom, izbegavajući pri tom upotrebu jakih baza (npr. NaOH, KOH, K_2CO_3) pri obradi, koje mogu transformisati labilne funkcionalne grupe u molekulu.

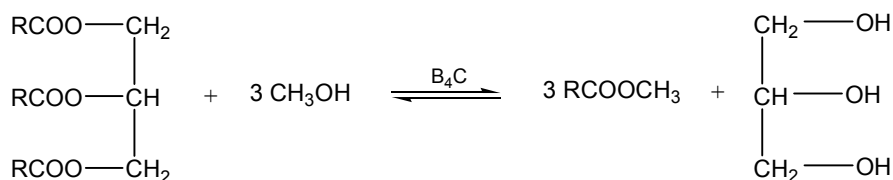
Osim za uspešne hemijske transformacije D-glukonske kiseline do etil D-glukonata, D-glukono-1,4- i 1,5-laktona, glukonil-hidrazida i glukonil-fenilhidrazida pod dejstvom

mikrotalasa, i mikrotalasno angažovana organska sinteza same D-glukonske kiseline efikasno je izvršena oksidacijom D-glukoze sa bromnom vodom.

Floridi karboksilnih kiselina u reakcijama sa različitim alkoholima, u prisustvu cezijum-florida nanetog na *Celit 521* (neutrani SiO_2) kao katalizatora³⁶, pod dejstvom mikrotalasa, u „*solvent-free*” uslovima, uspešno su korišćeni za dobijanje estara. Sve komponente reakcione smeše absorbuju mikrotalasnu energiju, međutim CsF, zbog svoje polarne prirode absorbuje više nego ostali reaktanti i proizvodi. Celit takođe deluje kao rezervoar toplote, što povećava katalitičku aktivnost CsF-celita. Fenoli reaguju brže od alkohola, zbog stabilnosti fenoksidnog anjona i kiselosti fenola. Polarna priroda supstrata takođe utiče na reakciono vreme i prinos proizvoda, polarniji supstrati absorbuju više mikrotalasne energije što rezultuje skraćanjem reakcionog vremena. Da bi se ispitao uticaj celita na ishod reakcija izvedeni su eksperimenti bez njegove upotrebe, pod istim reakcionim uslovima. Prinosi proizvoda su pri tom smanjeni za 20-30%, što jasno ukazuje na važnu ulogu celita u modifikaciji reaktivnosti cezijum-florida. Efekat CsF-Celita može biti aktivacija hidroksilne grupe fluoridnim jonom čiji jonski karakter je povećan usled slabog naelektrisanja katjona cezijuma i aktivacije acil-halidne grupe efektom tipa Lewisove kiseline.

Reakcije pod dejstvom mikrotalasa poređene su sa reakcijama izvedenim uz klasično zagrevanje, u acetonitrilu na 80-85⁰C. Sinteze uz mikrotalasno zagrevanje izvedene su u visokom prinosu u trajanju od nekoliko minuta, dok pri konvencionalnom zagrevanju sinteze su trajale i do 7 sati, uz istovremeno značajno niže prinose proizvoda.

Transesterifikacije triglicerida u metil-estre²⁹ efikasno su katalizovane sa borkarbidom (B_4C), i bile su brže pod mikrotalasnim uslovima, verovatno zbog superzagrevanja katalizatora, za kog je poznato da je veoma snažan absorber mikrotalasa. Prinos dobijenih metil-estara je bio veći od 98%.



Imajući u vidu industrijski značaj metil-estara masnih kiselina za dobijanje karboksilnih kiselina dugog niza, deterdženata, alternativnih goriva za dizel motore (Biodizel) i mono- i diglicerida koji se upotrebljavaju kao aditivi u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, posebno su ispitivane transesterifikacije prirodnih triglicerida, odnosno ulja i masti³⁷. Metil-estri masnih kiselina su sintetizovani konvencionalnim zagrevanjem i mikrotalasnim ozračivanjem. Katalitički testovi su sprovedeni u dvofaznom sistemu, u prisustvu $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, na različitim temperaturama i pritiscima. U odnosu na klasično zagrevanje, mikrotalasno ozračivanje se pokazalo kao brža metoda za reakcije alkoholize triglicerida sa metanolom koja vodi većim prinosima proizvoda. Rezultati katalitičkih testova, izvedenih pod dejstvom mikrotalasa, sa NaOH (u homogenoj fazi) ili sa $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (u heterogenoj fazi), su slični, ali prednost upotrebe $\text{Ba}(\text{OH})_2$ kao katalizatora je njegovo lakše uklanjanje i mogućnost njegovog reciklovanja. Homogene katalitičke transesterifikacije su, istovremeno, praćene dobijanjem nuz-proizvoda. Ta smanjena selektivnost jako povećava vreme potrebno za izolovanje proizvoda iz reakcione smeše. Da bi se to izbeglo upotrebljavaju se bazni heterogeni katalizatori kao što je $\text{ZnO}-\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Zn}-\text{Al}_2\text{O}_4$, ali pri klasičnim zagrevanjima za

povećanje reakcione brzine neophodno je raditi na visokim temperaturama i pritiscima. Ovi oštri reakcioni uslovi su visoko energetski zahtevni.

Opisane reakcije su izvedene bez prisustva rastvarača ali u odnosu metanol-ulje semena repe od 9 : 1, 18 : 1 i 30 : 1 što su definitivno veći odnosi nego stehiometrijski (3 : 1). Mikrotalasno zagrevanje je rezultovalo višim prinosom proizvoda (98%) u odnosu na klasično zagrevanje (81%), pa se kao prednosti mikrotalasno ozračivanih transesterifikacionih reakcija navodi kraće reakciono vreme, sprečavanje degradacije proizvoda i niža potrošnja energije.

Poređeni su i rezultati dobijeni u heterogenoj fazi sa rezultatima dobijenim u homogenoj fazi, za oba načina zagrevanja. Pri konvencionalnom zagrevanju, prinosi metil-estara masnih kiselina pri homogenoj i heterogenoj katalizi iznosili su 99.4% tj. 81%, respektivno. S druge strane, kada se koristi mikrotalasno zagrevanje dobijeni su slični prinosi i u prisustvu barijum- i natrijum-hidroksida (99% i 98.5%, respektivno), ali autori naglašavaju prednosti upotrebe heterogenih katalizatora i mikrotalasa kao što je kraće vreme reakcije i čist proizvod, znači jeftinija proizvodnja.

2.5.3.4. MIKROTALASNE SINTEZE ESTARA ENZIMATSKI KATALIZOVANE

Proteaze, subtilizin i α -himotripsin, katalizuju esterifikacije i transesterifikacije u organskim rastvaračima. Ne-termički efekti mikrotalasnog ozračivanja na ove reakcije ispitivani su održavanjem konstantne reakcione temperature u toku ozračivanja, upotrebom kontinualnog IR povratnog temperaturnog sistema. Reakcije su izvedene u šest rastvarača različite polarnosti i na tri temperature. U svim slučajevima mikrotalasno ozračivanje povećava brzinu reakcija 2-5 puta. Uočeno je da su toluen i *t*-amil-alkohol najbolji rastvarači za iskorišćenje mikrotalasnog učešća na povećanje brzine subtilizin-katalizovanih reakcija transesterifikacije *N*-acetil-L-fenilalanin etil-estra sa propanolom, dok je za α -himotripsin-katalizovane esterifikacije *N*-acetil-L-fenilalanina sa etanolom *n*-oktan bio najbolji rastvarač³⁸. Pokazalo se i da mikrotalasno ozračivanje može biti efikasno kombinovano i sa drugim strategijama, kao što je aktivacija solima ili pH-podešavanje. Autori zaključuju da povećanja reakcionih brzina, primećena kod mikrotalasno angažovanih reakcija nisu posledica samo termičkih efekata i da treba ispitati da li se i drugi enzimi ponašaju slično u toku mikrotalasno angažovanih reakcija.

2.5.4. MIKROTALASNE SINTEZE AMIDA

Interakcije materijal-mikrotalasi, kao što je to već ranije napomenuto, rezultuju termičkim mikrotalasnim efektima i usled dipolarnog polarizacionog fenomena, veća polarnost molekula npr. rastvarača izaziva efikasnije mikrotaladne efekte u pogledu povećanja temperature. Tako, specifični mikrotaladni efekat za datu reakciju mora biti razmatran i sa stanovišta reakcionog mehanizma i promene polarnosti sistema u toku napredovanja reakcije³⁹.

Specifični mikrotaladni efekti se mogu očekivati u polarnim reakcionim mehanizmima gde se polarnost u toku reakcije povećava od osnovnog ka prelaznom stanju. Oni tako mogu suštinski zavisiti od medijuma i reakcionog mehanizma. Ukoliko je stabilizacija prelaznog stanja efikasnija od stabilizacije osnovnog stanja, dolazi do povećanja reaktivnosti, zbog smanjenja energije aktivacije usled elektrostatičke interakcije polarnih molekula sa električnim poljem. Ustanovljena su dva puta nastanka prelaznih stanja

koja se objašnjavaju specifičnim mikrotalasnim efektima u slučaju neutralnih i jonskih nukleofila:

A. Reakcija neutralnih vrsta preko dipolarnog prelaznog stanja (Shema 2.10.):



Mehanizam nastajanja prelaznog stanja nukleofilnom adicijom amina

Shema 2.10.

Ovakav slučaj mikrotalasno katalizovane amidacije, pri „*solvent-free*” uslovima dat je na primeru reakcije benzil-amina sa različitim karboksilnim kiselinama (Tabela 2.7.).

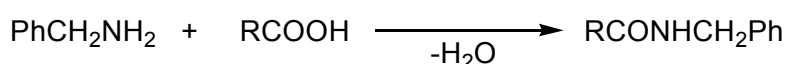
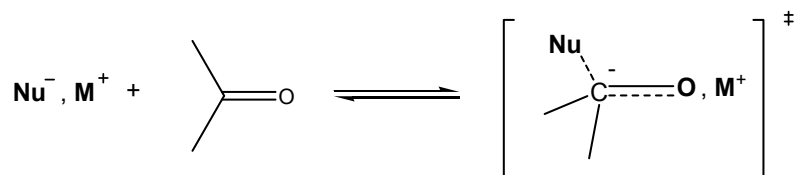


Tabela 2.7. Reakcija benzil-amina sa karboksilnim kiselinama na 150°C (30min)

R	Amin : Kiselina	Prinos [%]	
		MT	Δ
Ph	1:1	10	10
	1.5:1	75	17
	1:1.5	80	8
PhCH ₂	1:1	80	63
	1.5:1	93	40
	1:1.5	92	72
CH ₃ (CH ₂) ₈	1:1	85	49

Specifični mikrotalasni efekti u toku adicije amina na karbonilnu grupu su ovde od najvećeg značaja, posebno kada se ima u vidu da na 150°C voda može biti isto uklonjena pri oba tipa aktivacije.

B. Reakcija naelektrisanih nukleofila, koji su kao anjonske vrste više delokalizovani u prelaznom stanju i tako vode do više disosovanih jonskih parova (Shema 2.11.). Tipični primer dat je na aminolizi estera u baznoj sredini (Tabela 2.8.).



Mehanizam adicije jonskog para na karbonilno jedinjenje

Shema 2.11.

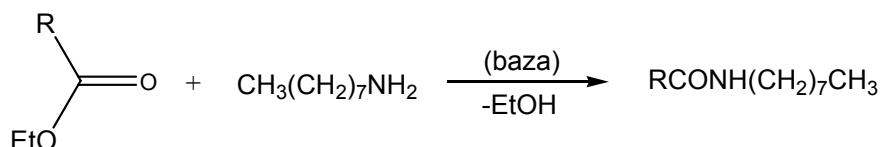


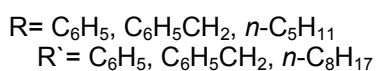
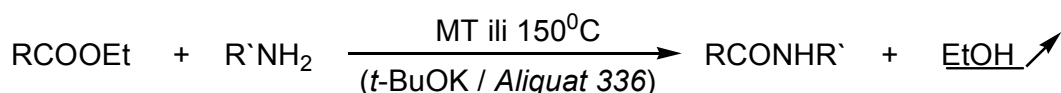
Tabela 2.8. Aminoliza estara sa *n*-oktilaminom na 150⁰C (10 min)

R	Baza	Prinos [%]	
		MT	Δ
Ph	-	0	0
	<i>t</i> -BuOK	80	22
	<i>t</i> -BuOK + <i>Aliquat</i>	87	70
PhCH ₂	-	63	6
	<i>t</i> -BuOK + <i>Aliquat</i>	63	36

Mikrotalasni specifični efekti su još izraženiji kada se reakcije izvode u prisustvu katalizatora faznog transfera (*Aliquat 336*), pokazujući tako da je priroda reaktivnih vrsta u smislu jonske disocijacije, odnosno modifikacije u polarnosti od ogromne važnosti za ishod reakcije.

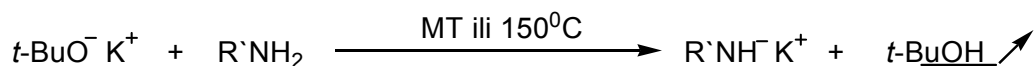
Aminoliza estara obično zahteva drastičnije reakcione uslove u smislu visokih temperatura i produženih reakcionih vremena ili upotrebe alkalnih metala kao katalizatora u uslovima koji nisu primenjivi na molekule koji sadrže osetljive funkcionalne grupe. Ranije objavljene direktne konverzije estara u amide obuhvatale su reagense kao što su natrijum-metoksid, litijumaluminijum-hidrid, natrijum-hidrid, metalni natrijum, butil-litijum, kalijum-amid, *Grignard*-ove reagense, bortribromid, mada njihova opšta primenjivost nije postignuta⁴⁰. Sinteze tercijarnih amida, naročito, i uprkos upotrebi aktiviranih amina (kalajem, aluminijumom, titanijum- ili litijum-amidima) nisu izvedene sa zadovoljavajućim ishodom. Zato je ispitivana mogućnost upotrebe mikrotalasnog ili ultrazvučnog asistiranja u „*solvent-free*” organskim transformacijama. Reakcije pri konvencionalnim uslovima, koje su zahtevale produženo reakciono vreme (3-16 h), izvedene su u „*domestic*” mikrotalasnim pećnicama za mnogo kraće vreme (1-7 min). Jednostavnom procedurom izvedena je uspešna „*solvent-free*” sinteza amida, iz amina i estara uz dodatak kalijum *terc*-butoksida.

Proučavana je i „*solvent-free*” aminoliza estara pod dejstvom mikrotalasa⁴¹ i to podstaknuta kalijum *terc*-butoksidom ili u odsustvu baze, u prisustvu ili bez prisustva agensa faznog transfera (*Aliquat 336*). Analogni reakcioni uslovi ispitivani su u reakcijama izvedenim u ili bez prisustva agensa faznog transfera (*Aliquat 336*).



Reakcije su izvedene na višoj temperaturi (150⁰C):

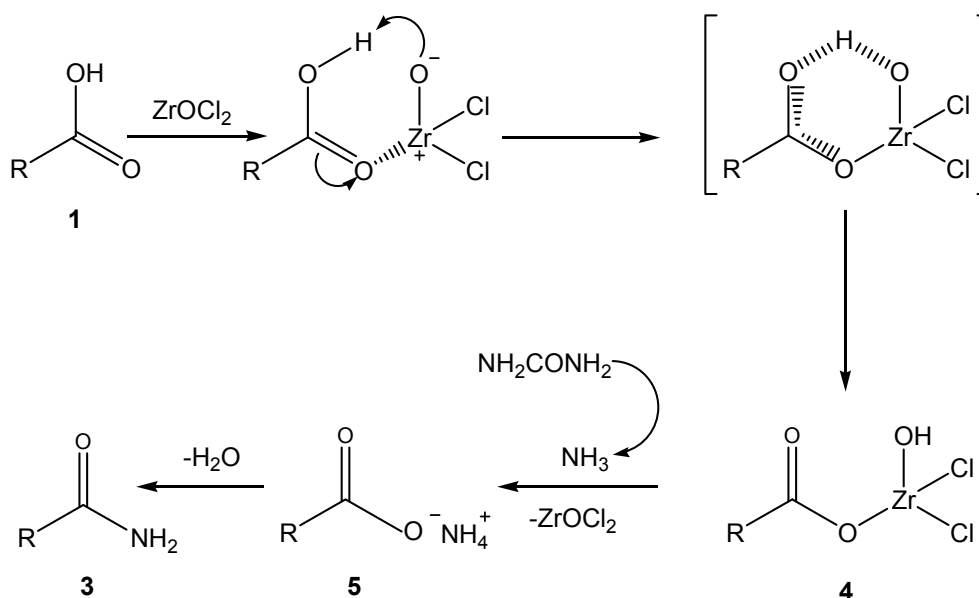
- da bi se sprečila reverzibilna reakcija (uklanjanje EtOH)
- da bi se obezbedilo formiranje kalijum amida (uklanjanje *t*-BuOH)



Pri klasičnom zagrevanju prisustvo agensa faznog transfera (*Aliquat 336*) znatno povećava prinose željenih proizvoda, a ovaj pozitivan uticaj *Aliquat*-a na konačan ishod reakcija je uočen i pri mikrotalasnom zagrevanju i rezultuje još boljim prinosima.

Primarni amidi su sintetizovani iz karboksilnih kiselina i uree u prisustvu imidazola⁴², pod dejstvom mikrotalasnog ozračivanja. Imidazol je upotrebljen zbog svoje sposobnosti da formira polarne soli karboksilnih kiselina za efikasnu absorpciju mikrotalasne energije. Niske tačke topljenja imidazolijum-karboksilata dovode do topljenja ovih soli nakon kratkog vremena ozračivanja i zagrevanja, pri niskim mikrotalasnim snagama što rezultuje homogenizacijom reakcione smeše u „*dry media*” uslovima. Umesto imidazola upotrebljene su i druge baze kao npr. 4-dimetilaminopiridin, trietilamin i 1,8-diazabiciklo[5,4,0]undec-7-en ali ni jedna od njih nije delovala tako dobro kao imidazol.

Istraživana je mogućnost primene soli prelaznih metala, kao što je $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, kao katalizatora u sintezi amidnih derivata, reakcijom karboksilnih kiselina sa ureom, u čvrstoj fazi⁴³. Potentnost ovog katalizatora osim u visokoj reaktivnosti leži i u njegovoj ne tako visokoj ceni, netoksičnosti i neškodljivosti po životnu sredinu, jednostavnom manipulisanju i mogućnosti reciklovanja. Pretpostavlja se da je formiranje soli cirkonijum-karboksilata **4** (Shema 2.12.) prvi korak u mehanizmu nastajanja proizvoda. Ova so može povećati absorpciju mikrotalasne energije i ovo povećanje energije može izazvati pirolizu uree i oslobađanje amonijaka. U sledećoj fazi cirkonijum se može zameniti sa amonijakom formirajući amonijum-karboksilat **5**, so koja eliminacijom vode gradi odgovarajući amid **3**.



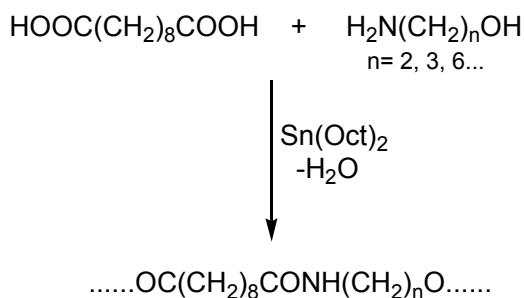
Mehanizam nastajanja amida katalizovano cirkonijum solima i mikrotalasima

Shema 2.12.

Reakcije nije bilo u odsustvu katalizatora čak ni nakon dužeg ozračivanja a upotreba manjih količina cirkonil-hloridnog katalizatora zahtevala je duže vreme za kompletiranje

reakcije. Primenom ove mikrotalasno-angažovane tehnologije na benzoevu kiselinu reakcija je izvedena za samo 30 s, na 80⁰C, sa prinosom od 91%, dok ista reakciona smeša pri konvencionalnom zagrevanju (3 h, 220⁰C) koje je odgovorno za degradacione procese daje nizak prinos proizvoda⁴¹.

Mikrotalasne sintetske metode našle su primenu i u sintezama polimera⁴⁴. Polikondenzacija sebacinske kiseline i ω -amino alkohola, u prisustvu kalaj 2-etil-heksanoata kao katalizatora (Sn(Oct)₂), se odigrava mnogo brže pod dejstvom mikrotalasnog zračenja nego u uslovima konvencionalne polikondenzacije na temperaturi topljenja reakcione smeše.



Niz amida je sintetizovan kombinacijom 6 različitih metil-estara sa različitim aminima. Ove mikrotalasno angažovane sinteze poređene su sa paralelnim konvencionalnim sintezama. Mikrotalasne sinteze jako smanjuju reakciono vreme sa nekoliko sati na nekoliko minuta.

Većina popularnih metoda za sintezu amida, kao što smo videli, podrazumeva konverziju karboksilne grupe u reaktivniju funkcionalnu grupu ili neku *in situ* aktivaciju upotrebom kuplujućih reagenasa⁴⁵. Međutim, iako oba postupka daju dobre rezultate, oni trebaju često skupe kuplujuće reagense, koji vode do formiranja nuz-proizvoda čije odvajanje je prilično komplikovano. S druge strane, većina amidacija je izvedena na visokim temperaturama (150-300⁰C) što predstavlja problem naročito kada reakcija uključuje termolabilna jedinjenja.

Preliminarne sinteze acetamida direktno, iz ne-aktivirane, sirćetne kiseline ili iz acetil-donora (acetil-hlorida ili različitih estara) i amina u odsustvu katalizatora i rastvarača, pri veoma blagim uslovima (25 W, za nekoliko sekundi do nekoliko minuta) su se pokazale kao veoma efikasne i često u skoro kvantitativnim prinosima.

Dalja istraživanja su se odnosila na ispitivanja mogućnosti primene mikrotalasnog ozračivanja niže snage (1-10 W) pošto je zahtevana temperatura (90⁰C) veoma brzo dostignuta. Treba naglasiti da je posle 30 min, pri snazi mikrotalasa od 1 W temperatura dostigla samo 80⁰C i da se reakcija nije ni odigrala⁴⁵. Reakcija je bila kvantitativna za 5-15 min. pri 3-25 W, a zahtevala je 2 h pri 2 W.

2.6. BIOLOŠKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA

Još 1921. godine je primećena fiziološka aktivnost alkalnih soli naftnih kiselina od strane Neuberg-a i Sandberg-a⁴⁸, kada je ustanovljeno povećanje aktivnosti nekih sojeva kvasca uz dodatak malih koncentracija natrijum-naftenata.

U kasnijem periodu je rađeno na ispitivanju fiziološke aktivnosti soli naftnih kiselina u agrohemiji, primenom na različitim poljoprivrednim kulturama kod kojih je zabeležen porast produkcije proteina u kukuruzu, pšenici, šećera u grožđu i slično. Stimulacija fizioloških procesa kod raznih vrsta biljaka je evidentna u velikom broju radova, bitno je napomenuti da se poslednjih godina intenzivno vrše ispitivanja koja se bave toksičnošću naftnih kiselina.

Dominantnu ulogu u kontroli morfogenetskih promena u toku života svake žive jedinice imaju fiziološki aktivne supstance. Kod biljaka to su fitohormoni ili endogeni regulatori rasta. Tu spadaju supstance koje pokazuju odgovarajuće stimulatívno ili inhibitívno dejstvo na odgovarajuće biohemijske procese. Posledica tih dejstava su promene morfoloških osobina i sinteza organskih materija u biljaka. Sve ovo može se iskoristiti u poljoprivrednoj proizvodnji radi uvećanja prinosa i dobijanja proizvoda određenog kvaliteta.

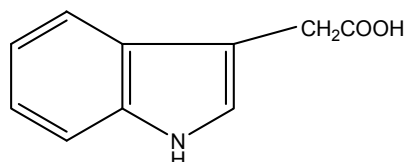
Fitohormoni stimulišu određene funkcije u ćeliji, aktiviraju oksido-redukzione procese u njoj, deluju u malim koncentracijama. Spektar delovanja im je širok i postoji mogućnost delovanja kod većeg broja biohemijskih procesa. Fitohormoni deluju promotorno u svim fazama razvoja biljke tako da se različitim hormonima reguliše klijanje, cvetanje, formiranje korena, izdanaka i plodova.

Fitohormoni se dele u pet osnovnih grupa:

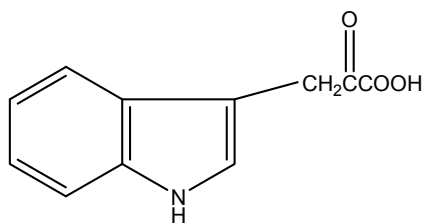
- auksini
- giberelini
- citokinini
- apscisini
- etilen

AUKSINI

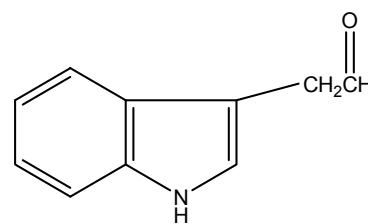
Njihovom otkriću doprineli su još radovi Darwina iz 1897. godine, a samo otkriće je učinjeno od strane Went-a⁴⁶ 1928. godine. Među prvim auksinima bila je identifikovana 3-indolsirćetna kiselina.



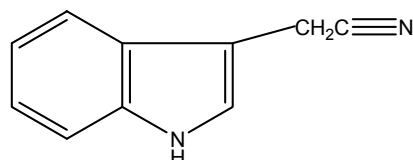
Pored 3-indolsirćetne kiseline u biljaka su do sada konstatovani prirodni auksini indolacetaldehid, indolacetonitril, indolpirogroždana kiselina itd..



3-Indolpirogroždana kiselina



3-Indolacetaldehid



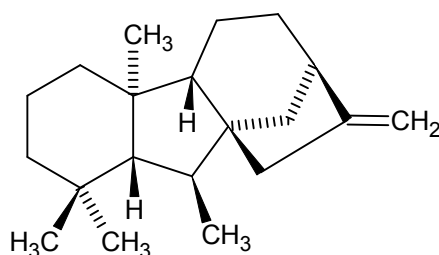
3-Indolacetonitril

Vrlo je značajno da egzogeno dejstvo pokazuju i neke sasvim druge supstance sintetičkog porekla, a to su: α -naftilsirćetna kiselina, cimetna kiselina, 2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina, benzotiazolsirćetna kiselina, α -hloro-(β -hloro-o-tolil)-propionitril, danas svi poznati kao „sintetički hormoni rasta”.

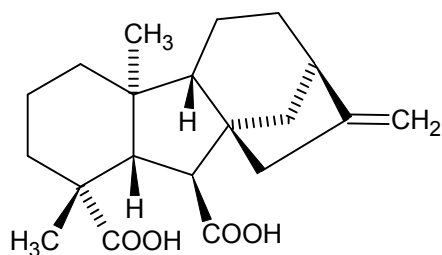
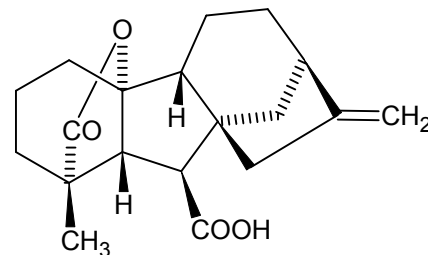
Prirodni i sintetički auksini kao i regulatori razvića i rasta biljaka u zavisnosti od koncentracije stimulišu ili inhibiraju rast, utiču na izduživanje, razvitak pupoljka, pojavu partenokarpije (polnosti organa), obrazovanje korena, opadanje lista i ploda tj. zrenje.

GIBERELINI

U Japanu 1926. godine otkrivena je druga grupa materija rasta od strane Kurosawa-e⁴⁷ i nazvana je giberelinima. To je značajna grupa biljnih hormona koja reguliše sazrevanje semena, klijanje, rast, izduživanje, cvetanje. Razlikuju se od drugih hormona po svom hemijskom sastavu i delovanju. Oni su grupa diterpenoidnih tetracikličnih kiselina sa zajedničkom *ent*-giberelanskom osnovom.



Prvi strukturalni giberelin je sa 20 C-atoma (GA_{12}), a drugi sa 19 C-atoma (GA_9) u molekulu.

GA₁₂GA₉

Giberelini u biljnom svetu uglavnom nisu u obliku slobodnih kiselina, već su vezani u glikozide ili estre. Za njih se zna da se nalaze u velikom broju biljaka i da kod njih regulišu fiziološke procese od klijanja do razvića i sazrevanja ploda. Nivo i odnos giberelina je specifičan za svaku biljku, a zavisi i od faze razvoja biljke i mesta sinteze. Sve strukture giberelina nisu isto aktivne, a neke su fiziološki neaktivne jer ne ispunjavaju zahteve potrebne za datu aktivnost.

Najistaknutiji fiziološki efekat giberelina je elongacija u svim delovima mladica biljka. Najčešći objekti za ispitivanje i praćenje ovih efekata su razni patuljasti mutanti („*Hipokotil test*“), ali se primenjuje i endosperm žitarica („*Endosperm test*“).

Clemente i saradnici¹¹ u svom radu iznose podatke o veoma izraženoj fiziološkoj aktivnosti. Naftenske kiseline u koncentracijama većim od 2.5-5.0 mg/L u ispitivanim ribnjacima toksične su za ribe. Dalje, laboratorijski eksperimenti Wort-a i Patel-a⁴⁹ su pokazali da naftne kiseline folijarno aplicirane na biljkama žbunastog pasulja stimulišu njihov rast, mnoge druge studije sa naftnim kiselinama pokazale su da imaju inhibitorne ili toksične efekte na niz biljnih i animalnih vrsta. U svakom slučaju ključ ekvilibrija između ova dva ekstremna zaključka je koncentracija kiselina.

Eksperimenti koji su vršeni u toku 1984. godine, od strane Dokholyan-a i Magomedov-a⁵⁰ na zooplanktonima pokazali su da su koncentracije od svega 0.15 mg/L granica za njihov opstanak, pa je ta koncentracija predložena kao maksimalno dozvoljena u vodama.

Ispitivanja na alergijske reakcije naftnih kiselina i njihovih metalnih soli su vršene na eksperimentalnim životinjama. Ispitivanje je vršeno u Osaki, Japanu na Institutu za zaštitu zdravlja i okoline. Senzitivnost kožnih reakcija je ispitivana kod zamorčića sa Co-naftenatom, Zn-naftenatom i slobodnim naftnim kiselinama, a rađen je GPMT („*Guinea Pig Maximization Test*“)⁵¹. Dobijeni rezultati su pokazali da je Co-naftenat najpotentniji kožni senzibilizator, zatim Zn-naftenat, a najmanji efekat imaju slobodne naftne kiseline.

Aplikacijom niskih koncentracija natrijum-naftenata (20 µmol/L) na veliki broj biljnih vrsta (pasulj, kukuruz, prolećna pšenica, šećerna repa) dobijeni su rezultati koji potvrđuju njihov pozitivan uticaj na vegetativne i reproduktivne procese⁵². Ovi eksperimenti dali su dodatne informacije u vezi uticaja naftenskih kiselina na fotosintezu praćenjem povećanja vrednosti za CO₂-fiksirajuće enzime kao što su fosfoenolpiruvat karboksilaza i ribuloza-1,5-difosfat karboksilaza. Takođe je indikovana fotosintetska efikasnost, respiratorni odgovor embriona semena pasulja potopljenih u rastvor natrijum-naftenata, kao i aktivnosti askorbat oksidaze koja je odgovorna za protok elektrona. Veći stepen fotosinteze u biljkama tretiranim naftenatima može biti posledica povećanog stepena

vezivanja CO₂, pa tako i veća fotosintetska efikasnost, a veća količina zaliha ATP-a nastaje zbog povećanja toka elektrona pri respiraciji, što prouzrokuje veći rast biljaka na koje su naftenati primenjeni.

Severson i saradnici⁵³ su utvrdili da kalijum-naftenati pospešuju preuzimanje glukoze preko vrhova korena kod mahunarki, a Loh i saradnici⁵⁴ su nastavili ova ispitivanja biološke aktivnosti kalijum-naftenata merenjem povećanja aktivnosti oksidaze indolsirćetne kiseline u biljkama, jednog od ključnih enzima u procesu iniciranja i aktiviranja korenskih primordija. Smeše naftenskih kiselina, kao i neke pojedinačne karboksilne kiseline cikloalkil karboksilnog tipa pokazuju stimulaciju rasta vegetativnog dela biljke (lišće, stabljika, koren) ali i reproduktivnog dela kao što su plod i seme kod velikog broja biljaka. Stimulacija rasta pasulja posledica je povećanog stepena fotosinteze i respiracije kao i veće aktivnosti fosforilaze, fosfoglicerat kinaze, nitrat reduktaze i glutamin-piruvat transaminaze⁵⁵. Aktivnosti katalaze u grožđu, peroksidaze i oksidaze askorbinske kiseline u pamuku su takođe uvećane nakon aplikacije niskih koncentracija vodenih rastvora naftenata⁵⁶. To sugerise da je stimulacija rasta biljaka u velikoj meri posledica visokog stepena povećanja protoka metaboličkih intermedijera i veće snabdevenosti energijom u vidu adenozin trifosfata.

To je navelo Wort-a i saradnike⁵⁶ da ispituju efekte kalijumovih soli naftenskih kiselina na sadržaj i aktivnost četiri enzima značajna za metabolizam azota (dehidrogenaza glutaminske kiseline, glutamin-oksaloacetat transaminaza, nitrat reduktaza, glutamin sintetaza) i citohrom oksidaze, kao i na sadržaj DNK, RNK, aminokiselina, proteina i inkorporiranog markiranog ¹⁴C-leucina u protein. Folijarnim tretiranjem biljaka pasulja sa naftenatima u lišću tretiranih biljaka određene su značajno veće vrednosti za ispitivane enzime. Sadržaj proteina u lišću tretirane biljke je bio za 15.3% veći, a sadržaj aminokiselina povećan je za 16%. U hidrolizatima proteina tretiranih biljaka utvrđene su značajne razlike u odnosu na kontrolu. Najveće procentualno povećanje vrednosti bilo je u glutaminskoj kiselini, glicinu i prolinu tretirane biljke, sadržaj arginina, lizina, tirozina i leucina u proteinu tretirane biljke je smanjen. Sadržaj etanol-rastvornih aminokiselina je bio veći od 7.5%. Osnovna promena u sadržaju ovih amino kiselina su veći procenti arginina i lizina, a manje vrednosti glutaminske kiseline, serina i prolina u lišću tretirane biljke. Sadržaj DNK, nakon tretmana nije značajno promenjen, dok je sadržaj RNK bio znatno veći. Takođe, broj i težina ploda graška i pasulja po biljci nakon 30 dana od tretmana, znatno je veći. Wort i saradnici⁵⁶ sugerisu mehanizam stimulacije rasta biljaka pomoću naftenata koji uključuje genetičku i metaboličku fazu u rastu i razvoju biljaka.

Za pojedine sintetičke supstance pokazano je da pospešuju ožiljavanje biljaka iako ne spadaju u klasu do sada poznatih biljnih hormona. Za ožiljavanje uglavnom svih biljaka neophodno je prisustvo biljnih hormona rasta, pri čemu njih same biljke sintetišu u procesu ožiljavanja u različitoj količini u zavisnosti od biljne vrste. Za 3-indolsirćetnu kiselinu, prirodni auksin, je ubrzo nakon njegovog otkrića pokazano da pospešuje stvaranje adventivnih korenova kod biljaka koje se lako ožiljavaju⁵⁷. Primena vegetativnog razmnožavanja biljaka veoma se brzo širi kao metoda u savremenoj poljoprivredi, naročito u cvečarstvu gde se već duže vreme praktično celokupno razmnožavanje cvetnih biljaka izvodi putem ožiljavanja reznica. Razmnožavanje drvenastih biljaka uglavnom se bazira na proizvodnji izdanaka što je dugotrajan i skup proces. Imperativ civilizacijskog trenutka je pošumljavanje na svim delovima planete jer je nekontrolisano uništavanje šuma ugrozilo naš opstanak te je vegetativno razmnožavanje kao jeftiniji i brži način dolaska do sadnica veoma bitan. Uvođenje vegetivnog razmnožavanja preko reznica svakako pojeftinjuje i ubrzava proces. Pored

ovoga vegetativno razmnožavanje putem ožiljavanja pokazalo se kao ekonomično i u proizvodnji nekih ratarskih i povrtarskih biljaka.

Danas se naftenske kiseline pored heterocikličnih i aromatičnih jedinjenja smatraju najtoksičnijim komponentama otpadnih voda rafinerija nafte i taloga u blizini nalazišta naftnih škriljaca. Toksični efekti naftenskih kiselina na različite biljne vrste utvrđeni su u većem broju radova. U većini radova ispitivan je efekat stresa kod biljaka kao „abiotičkog faktora” koji je posledica prisustva naftenskih kiselina u otpadnim procesnim vodama u industriji nafte i naftnih derivata. U regionu Athabasca u Alberti u Kanadi praćeni su biohemijski parametri kao što je nivo ribuloza-1,5-difosfat karboksilaze, dehidrin-zavisnih polipeptida, protein disulfid izomeraze i stepen fotosinteze kod rogoza i deteline koje su izložene dejstvu otpadnih voda industrije nafte iz uljnih škriljaca⁵⁸. Stepen fotosinteze je bio značajno uvećan u odnosu na biljke sa ne izloženih lokacija, a nivo ribuloza-1,5-difosfat karboksilaze nije bio povećan u biljkama što ukazuje na to da povećanje fotosinteze nije posledica aktivnosti ovog enzima. Polipeptidni profil rogoza ukazuje na osmotski stres izazvan otpadnim vodama. Nivo protein disulfid izomeraze je bio normalan u listovima rogoza. Uopšteno, ovi podaci pokazuju da su se proučavane biljke prilagodile na otpadne vode, ali da su neophodna proučavanja koja bi mogla proceniti njihovu sposobnost da opstanu i nakon dugotrajnijeg izlaganja ovim antropogenim stresovima.

U cilju razjašnjavanja ekoloških efekata naftenskih kiselina i jona: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- koncentrisanim preradom uljnih škriljaca u otpadnim vodama ispitivan je uticaj na sastav zajednice fitoplanktona. Utvrđeno je da količina biomase fitoplanktona nije sistematski povezana sa prisustvom naftenskih kiselina i velikim koncentracijama jona neorganskih soli iako su veće koncentracije naftenata u smeši neorganskih soli izazivale akutne posledice kod mnogih vodenih vrsta. U oglednim rezervoarima dominantna biljna vrsta bila je populacija zelenih algi i tamo gde je koncentracija soli neorganskih jona i naftenskih kiselina bila najveća ustanovljene su progresivne promene u rastu, metabolizmu i aktivnostima navedene vrste algi. Uz kontrolu svih faktora okruženja, prisustvo naftenata i velikih koncentracija jona neorganskih soli ispoljio je veoma značajne redukcije u veličini i grupisanju staništa algi. Koncentracija naftenata iz otpadnih voda manja od 6.5 mg/L određena je kao granična koncentracija, odnosno koncentracija koja ne izaziva pojavu abiotičkog stresa na alge, odnosno sve koncentracije iznad te imaju toksičan efekat na alge⁵⁹.

Pored istraživanja biljnog sveta, na području Athabasca u Kanadi, vršena su i istraživanja na životinjskim vrstama, odnosno ispitivan je uticaj otpadnih procesnih voda i na životinjski svet. Otpadne procesne vode iz postrojenja za proizvodnju nafte iz uljnih škriljaca, koje su zagađene toksičnim naftenskim kiselinama, solima, jonima i policikličnim aromatičnim ugljovodonicima neretko pronalaze svoj put u obližnje reke i jezera. Testiranjem riba u vodi koja je pomešana sa velikom količinom otpadne procesne vode za tri nedelje je na škrigama došlo do nekroze ćelija epitela i proliferacije ćelija sluzokože. U morfološkom smislu ustanovljene su promene na škrigama. Na jetri je došlo do hepatocelularne degeneracije i oštećenja ćelija. Zbog kompleksnosti i složenosti materija prisutnih u otpadnim procesnim vodama iz proizvodnje nafte iz uljnih škriljaca, uzrok histopatoloških promena nije bilo moguće pripisati konkretnoj strukturi kiseline. Međutim, histopatološki parametri su bili dovoljno snažan indikator štetnosti otpadnih procesnih voda⁶⁰. Utvrđeno je da su naftenske kiseline u koncentraciji većoj od 2.5-5 mg/L toksične za ribe, a koncentracij od 0.02 mg/L potpuno blokiraju fertilitet riba^{61,62}.

Nero i saradnici⁶³ su odredili koncentraciju 0.9-3.6 mg/L naftenskih kiselina kao kritičnu i odgovornu za mortalitet i histopatološke promene na škragama i jetri žutog grgeča. Tretmana sa većim koncentracijama su dala kao rezultat 100% smrtnost. Dodatak natrijum-sulfata tretmanu sa većim koncentracijama rezultovao je takođe 100% mortalitetom. Pokazalo se da su mnogo veće posledice kod riba u ranim fazama života (srčani deformiteti i skeletni deformiteti lobanje) koje izazivaju kompleksne smeše policikličnih aromatičnih jedinjenja nego smeše naftenskih kiselina. Koliko ima aromatičnih kiselina u smeši zavisi od nalazišta nafte⁶⁴.

Utvrđeno je da je nivo reproduktivnih i stres hormona kod ispitivane zlatne ribice izmenjen zbog prisustva naftenskih kiselina, policikličnih aromatičnih jedinjenja i visokog saliniteta u procesnim vodama industrije naftnih škriljaca. Utvrđeno je takođe da je nivo testosterona i 17β -estradiola u plazmi smanjen a nivo kortizona povećan, pa ova studija sugerise da otpadne materije u blizini nalazišta naftnih škriljaca remete endokrinu biosintezu i reproduktivnih i glukokortikoidnih hormona⁶⁵. Ispitivanja na pacovima su pokazala da je jetra primarni ciljni organ za toksične efekte naftenskih kiselina, ali su utvrđene i promene na mozgu, bubrezima, koži, srcu i testisima⁶⁶.

Uočena veća toksičnost naftenskih kiselina iz procesnih voda sugerise da je toksičnost ovih jedinjenja pojačana prisustvom drugih jedinjenja (kao što su policiklična aromatična jedinjenja) u istim⁶⁷. To je utvrđeno i u eksperimentu sa lastama^{68,69} gde je na osnovu morfoloških i biohemijskih parametara potvrđeno da su mnogo ugroženije životinje na lokalitetima gde u sastavu naftnih kiselina postoji veći udeo aromatičnih i polikondenzovanih karboksilnih kiselina ali i da izlaganja drugim hemikalijama, kao što su policiklični aromatični ugljovodonici, imaju veći toksični uticaj nego izlaganje dejstvu naftenskih kiselina. Takođe, sintetičke naftenske kiseline na eksperimentalnim kunićima su pokazale značajnu toksičnost. Izmereni LD_{50} je 1770 mg/kg⁷⁰.

U radu sa naftenskim kiselinama uočena je pojava humane kožne alergije i zato je na eksperimentalnim životinjama ispitivano delovanje naftenskih kiselina i njihovih soli kao alergena. Najveće iritiranje kože svinja dejstvom naftenskih kiselina, kobalt- i cink-naftenata izazvao je kobalt-naftenat. Na eksperimentalnim miševima ispitivana jedinjenja su prouzrokovala zadebljanja tj. otoke na ušnom tkivu⁵¹.

3. NAŠI RADOVI

3.1. GRUPNO-STRUKTURNA ANALIZA NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA

U drugoj polovini dvadestog veka je veoma intenzivirano proučavanje svih klasa jedinjenja koji su tipski konstituenti nafti, a sa aspekta primene ali i nauke posebno su interesantne naftenske nafte. Naftenske naftne kiseline kao što je već naglašeno u Opštem delu predstavljaju hemijski stabilne strukture i u zavisnosti od nalaženja relativne molekulske mase mogu biti u širokom opsegu i strukturno su veoma različite, međutim strukturna analogija sa ugljovodonicima u nafti je vrlo velika. Karboksilne kiseline su prisutne u svim tipovima nafti i zastupljene su u proseku od 2.5-0.5% ili čak i manje. Za svaku naftu one predstavljaju „otisak prsta” i baš zato su opsežna ispitivanja hemijskih i fizičkih osobina karboksilnih kiselina svake nafte veoma interesantna i daju puno podataka o strukturama, poreklu i genezi.

Naftne kiseline naftenskih nafti, gde spada i ispitivana vojvođanska nafta „*Velebit*”, predstavljaju smeše alkil-supstituisanih cikloalifatičnih i acikličnih monokarboksilnih kiselina sa opštom formulom $C_nH_{2n-z}O_2$, što je potvrđeno u ranijim radovima⁷¹⁻⁷⁸. Pored ovih struktura u nekim smešama naftnih kiselina različitih basena naftenskih nafti moguće je i prisustvo aromatičnih kiselina. Takve nafte su poznate kao „teške nafte” jer imaju smanjeni procenat benzinskih frakcija i značajno uvećan procenat kiselina^{71,79}. Iz literature je takođe poznato da skeletne strukture monocikličnih kiselina mogu biti u obliku petočlanih i šestočlanih prstenova^{10,80,81}. Pored ovih struktura uvek su u nekom procentu prisutne i bi- i triciklične kiseline, a vrlo često ima i tetra- i pentacikličnih kiselina. Strukturni sastav i odnos klasa kiselina specifičnost je svakog naftnog basena što znači da su strukturne razlike naftnih ugljovodonika istog tipa vrlo često vrlo velike, a takođe to se odražava i na strukturni sastav pratećih karboksilnih kiselina. Odnos petočlanih i šestočlanih struktura monocikličnih kiselina vezan je za geološku starost nafte^{3,15,16}, tako mlađe nafte imaju veći udeo petočlanih monocikličnih kiselina dok starije nafte imaju veći udeo termodinamički stabilnijih cikloheksilkarboksilnih kiselina kao policikličnih struktura.

U ovom radu je izolovanje naftnih kiselina iz srednjih uljnih komercijalnih derivata nafte „*Velebit*” rađeno na dva načina: alkalnom ekstrakcijom sa amonijakom i adsorpcijom na aluminijumoksidu.

Čistoća izolovanih naftnih kiselina kao i kvalitativna grupno-strukturna karakterizacija izolovanih kiselina određivana je FT-IR spektrofotometrijski^{82,83}. Smanjivanje intenziteta trake na $2980-2850\text{ cm}^{-1}$ a povećanje intenziteta trake na 1704 cm^{-1} pokazuje da je prečišćavanjem smanjeno prisustvo ugljovodonika u smeši karboksilnih kiselina (Slika 7.1., 7.2., 7.3.).

U IR spektru prečišćenih kiselina (Slika 7.3.) asignacija je rađena praćenjem intenziteta traka na $2980-2850\text{ cm}^{-1}$, koje potiču od vibracija ν_{as} i ν_{sim} CH_2 , CH_3 , zatim traka od

skeletnih oscilacija CH cikličnih struktura na 1455 cm^{-1} ($\delta_{\text{as}}\text{ CH}_2$) i $1056\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ koje su i dokaz prisustva šestočlanih struktura kiselina, kao i karakterističnih traka na $1704\text{-}1708\text{ cm}^{-1}$ od valencionih vibracija dimerizovane karbonylne grupe ($\nu\text{ C=O}$) i trake na $802\text{-}942\text{ cm}^{-1}$ od deformacionih vibracija $\delta\text{ O-H}$. Trake na $3500\text{-}3000$ i $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ potiču od vibracija OH grupe sa čvrstim vodoničnim vezama u karboksilnoj grupi ($\nu\text{ O-H}$). Mali intenzitet trake na 1445 cm^{-1} dokaz je da je prisustvo petočlanih prstenova svedeno na minimum što je sasvim u skladu sa starošću vojvođanske nafte iz koje su ispitivane naftne kiseline izolovane. Vojvođanska nafta naftenskog tipa „Velebit” prema geološkim podacima je iz Pliocenskog perioda¹. Iz ranijih radova^{73,74,75,76,84} je poznato da ispitivana nafta „Velebit” kao naftenska nafta ima pretežno prisutnu cikloheksil skeletnu strukturu ugljovodonika. U ^1H NMR spektru (Slika 7.4.) odnos vodonika u skeletnoj strukturi 98.1% za δ_{H} region $4.27\text{-}6.16\text{ ppm}$ (CH_3 , CH_2 , CH iz alkil- i cikloalkil-) i 1.9% vodonika iz OH grupe, δ_{H} region $14.88\text{-}15.42\text{ ppm}$ (1H) se uklapa sa vrednostima za teoretski izračunate prosečne strukture kiselina. U ^{13}C NMR spektru (Slika 7.5.) δ_{C} region $14.12\text{-}14.42$ sa 2.5% (CCH_3 iz alkil-grupa) odgovara podacima o relativno malom broju supstituisanih alkil-grupa, a δ_{C} region $19.22\text{-}46.88\text{ ppm}$ sa 92.3% ($\text{C}_q+\text{CH}+\text{CH}_2$ iz skeletnih struktura) potvrda je prisustva cikličnih struktura sa sekundarnim, tercijarnim i kvaternim C-atomom, što znači prisustvo većeg broja molekula sa mono-, bi-, tri- i tetracikličnom strukturom. Spektralni podatak u istom ^{13}C NMR-spektru: δ_{C} $180.20\text{-}186.60\text{ ppm}$ sa 3.8% udela (C=O iz COOH) odgovara teoretskom udelu karboksilnog C atoma u prosečnom molekulu kiselina.

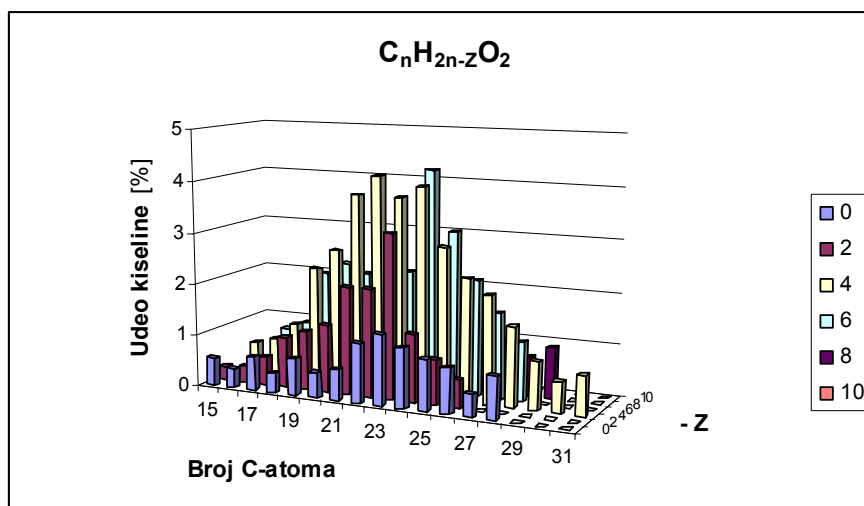
Kao veoma bitan podatak sa aspekta grupno-strukturne analize kiselina iz analiziranih ^1H i ^{13}C NMR spektara utvrđeno je potpuno odsustvo aromatičnih struktura, jer u δ_{H} regionu $7.5\text{-}8.5\text{ ppm}$ ^1H NMR spektra i u δ_{C} regionu $120\text{-}150\text{ ppm}$ ^{13}C NMR spektara nije bilo nikakvih signala. To je vrlo značajan podatak za dalju grupno-spektralnu analizu naftnih kiselina pošto se u ESI-MS spektrima niske rezolucije molekulski pikovi aromatičnih struktura preklapaju sa masama tricikličnih kiselina, pa se asignacijom dobija pogrešan podatak o većem prisustvu tricikličnih struktura kiselina kiselina.

Kao što je iz literature poznato poslednjih deset godina se uvodi elektrosprej jonizacija masena spektrometrija niske rezolucije kao metoda za analizu strukturno heterogenih naftenskih kiselina^{80,81,83,85,86,87,88}. U ovom radu za grupno-strukturnu analizu naftenskih kiselina je korišćena metoda HPLC-MS analize u negativnom jon modalitetu ESI niske rezolucije snimanjem u rastvoru acetonitril-voda 70 : 30 u 1% trietilaminu. ESI su dobijeni molekulski joni $[\text{M-H}]^-$ sa kompletnom distribucijom svih prisutnih klasa kiselina (Slika 3.1. i 7.6.). Referentni pik je od cikloheksilpentanske kiseline (0.1%), vidi se najčešće kao fragment mase 101 ili 102. Iz dijagrama se vidi prisustvo šest klasa kiselina opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-Z}\text{O}_2$. Alkilkarboksilne kiseline (masne kiseline), opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$ ($Z=0$) su u ukupnoj smeši kiselina zastupljene sa 10.6% u rasponu kiselina od C 15-28, monociklične kiseline opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$ ($Z=2$), u ukupnoj smeši zastupljene su sa 14.7% u rasponu kiselina od C 15-26, biciklične kiseline opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-4}\text{O}_2$ ($Z=4$) u ukupnoj smeši zastupljene sa 34.6% u rasponu kiselina od C 16-31, triciklične kiseline opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-6}\text{O}_2$ ($Z=6$), u ukupnoj smeši zastupljene sa 25.0% u rasponu kiselina od C 17-28, tetraciklične kiseline opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-8}\text{O}_2$ ($Z=8$), u ukupnoj smeši zastupljene sa 10.0% u rasponu kiselina od C 22-29, pentaciklične kiseline, opšte formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-10}\text{O}_2$ ($Z=10$), u smeši zastupljene sa 5.0% u rasponu kiselina od C 23-27. Kao što se vidi najzastupljenija klasa kiselina sa 34.6% ima bicikličnu strukturu, a kiseline opšte formule $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_2$ su zastupljene sa 3.79%, kiseline $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_2$ sa 4.17%, kiseline $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_2$ sa 3.79% i $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_2$ kiseline 4.01% u

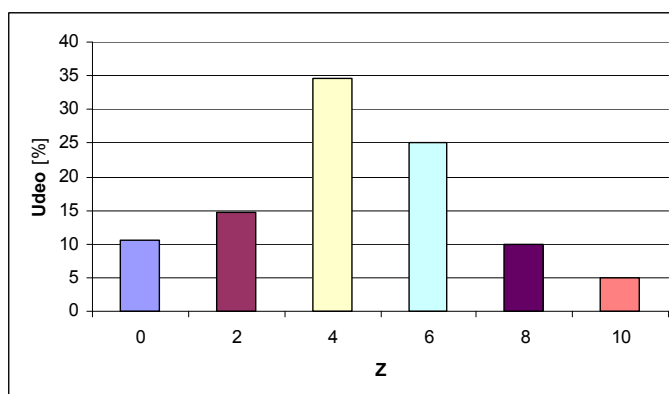
smeši ukupnih kiselina. Zastupljenost dominantnih bicikličnih struktura kiselina od C 21-C 34 u svojoj klasi (Z= 4) je 46% (Slika 3.3.).

Tabela 3.1. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za ukupnu smešu naftnih kiselina

ESI HPLC-MS $m/z = [M-H]^-$:	
•	alkanska serija (Z= 0): 10.5%; 15-28 C; $m/z = 227; 241; 255; 269; 283; 297; 311; 325; 339; 353; 367; 381; 395; 409; 423$.
•	monociklična serija (Z= 2): 14.7%; 15-26 C; $m/z = 239; 253; 267; 281; 295; 309; 323; 337; 351; 365; 379; 393$.
•	biciklična serija (Z= 4): 34.6%; 16-31 C; $m/z = 251; 265; 279; 293; 307; 321; 335; 349; 363; 377; 391; 405; 419; 433; 447; 461$.
•	triciklična serija (Z= 6): 25.0%; 17-28 C; $m/z = 263; 277; 291; 305; 319; 333; 347; 361; 375; 389; 403; 417$.
•	tetraciklična serija (Z= 8): 10.0%; 22-29 C; $m/z = 321; 345; 359; 373; 387; 401; 415; 429$.
•	pentaciklična serija (Z= 10): 5.0%; 23-27 C; $m/z = 343; 351; 371; 385; 399$.

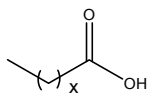


Slika 3.1. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u negativnom jon modalitetu ESI za ukupne naftne kiseline (Slika 7.6.)

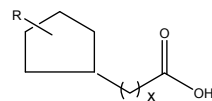
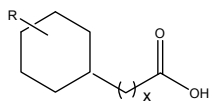


Slika 3.2. Maseni udeo šest Z-serija kiselina u smeši ukupnih prirodnih naftnih kiselina

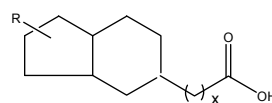
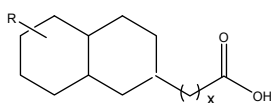
$C_nH_{2n}O_2$
Z= 0; MASNE KISELINE



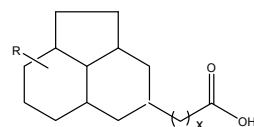
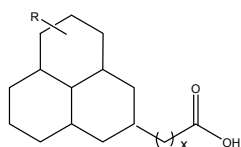
$C_nH_{2n-2}O_2$
Z= 2; 1 PRSTEN



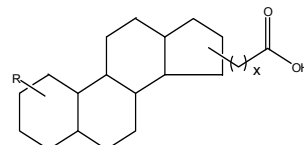
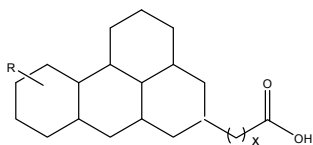
$C_nH_{2n-4}O_2$
Z= 4; 2 PRSTENA



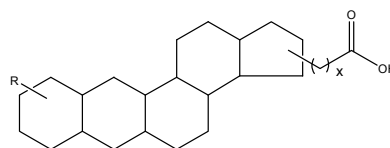
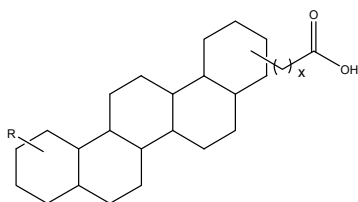
$C_nH_{2n-6}O_2$
Z= 6; 3 PRSTENA



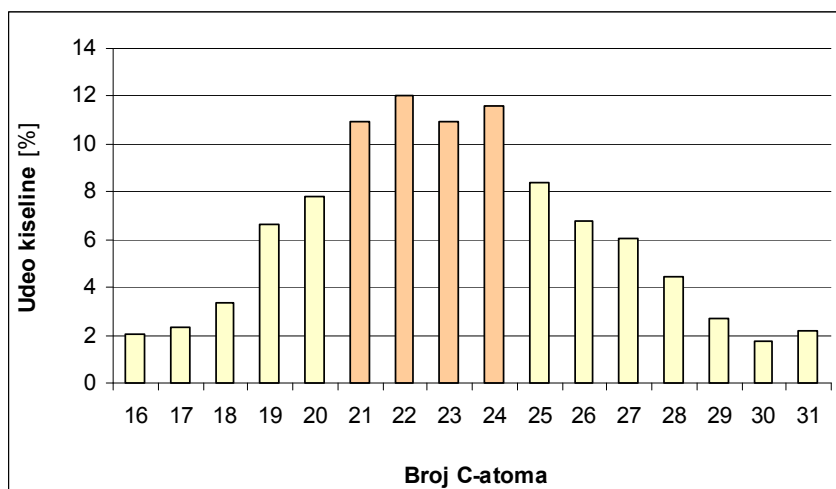
$C_nH_{2n-8}O_2$
Z= 8; 4 PRSTENA



$C_nH_{2n-10}O_2$
Z= 10; 5 PRSTENOVA

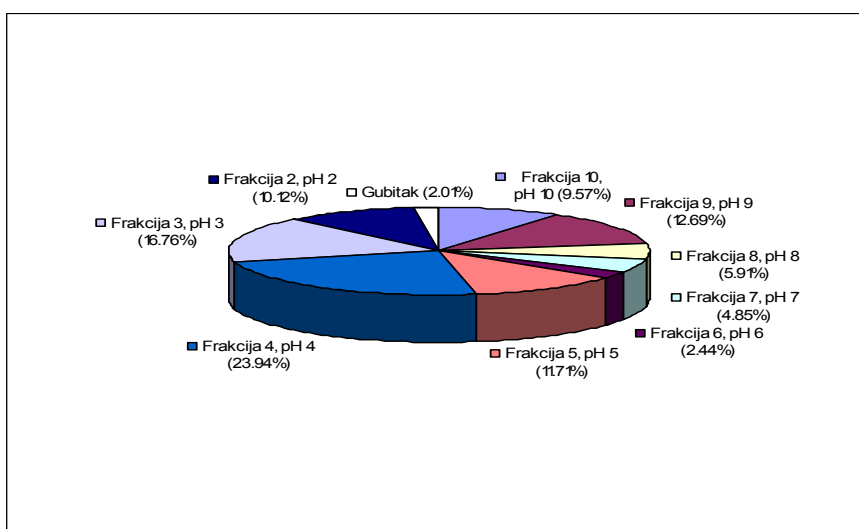


Shema 3.1. Opšti primeri struktura svih šest identifikovanih Z-serija naftnih kiselina



Slika 3.3. Raspodela bicikličnih kiselina ($C_nH_{2n-4}O_2$) u svojoj Z-klasi identifikovanih u ukupnoj smeši naftenskih kiselina

Kao što se iz HPLC-MS analize vidi maksimum svih klasa kiselina je u rasponu od 21-24 C atoma i jasno je da su strukturne mogućnosti vrlo velike a samim tim i njihove hemijske i fizičke osobine mogu biti vrlo različite. Naftne kiseline spadaju u relativno jake kiseline a s obzirom na strukturne razlike alkilnog dela pojedinačno njihova kiselost može biti vrlo različita. Koristeći tu logiku izvršena je njihova frakcionacija na bazi različite rastvorljivosti u vodi promenom pH sredine kako bi se dobile uže frakcije kiselina distribuisane prema kiselosti. Grupno-strukturnom analizom tih užih frakcija potvrđena je mogućnost njihovog razdvajanja na bazi kiselosti. Pokazalo se da je njihova rastvorljivost dovoljno različita u vodi u rasponu od pH 2 do pH 10, tako da su u intervalima od po jedne pH jedinice nerastvorne kiseline izdvojene na površini vodenog sloja a potom ekstrahovane etrom. Na kružnom dijagramu se vidi (Slika 3.4., Tabela 4.2.) da distribucija kiselina na bazi njihove kiselosti nije linearna. Kao što se vidi na slici 3.4. najkiselije strukture kiselina kojih ima preko 50% ekstrahovane su od pH 2 do pH 4.



Slika 3.4. Razdvajanje naftnih kiselina ekstrakcijom na bazi rastvorljivosti u vodi pri različitim pH vrednostima

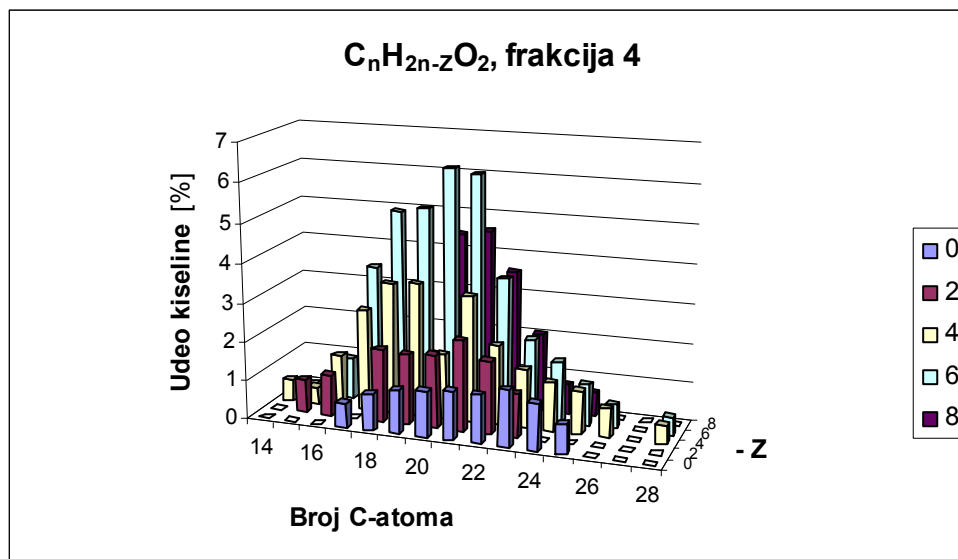
Na pH 11 naftne kiseline su rastvorne u vodi i sve strukture se nalaze u obliku rastvornih naftenata. Zakišeljavanjem odnosno snižavanjem pH vrednosti vodenog rastvora neke strukture kiselina postaju nerastvorne i izdvajaju se na površini vodenog sloja. Kako je od pH 10 do pH 2 u razmacima od po jedne pH jedinice vršena ekstrakcija kiselina sa etrom, potvrđena je naša pretpostavka o velikim razlikama u kiselosti pojedinačnih kiselina, a spektralnom ESI HPLC-MS analizom za frakcije 4; 8 i 10 pokazalo se da je grupisanje kiselina po pH vrednostima različito u svakoj klasi kiselina.

Naftne kiseline koje su u vodenom rastvoru pri pH 4 nerastvorne, ekstrakcijom sa etrom su izolovane i spektralnom ESI HPLC-MS analizom u pozitivnom modalitetu (acetonitril-voda, 70 : 30, 0.1% trifluorsirćetna kiselina) utvrđeno je da je izvršena strukturalna selekcija jer među izolovanim kiselinama nema pentacikličnih kiselina, dominantne su triciklične strukture u rasponu od C18 do C21 u molekulu.

Upoređivanjem ESI HPLC-MS spektara naftnih kiselina izolovanih na pH 4 (23.94%), na pH 8 (5.91%) i pH 10 (9.57%) vide se razlike u distribuciji kiselina što znači da struktura alkilnog dela molekula kiseline utiče na to da su kiseline veoma različite po svojoj jačini. Kako je veliki deo ovog rada usmeren na ispitivanja biološke aktivnosti kiselina dobro poznavanje struktura svih klasa kiselina kao i poznavanje njihove kiselosti značajni su podaci (Slika 3.5., 3.6., i 3.7.; Tabela 3.2., 3.3. i 3.4.).

Tabela 3.2. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za kiseline ekstrahovane iz vodenog rastvora na pH 4

ESI HPLC-MS $m/z = [M+23]^+$
• alkanska serija (Z= 0): 9.7%; 17-25 C; $m/z = 293; 307; 321; 335; 349; 363; 377; 391; 405$.
• monociklična serija (Z= 2): 12.7%; 15-23 C; $m/z = 263; 277; 305; 319; 333; 347; 361; 375$.
• biciklična serija (Z= 4): 23.9%; 14-26 C; $m/z = 247; 261; 275; 289; 303; 317; 331; 345; 359; 373; 387; 401; 415; 443$.
• triciklična serija (Z= 6): 36.5%; 16-28 C; $m/z = 273; 287; 301; 315; 329; 343; 357; 371; 385; 399; 413; 441$.
• tetraciklična serija (Z= 8): 17.1%; 19-25 C; $m/z = 313; 327; 341; 355; 369; 383; 397$.

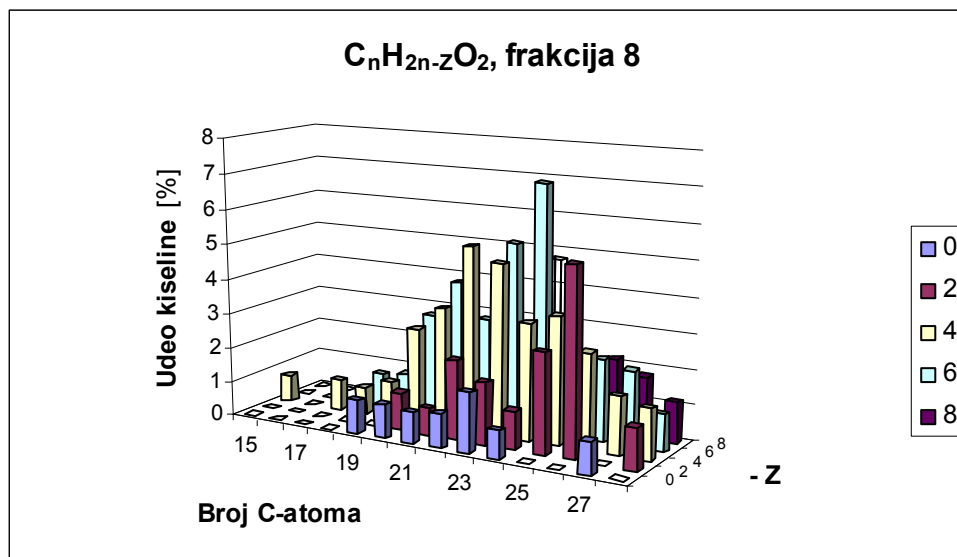


Slika 3.5. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u pozitivnom jon modalitetu ESI za frakciju naftnih kiselina izolovanu ekstrakcijom iz vodenog rastvora na pH 4

Naftne kiseline koje su u vodenom rastvoru pri pH 8 nerastvorne, ekstrakcijom sa etrom su izolovane i spektralnom ESI HPLC-MS analizom u pozitivnom modalitetu (acetonitril-voda, 70 : 30, 0.1% trifluorsirćetna kiselina) utvrđeno je da je izvršena strukturna selekcija jer među izolovanim kiselinama takođe nema pentacikličnih kiselina, kojih u polaznoj smeši ima 5%, dominantne su biciklične i triciklične strukture u rasponu od C 20 do C 25 u molekulu.

Tabela 3.3. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za kiseline ekstrahovane iz vodenog rastvora na pH 8

ESI HPLC-MS m/z= [M-H] ⁻ i [M] ⁻ :
• alkanska serija (Z= 0): 7.2%; 19-27 C; m/z= 298; 311; 325; 339; 353; 367; 409.
• monociklična serija (Z= 2): 16.2%; 20-28 C; m/z= 308; 322; 336; 350; 364; 392; 420.
• biciklična serija (Z= 4): 32.5%; 15-28 C; m/z= 236; 264; 278; 292; 320; 334; 348; 362; 376; 390; 404; 418.
• triciklična serija (Z= 6): 35.5%; 18-28 C; m/z= 276; 290; 305; 318; 332; 346; 360; 374; 388; 402; 416.
• tetraciklična serija (Z= 8): 11.7%; 20-28 C; m/z= 303; 358; 386; 400; 415.

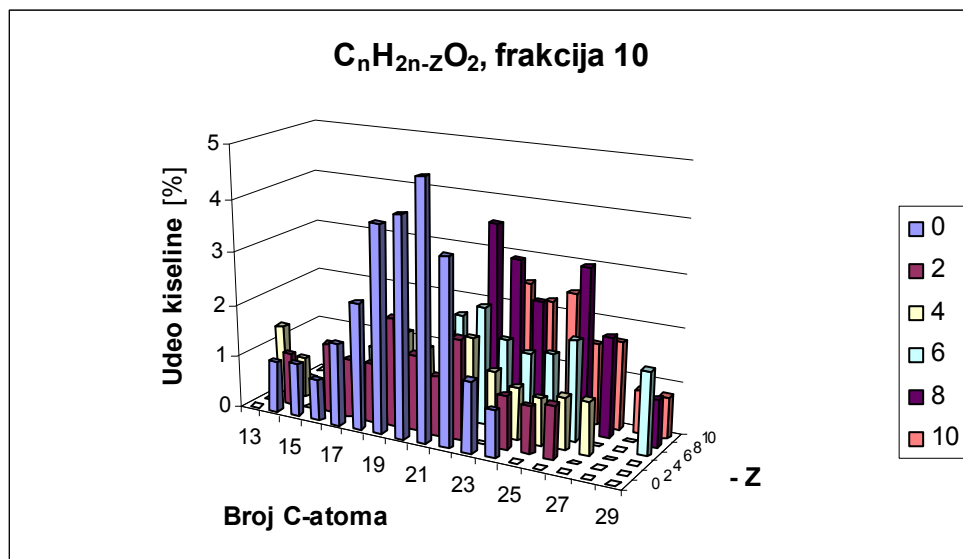


Slika 3.6. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u negativnom jon modalitetu ESI za frakciju naftnih kiselina izolovanu ekstrakcijom iz vodenog rastvora na pH 8

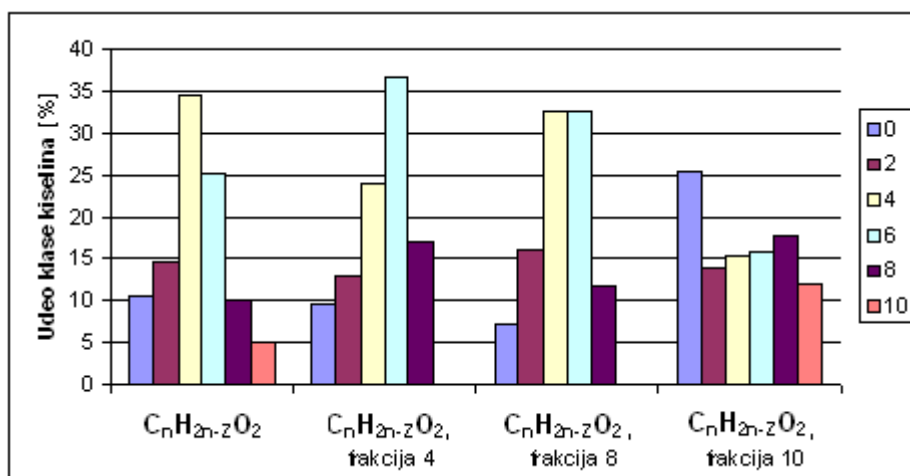
Kao najmanje kisele strukture, naftne kiseline koje su u vodenom rastvoru pri pH 10 nerastvorne, izolovane su ekstrakcijom sa etrom i spektralnom ESI HPLC-MS analizom su asignirane u pozitivnom modalitetu (acetonitril-voda, 70 : 30, 1% sirćetna kiselina). Iz spektra (Slika 7.12.) se vidi da je izvršena strukturalna selekcija pošto je među kiselinama asignirana serija $[M+H]^+$ molekulskih jona pentacikličnih kiselina (12.0%). U spektru je dominantna alkanska Z-klasa kiselina (25.3%), gde su C 21 kiseline zastupljene čak sa 4.83%. Tetraciklične strukture kiselina su zastupljene sa 17.7% u ukupnoj smeši sa dominantnim udelom struktura sa C 22, C 23 i C 26 u molekulu. Triciklične strukture kiselina dominiraju u rasponu od C 22 do C 26 (Slika 3.7.).

Tabela 3.4. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za kiseline ekstrahovane iz vodenog rastvora na pH 10

ESI HPLC-MS $m/z = [M+H]^+$:	
•	alkanska serija (Z= 0): 25.3%; 14-24 C; $m/z = 229; 243; 257; 271; 285; 299; 313; 327; 341; 355; 369$.
•	monociklična serija (Z= 2): 13.9%; 14-26 C; $m/z = 227; 255; 269; 283; 297; 311; 325; 339; 367; 381; 395$.
•	biciklična serija (Z= 4): 15.3%; 13-27 C; $m/z = 211; 225; 253; 281; 295; 308; 322; 336; 351; 365; 379; 393; 407$.
•	triciklična serija (Z= 6): 15.8%; 16-29 C; $m/z = 251; 265; 279; 321; 335; 349; 363; 377; 390; 405$.
•	tetraciklična serija (Z= 8): 17.7%; 20-29 C; $m/z = 305; 319; 333; 347; 361; 389; 403; 445$.
•	pentaciklična serija (Z= 10): 12.0%; 23-29 C; $m/z = 345; 359; 373; 387; 400; 415; 429$.



Slika 3.7. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u pozitivnom jon modalitetu ESI za frakciju naftnih kiselina izolovanu ekstrakcijom iz vodenog rastvora na pH 10 (Slika 7.9.)



Slika 3.8. Distribucija klasa kiselina ekstrahovanih iz vodenih rastvora na pH 4; 8 i 10

Iz tri ESI HPLC-MS spektra niske rezolucije koja su predstavljena sa tri trodimenzionalna dijagrama (Slika 3.5., 3.6. i 3.7.) vrlo je uočljiva distribucija kiselina po klasama, odnosno Z-serijama, ali i unutar iste klase kiselina. Masne kiseline, mono-, bi-, tri- i tetraciklične kiseline su različito distribuisane u sve tri frakcije što se vidi iz spektara. Pentaciklične kiseline kojih inače u ukupnoj smeši ima najmanje, očigledno su najslabije pa tako i najnerastvorljivije, a kao klasa kiselina su skoncentrisane u frakciji izolovanoj pri pH 10. Pošto ESI HPLC-MS analiza nije izvršena za svih devet frakcija koliko je dobijeno ovim razdvajanjem nije pouzdano potvrđeno da li su sve pentaciklične kiseline skoncentrisane u frakciji 10, ali pošto ih sa kiselinama u frakciji 4 i 8 uopšte nema jasno je da spadaju u slabije kiseline koje su u vodi nerastvorne na pH 10. Pri istom pH 10 skoncentrisano je takođe i najviše masnih kiselina, dok porastom pH tricikličnih struktura kiselina ima sve manje u smeši što govori o njihovoj većoj prosečnoj kiselosti. Na ovaj način je dobijena potvrda o mogućem frakcionisanju kiselina ekstrakcijom kiselina iz vode sa etrom na različitim pH vrednostima. Potpuna

kvalitativna i kvantitativna analiza ovakve distribucije bi mogla biti izvedena masenom spektroskopijom tek ukoliko bi se svih devet dobijenih frakcija izanaliziralo ESI HPLC-MS metodom.

3.2. SINTEZE DERIVATA NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA

3.2.1. SINTEZE ESTARA NAFTNIH KISELINA

Poslednjih nekoliko decenija hemijska proučavanja u oblasti nafte su u stalnoj ekspanziji. Sinteze velikog broja različitih naftnih derivata su od laboratorijskih eksperimenata ušli u polupogonske ili tehnološke procese. Kao što se u Uvodnom delu navodi jedan od ciljeva ovog rada je hemijska derivatizacija prirodnih naftnih kiselina iz vojvođanske naftenske nafte „*Velebit*” i to prevođenje u estre kao kiseonične derivate i amide kao azotne derivate.

Poznato je da su estri naftnih kiselina višestruko interesantni i imaju široku primenu²⁴. Estri naftnih kiselina naftenskog tipa do sada su sintetisani esterifikacijom sa velikim brojem raznovrsnih alkohola i imaju široku primenu u poboljšanju kvaliteta polimernih masa, na primer etilenglikol naftenski estri se koriste kao plasticianti i lubrikanti^{89,90}, glicerol, manitol i sorbitol estri kao antistatici za polietilenske, polistirenske i polipropilenske sintetske materijale¹⁵ itd.

Neefikasnost klasičnih metoda esterifikacije naftnih kiselina, dugo vreme trajanja reakcije i/ili mali prinosi objašnjavaju se strukturnom raznovrsnošću smeše prirodnih kiselina. U ovom radu postavljen je cilj da se klasične metode esterifikacije naftnih kiselina modifikuju upotrebom mikrotalasa kao ko-katalizatora, što treba da skрати vreme reakcije ali i u nekim slučajevima i da poveća prinos. ESI HPLC-MS analizom, snimanjem masenih spektara niske rezolucije dobijeni su samo molekularni joni⁹¹ što pregledno daje kvalitativni i kvantitativni uvid u sve prisutne klase kiselina u smeši pre reakcije, odnosno derivata posle reakcije. Tako je dobijen odgovor na stalno otvoreno pitanje da li se ovim derivatizacijama kvantitativno i kvalitativno menja sastav sintetizovanih derivata.

Saglasno predviđenom planu rada cilj sledećeg dela naših radova je modifikacija reakcije esterifikacije naftnih kiselina sa metanolom, etanolom, *n*-butanolom, *tert*-butil alkoholom i benzil alkoholom u uslovima kisele katalize uz ko-katalitičko delovanje mikrotalasa.

Reakcija dobijanja metil-estara rađena je sa dve klasične sintetske metode:

- metilovanje sa diazometanom
- kiselokatalizovana esterifikacija sa sumpornom kiselinom

i u ovom radu modifikovanom metodom esterifikacije u kiselokatalizovanim uslovima upotrebom mikrotalasa kao ko-katalizatora:

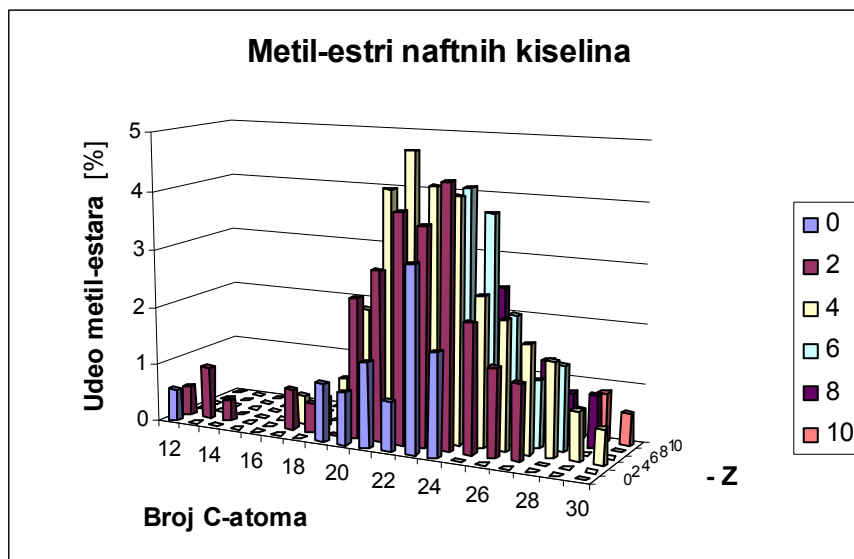
- katalizator sumporna kiselina + MT
- katalizator *p*-toluensulfonska kiselina +MT

Metilovanjem naftnih kiselina sa diazometanom (eksperiment 4.3.1.1.1.) dobijaju se metilnaftenati u prinosu od 95.47% (reakcija trenutna). Ovom metodom se efikasno esterifikuju kiseline sa vrlo slabim nukleofilima i reaktanti sa sterno zaštićenim položajima. Metoda je pogodna za sintezu metil-estara naftnih kiselina ali zbog otrovnosti karbena ne preporučuje se za širu upotrebu.

U IR spektru metil-estara vide se samo trake na 1739 cm^{-1} karakteristične za vibracije karbonilne grupe ($\nu\text{ C=O}$), zatim trake na $1459\text{-}1435\text{ cm}^{-1}$ koje odgovaraju deformacionim vibracijama CH_3 - grupe i $-\text{CH}_2-$ grupe u cikličnim strukturama ($\delta_{\text{as}}\text{ CH}_3$, CH_2 cikl.), kao i trake na 1377 i $1252\text{-}1167\text{ cm}^{-1}$ od estarskih C-O-C valencionih asimetričnih i simetričkih vibracija ($\nu_{\text{as}}\text{ C-O-C}$ i $\nu_{\text{sim}}\text{ C-O-C}$). Intenzivna traka na $2980\text{-}2820\text{ cm}^{-1}$ asignira asimetrične i simetrične valencione vibracije $-\text{CH}_2-$ i CH_3 -grupa (ν_{as} i $\nu_{\text{sim}}\text{ CH}_2$, CH_3). Nestanak traka na $3500\text{-}3000$ i $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ koje su poticale od vibracija OH grupe u karboksilnoj grupi ($\nu\text{ O-H}$) dokaz su strukturne transformacije kiselina. Takođe je uočeno karakteristično pomeranje karbonilne grupe sa 1704 cm^{-1} karakteristične za dimerizovanu karboksilnu grupu na 1739 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) što je pouzdana asignacija estarske funkcije. Prisustvo estarske funkcije u ^1H NMR spektru sintetizovanog metilnaftenata potvrđuje signal na $\delta_{\text{H}}\text{ 3.54-3.70 ppm}$ ($-\text{OCH}_3$). U ^{13}C NMR spektru prisustvo estarske funkcije asignano je na $\delta_{\text{C}}\text{ 173.50-178-24 ppm}$ (C=O iz estra). Iz podataka elementarne mikroanalize određena je prosečna molekulska formula $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$ što sugeriše dominantno prisustvo bicikličnih struktura sintetizovanih estara. Iz masenih spektralnih podataka (Slika 7.16., Tabela 3.5., Tabela 4.6., Slika 3.9.) snimljenog ESI HPLC-MS spektra u pozitivnom modalitetu utvrđeno je da su prisutni samo molekulski joni $[\text{M}+23]^+$ (umesto vezivanja H u ovom slučaju Na se aplicira na kiselinu, on se ili dodaje u obliku soli a nekada se Na angažuje sa zidova staklenog suda⁹¹).

Tabela 3.5. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za metilnaftenate sintetizovane metilovanjem sa diazometanom

ESI HPLC-MS $m/z = [\text{M}+23]^+$:
• alkanska serija ($Z = 0$): 9.6%; 12-24 C; $m/z = 237; 335; 349; 363; 377; 391; 405$.
• monociklična serija ($Z = 2$): 25.1%; 12-27 C; $m/z = 235; 249; 263; 305; 319; 347; 361; 375; 389; 403; 417; 431; 445$.
• biciklična serija ($Z = 4$): 30.9%; 17-30 C; $m/z = 303; 317; 331; 345; 359; 373; 387; 401; 415; 429; 443; 457; 471; 485$.
• triciklična serija ($Z = 6$): 19.5%; 21-28 C; $m/z = 357; 371; 385; 399; 413; 427; 441; 455$.
• tetraciklična serija ($Z = 8$): 11.5%; 21-29 C; $m/z = 355; 369; 383; 397; 411; 425; 439; 453; 467$.
• pentaciklična serija ($Z = 10$): 3.41%; 26-30 C; $m/z = 423; 437; 451; 465; 479$.



Slika 3.9. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u pozitivnom jon modalitetu ESI za metil-estre naftnih kiselina sintetizovane metilovanjem sa diazometanom

Pošto je prinos metilnaftenata visok (95.47%) reakcija je izvršena efikasno i pretpostavka da su sve prisutne klase kiselina ravnotežno prevedene u metil-estre je uglavnom i potvrđena upoređivanjem ESI HPLC-MS spektralnih podataka za čiste kiseline, reaktanate (Slika 7.6., Tabela 3.1., Tabela 4.1., Slika 3.1.) i metil-estre kao proizvode (Slika 7.16., Tabela 3.5., Tabela 4.6., Slika 3.9.). Opseg prisutnih kiselina reaktanata i opseg proizvoda se dobro slaže, odnosno u oba slučaja to su strukture koje mogu imati od 15-31 C-atoma u molekulu. U sintetizovanim estrima su zastupljene svih šest klasa kiselina kao i u polaznim kiselinama. Ipak, iz trodimenzionalnih dijagrama masa (Slika 3.1. i Slika 3.9.) se vidi da su najbolje esterifikovane monociklične strukture kiselina, a zatim tetraciklične strukture jer se njihov maseni udeo povećao u odnosu udeo u ukupnim kiselinama pre esterifikacije, a najlošije su esterifikovane triciklične kiseline jer je udeo metil-estara triciklične klase kiselina smanjen na 5.55% u odnosu na udeo u smeši kiselina (25.0%) pre esterifikacije.

Reakcijom esterifikacije sa sumpornom kiselinom kao katalizatorom uz konvencionalno zagrevanje (eksperiment 4.3.1.1.2.) prinos čistih estara je 90.30% (vreme reakcije 4 sata). U ^1H NMR spektru sintetizovanih metilnaftenata (Slika 7.17.) assignirana je karakteristična traka na δ_{H} 3.60-3.70 ppm (OCH_3). U ^{13}C NMR spektru prisustvo estarske funkcije assignano je na δ_{C} 173.68-177.09 ppm ($\text{C}=\text{O}$ iz estara) i δ_{C} 51.19-57.30 ppm (OCH_3) iz estarske funkcije (Slika 7.18.).

Jedan od ciljeva ovog rada bio je modifikacija klasične metode kiselo-katalizovane reakcije esterifikacije naftnih kiselina uz konvencionalno termičko zagrevanje (eksperiment 4.3.1.1.2.). Modifikacija podrazumeva supstituciju konvencionalnog termičkog načina zagrevanja mikrotalasnim. Esterifikacija se izvodi u mikrotalasnom reaktoru uz programirane uslove: 150 W, temperatura 65°C , vreme trajanja reakcije 5 min., u otvorenom sistemu uz mešanje i reflux. Sinteza je rađena na maloj skali: 1.07 mmol naftnih kiselina, 1.5 mL suvog metanola, 0.107 mmol sumporne kiseline (*p*-toluensulfonske kiseline) i 0.02 g silikagela kao adsorbensa.

Modifikovanom metodom esterifikacije naftnih kiselina katalizovanom sumpornom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (eksperiment 4.3.1.1.3.). ostvaren je prinos od 63.46% a vreme trajanja reakcije je 5 min., odnosno 48 puta je skraćeno vreme reakcije. Strukture na ovaj način sintetizovanih metil-estara potvrđene su spektroskopski. U ^{13}C NMR spektru prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_{C} 173.67 ppm (C=O iz estera) i δ_{C} 51.21-51.31 ppm (OCH_3) iz estarske funkcije (Slika 7.19.).

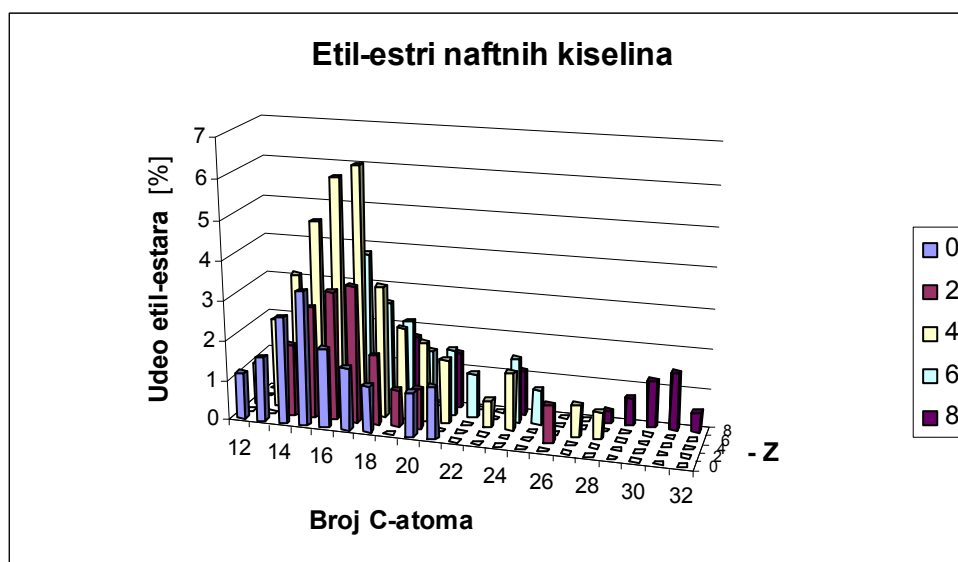
Modifikovanom metodom esterifikacije naftnih kiselina uz katalizu *p*-toluensulfonskom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (eksperiment 4.3.1.1.4.). ostvaren je prinos od 52.64% a vreme trajanja reakcije je 5 min, takođe je skraćeno 48 puta u odnosu na klasičan postupak. U ^{13}C NMR spektru prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_{C} 173.18-173.88 ppm (C=O iz estera) i δ_{C} 47.68-51.19 ppm (OCH_3) iz estarske funkcije (Slika 7.20.).

Esterifikacije naftnih kiselina etil alkoholom rađene su u uslovima kisele katalize uz konvencionalno i uz mikrotalasno zagrevanje modifikacijom klasične metode na isti način kao i pri sintezi metil-estara. U eksperimentu 4.3.1.2.1. reakcija je trajala 8 sati, a ostvareni prinos je 91.76%.

U IR spektru sintetizovanog etil-estera uočava se gubitak traka na 3500-3000 i 2800-2500 cm^{-1} koje potiču od vibracija OH grupa (ν O-H), a pomeranje položaja traka za karbonilnu grupu u položaj na 1736 cm^{-1} (ν C=O) pouzdana je asignacija nagrađene estarske funkcije, kao i traka na 1251 cm^{-1} (ν_{sim} C-O-C) nastala od simetričnih C-O-C vibracija estarske funkcije (Slika 7.21.). Na prisustvo estarske funkcije u ^1H NMR spektru sintetizovanih etilnaftenata u eksperimentu 4.3.1.2.1. (Slika 7.22.) ukazuje signal na δ_{H} 3.96-4.24 ppm ($-\text{OCH}_2$). U ^{13}C NMR spektru (Slika 7.23.) prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_{C} 173.08-176.18 ppm (C=O iz estera). Prosečna molekulska formula $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$, što sugerise dominantno prisustvo bicikličnih struktura dobijenih estara. U masenom spektru (Slika 7.24., Tabela 3.6, Tabela 4.7.) snimljenom ESI HPLC-MS metodom u pozitivnom modalitetu prisutni su samo molekulske joni $[\text{M}+\text{H}]^+$ i vidi se dominantno prisustvo bicikličnih struktura. Uporednom analizom dijagrama dobijenih iz masenog spektra ukupnih kiselina (Slika 3.1.) i masenog spektra etil-estara (Slika 3.10.) uočava se potpuno odsustvo pentacikličnih struktura među sintetizovanim estrima. U smeši ukupnih kiselina njih ima 4.99%, što znači da se te strukture teško esterifikuju. Glavne tri klase kiselina: monociklične-, biciklične- i triciklične kiseline su u obliku etilnaftenata prisutne u skoro identičnom udelu kao u smeši kiselina.

Tabela 3.6. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za etilnaftenate sintetizovane uz konvencionalno zagrevanje u uslovima kisele katalize sa sumpornom kiselinom

ESI HPLC-MS $m/z = [\text{M}+\text{H}]^+$:
• alkanska serija (Z= 0): 16.0%; 12-21 C; $m/z = 229; 243; 257; 271; 285; 299; 313; 327; 341; 355$.
• monociklična serija (Z= 2): 15.9%; 14-26 C; $m/z = 255; 269; 283; 297; 311; 325; 339$.
• biciklična serija (Z= 4): 36.6%; 12-28 C; $m/z = 225; 239; 253; 267; 281; 295; 309; 323; 337; 351; 379; 393; 435; 449$.
• triciklična serija (Z= 6): 23.1%; 14-25 C; $m/z = 251; 265; 279; 293; 307; 321; 335; 349; 363$.
• tetraciklična serija (Z= 8): 8.4%; 19-32 C; $m/z = 319; 347; 389; 445; 459; 473; 487$.



Slika 3.10. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u pozitivnom jon modalitetu ESI za etil-estre naftnih kiselina

Modifikovanom metodom esterifikacije naftnih kiselina etil alkoholom katalizovanom sumpornom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (eksperiment 4.3.1.2.2.) ostvaren je prinos od 92.19% a vreme trajanja reakcije je 5 min., odnosno 96 puta je skraćeno vreme reakcije. Esterifikacija se izvodi u mikrotalasnom reaktoru uz programirane uslove: 150 W, temperatura 79⁰C, 5 min., u otvorenom sistemu uz mešanje i refluks. Sinteza je rađena na maloj skali: 1.09 mmol naftnih kiselina, 1.5 mL suvog etanola, 0.107 mmol sumporne kiseline i 0.02 g silikagela kao adsorbensa. U ¹³C NMR spektru (Slika 7.25.) prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_C 173.34-173.84 ppm (C=O iz estra).

Sinteza *n*-butilnaftenata rađena je esterifikacijom kiselina sa *n*-butanolom uz sumpornu kiselinu kao katalizator i uz konvencionalno zagrevanje (eksperiment 4.3.1.3.1.). Prinos čistih estara je 90.30%, vreme reakcije 6 sati.

U IR spektru sintetizovanog *n*-butil-estra uočava se gubitak traka na 3500-3000 i 2800-2500 cm⁻¹ koje potiču od vibracija OH grupa (ν O-H), a pomeranje položaja traka za karbonilnu grupu u položaj na 1736 cm⁻¹ (ν C=O) pouzdana je asignacija nagrađene estarske funkcije. Takođe trake na 1378 i 1248 cm⁻¹ potiču od asimetričnih i simetričnih vibracija C-O-C (ν_{as} C-O-C i ν_{sim} C-O-C) u estarskoj funkciji (Slika 7.26.). Prisustvo estarske funkcije u ¹H NMR spektru sintetizovanog *n*-butilnaftenata u eksperimentu 4.3.1.3.1. (Slika 7.27.) potvrđuje signal na δ_H 3.76-4.12 ppm (-OCH₂). U ¹³C NMR spektru prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_C 172.50-175.50 ppm (C=O iz estra) i na δ_C 63.00-65.00 ppm signalom za OCH₂ grupu u estarskoj funkciji (Slika 7.28.).

Modifikovanom metodom esterifikacije naftnih kiselina *n*-butil alkoholom katalizovanom sumpornom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (eksperiment 4.3.1.3.2.) ostvaren je prinos od 61.15% a vreme trajanja reakcije je 5 min., odnosno 72 puta je skraćeno vreme reakcije. Esterifikacija se izvodi u mikrotalasnom reaktoru uz programirane uslove: 150 W, temperatura 118⁰C, vreme 5 min., u otvorenom sistemu uz mešanje i refluks. Sinteza je rađena na maloj skali: 1.10 mmol naftnih kiselina, 1.5 mL suvog *n*-butanola, 0.107 mmol sumporne kiseline i 0.02 g silikagela kao adsorbensa. Prisustvo estarske funkcije u ¹H NMR spektru sintetizovanog *n*-butilnaftenata (Slika 7.29.) potvrđuje signal

na δ_H 3.90-4.18 ppm (OCH₂). U ¹³C NMR spektru (Slika 7.30.) prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_C 173.35-173.83 ppm (C=O iz estera).

Sinteza *terc*-butilnaftenata rađena je prevođenjem naftnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa *terc*-butil alkoholom nastaju *terc*-butilnaftenati (eksperiment 4.3.1.4.1.). Prinos čistih estara je 80.17%.

U IR spektru sintetizovanih *terc*-butil-estara uočava se gubitak traka na 3500-3000 i 2800-2500 cm⁻¹ koje potiču od vibracija OH grupa (ν O-H), a pomeranje položaja traka za karbonilnu grupu u položaj na 1731 cm⁻¹ (ν C=O), asignacija je estarske funkcije. Takođe prisustvo traka na 1391-1367 cm⁻¹ (ν_{as} C-O-C) i 1151 cm⁻¹ (ν_{sim} C-O-C) dokaz su prisustva C-O-C estarske veze u estarskoj funkciji (Slika 7.31.). Na prisustvo estarske veze u ¹H NMR spektru sintetizovanog *terc*-butilnaftenata u eksperimentu 4.3.1.4.1. (Slika 7.32.) ukazuje signal na δ_H 1.38-1.60 ppm (OC(CH₃)₃). U ¹³C NMR spektru (Slika 7.33.) prisustvo estarske funkcije asignirano je na δ_C 172.00-177.50 ppm (C=O iz estera) i na δ_C 78.00-81.00 ppm, karakterističnim signalom za kvaternerni ugljenikov atom (OC(CH₃)₃).

Modifikovanom metodom klasične procedure esterifikacije naftnih kiselina *terc*-butil alkoholom katalizovanom sumpornom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (eksperiment 4.3.1.4.2.) ostvaren je prinos od 85.49% a vreme trajanja reakcije je 5 minuta. Esterifikacija se izvodi u mikrotalasnom reaktoru uz programirane uslove: 150 W, temperatura 83^oC, vreme 5 min., u otvorenom sistemu uz mešanje i refluks. Sinteza je rađena na maloj skali: 1.05 mmol naftnih kiselina, 1.5 mL suvog *terc*-butil alkohola, 0.107 mmol sumporne kiseline i 0.02 g silikagela kao adsorbensa. Ovako nizak prinos *terc*-butilnaftenata može se objasniti slabom nukleofilnošću alkohola i sternim efektima voluminozne alkil grupe u alkoholu i sa druge strane kratkim i račvastim alkil lancima za koje je vezana karboksilna grupa. Značajan udeo tercijarnih i kvaternernih C atoma u karboksilnim kiselinama vidi se u svim snimljenim ¹³C NMR spektrima. Prisustvo estarske funkcije u ¹H NMR spektru sintetizovanih *terc*-butilnaftenata (Slika 7.34.) potvrđuje signal na δ_H 1.45 ppm (OC(CH₃)₃). U ¹³C NMR spektru (Slika 7.35.) prisustvo estarske funkcije asignirano je na δ_C 178.74 (C=O iz estera).

Sinteza benzilnaftenata rađena je prevođenjem naftnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa benzil alkoholom nastaju benzilnaftenati (eksperiment 4.3.1.5.1.). Prinos čistih estara je 84.43%, a reakcija alkilovanja hlorida naftnih kiselina benzil alkoholom trajala jedan sat.

U IR spektru sintetizovanih benzil-estara naftnih kiselina uočavaju se trake na 3066-3034 cm⁻¹ koje potiču od valencionih vibracija (ν C-H Ar), a gubitak traka na 3500-3000 i 2800-2500 cm⁻¹ (ν O-H) potvrđuju nestanak OH grupe u karboksilnoj funkcionalnoj grupi. Trake u oblasti 1587-1498 cm⁻¹ pripadaju skeletnoj vibraciji aromatičnog jezgra (ν C-C Ar). Pomeranje položaja traka za karbonilnu grupu u položaj na 1736 cm⁻¹ (ν C=O) asignacija je estarske funkcije. Takođe prisustvo traka na 1378 i 1158 cm⁻¹ (ν_{as} C-O-C i ν_{sim} C-O-C) dokaz su prisustva C-O-C estarske veze u estarskoj funkciji (Slika 7.36.). Prisustvo estarske funkcije u ¹H NMR spektru sintetizovanih benzilnaftenata u eksperimentu 4.3.1.5.1. (Slika 7.37.) potvrđuje signal na δ_H 5.05-5.15 ppm (O-CH₂, Bn). U ¹³C NMR spektru (Slika 7.38.) prisustvo estarske funkcije asignirano je na δ_C 172.83-176.40 ppm (C=O iz estera) i na δ_C 65.89-66.61 ppm (CH₂-Bn).

Modifikovanom metodom klasične procedure kiselo-katalizovane esterifikacije naftnih kiselina benzil alkoholom u uslovima MT-zagrevanja (eksperiment 4.3.1.5.2.) ostvaren je prinos od 85.49% a vreme trajanja reakcije je 5 min. Skraćenje reakcionog vremena nije moguće izračunati pošto benzil-estre nije bilo moguće sintetizovati klasičnom metodom kao što je ostvareno u sintezi metilnaftenata, etilnaftenata i *n*-butilnaftenata zbog niske nukleofilnosti alkoholnog kiseonika iz sternih razloga. Esterifikacija se izvodi u mikrotalasnom reaktoru uz programirane uslove: 150 W, temperatura 207⁰C, vreme 5 min., u otvorenom sistemu uz mešanje i refluks. Sinteza je rađena na maloj skali: 1.09 mmol naftnih kiselina, 1.5 mL benzil alkohola, 0.107 mmol sumporne kiseline i 0.02 g silikagela kao adsorbensa. U ¹³C NMR spektru (Slika 7.39.) prisustvo estarske funkcije asignano je na δ_C 172.83-176.40 ppm (C=O iz estra), a u regionu 65.89-66.61 ppm je asigniran benzilni C-atom (CH₂ iz Bn).

3.2.2. SINTEZE AMIDA NAFTNIH KISELINA

U prvom delu našeg rada strukturnom IR-, ¹H i ¹³C NMR- i ESI HPLC-MS analizom izolovanih naftnih kiselina utvrđeno je prisustvo šest Z-klasa kiselina: alkanske i mono-, di-, tri-, tetra- i pentaciklične strukture kiselina sa mogućim kraćim i/ili dužim alkilnim lancima. Analizom ¹³C NMR spektara (Slika 7.5.) takođe je ustanovljeno odsustvo aromatičnih struktura i nezasićenih C=C veza što je za planiranje reakcija derivatizacije bio veoma bitan podatak. Ovakve strukturne karakteristike odgovorne su za nepolarnu strukturu cikloalkilnog dela izolovanih naftnih kiselina, ali zbog prisustva karboksilne grupe sasvim je očekivana visoka površinska aktivnost naftnih kiselina i sklonost građenju emulzija što je i potvrđeno kasnije određivanjem njihove kritične micelarne koncentracije⁹².

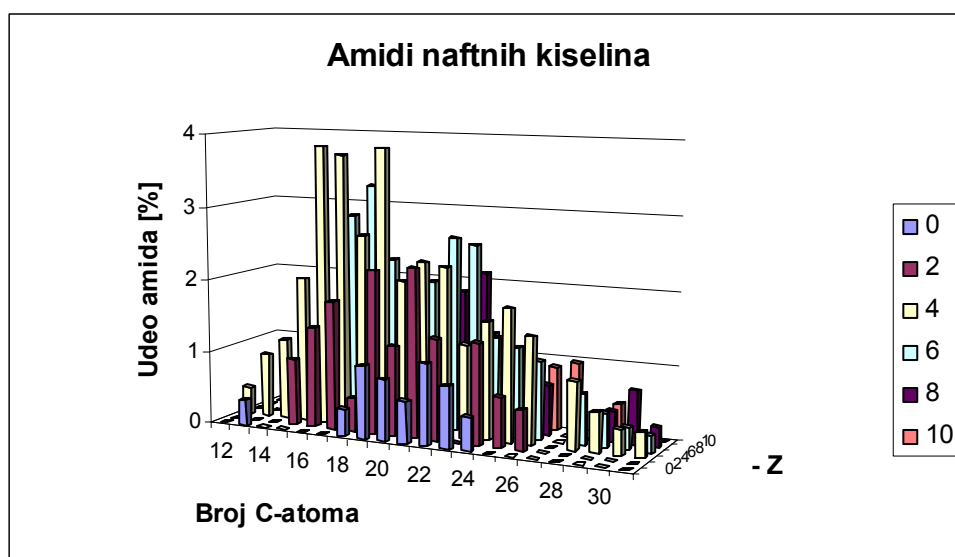
Navedene činjenice su podstakle i usmerile dalja razmišljanja da bi se uvođenjem amino grupe u molekul, odnosno da bi se N-acilacijom amina sa naftnim kiselinama dobili derivati koji bi mogli biti fiziološki još aktivniji od kiselina i pogodniji za asimilaciju biljke jer su amidni derivati rastvorljiviji a amino grupa je integrisana u mnoge biološki aktivne strukture.

Sinteza amida naftnih kiselina rađena je prevođenjem kiselina prvo u hloride a zatim reakcijom sa amonijakom u amide naftnih kiselina. Prinos čistih amida je 65.74%, a reakcija amidacije iz hlorida naftnih kiselina sa amonijakom trajala je petnaest minuta.

U IR spektru sintetizovanih amida naftnih kiselina uočava se dublet traka na 3350 i 3194 cm⁻¹ koje potiču od valencionih asimetričnih i simetričnih vibracija (ν CONH₂), traka u položaju 1659-1612 cm⁻¹ (ν C=O) određuje prisustvo amidne funkcije, a takođe i trake na 1408 cm⁻¹ (δ NH) i 1132 cm⁻¹ (ν CN) dodatno asigniraju sintetizovanu CONH₂ grupu. Gubitak traka na 3500-3000 i 2800-2500 cm⁻¹ (ν O-H) potvrđuju nestanak OH grupe u karboksilnoj funkcionalnoj grupi, a gubitak trake u intervalu 1704-1708 cm⁻¹ od valencionih vibracija dimerizovane karbonilne grupe (ν C=O) iz karboksilne potvrđuje hemijsku transformaciju. Na prisustvo amidne funkcije u ¹H NMR spektru amidnih derivata naftnih kiselina ukazuje razdvojen i vrlo razvučen signal na δ_H 5.49-6.95 ppm (HN-C=O). U ¹³C NMR spektru prisustvo amidne funkcije asignano je na δ_C 176.72-175.85 ppm (C=ONH₂).

Tabela 3.7. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za amide naftnih kiselina sintetizovanih iz hlorida sa amonijakom

ESI HPLC-MS $m/z = [M+H]^+$:	
•	alkanska serija (Z= 0): 5.6%; 13-24 C; $m/z = 214; 284; 298; 312; 326; 340; 354; 368$.
•	monociklična serija (Z= 2): 14.3%; 15-26 C; $m/z = 240; 254; 268; 282; 296; 310; 324; 338; 366; 380; 394$.
•	biciklična serija (Z= 4): 33.4%; 12-31 C; $m/z = 196; 210; 224; 252; 266; 280; 294; 308; 322; 336; 350; 364; 378; 392; 420; 434; 448; 462$.
•	triciklična serija (Z= 6): 24.6%; 15-31 C; $m/z = 236; 250; 264; 278; 292; 306; 320; 334; 348; 362; 376; 390; 418; 432; 446; 460$.
•	tetraciklična serija (Z= 8): 14.3%; 16-31 C; $m/z = 248; 262; 276; 290; 304; 318; 332; 346; 360; 374; 388; 430; 444; 458$.
•	pentaciklična serija (Z= 10): 7.7%; 21-29 C; $m/z = 316; 330; 344; 358; 372; 386; 400; 428$.



Slika 3.11. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u pozitivnom jon modalitetu ESI za amide naftnih kiselina

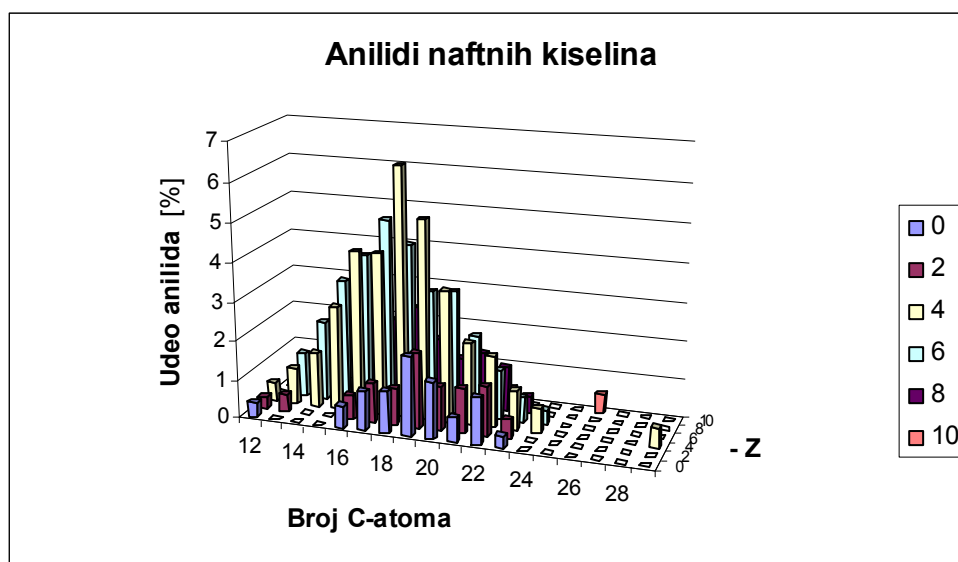
Analizom ESI HPLC-MS spektra (Slika 7.43., Tabela 3.7., Slika 3.11., Tabela 4.8.) određeno je prisustvo amida naftnih kiselina od C 12-C 31 atoma u molekulu kiseline. Dominantne su biciklične i triciklične klase kiselina što je u potpunoj saglasnosti sa masenim udelom tih klasa kiselina u smeši slobodnih kiselina (Slika 3.11.), i što je vrlo bitno iz spektra se vidi da je njihovo prevođenje u amide potpuno izvršeno. Masne, odnosno aciklične klase kiselina (Z= 0) su u ovoj sintezi najnereaktivnije jer ih u smeši reaktanta ima 10.57% a nakon amidacije zastupljene su samo sa 5.6%.

Sinteza anilida naftnih kiselina rađena je prevođenjem naftnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa anilinom u anilide naftnih kiselina. Prinos čistih anilida je 96.48%, a reakcija amidacije iz hlorida naftnih kiselina anilinom trajala je trideset minuta.

U IR spektru sintetizovanih anilida naftnih kiselina uočava se dublet traka od 3350-3260 cm^{-1} koje potiču od vibracija C-N veze u amidnoj grupi ($\nu_{\text{as}} \text{CN}$), a odsustvo traka na 3500-3000 cm^{-1} i 2800-2500 cm^{-1} ($\nu \text{O-H}$) ukazuje na odsustvo OH grupe, odnosno karboksilne funkcionalne grupe. Traka u položaju 1659 cm^{-1} ($\nu \text{C=O}$) određuje prisustvo anilidne funkcionalne grupe, a na 1600 cm^{-1} traka potiče od skeletnih vibracija aromatičnog jezgra ($\nu \text{C-C Ar}$). Trake od 1377-1251 cm^{-1} potiču od valencionih asimetričnih vibracija veze azotovog atoma sa aromatičnim ugljenikovim atomom ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}\text{-N}$). U ^1H NMR spektru anilida prisutni su signali na δ_{H} 6.62-7.28 ppm od vodonika iz aromatičnog jezgra i na δ_{H} 7.58-8.20 ppm od vodonika iz NH grupe. U ^{13}C NMR spektru signali na δ_{C} 119.98-128.69 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H-Ar}$) i δ_{C} 138.12 ppm ($\underline{\text{C}}\text{-Ar}$) potvrđuju prisustvo supstituisanog aromatičnog jezgra, a na δ_{C} 171.73-175.20 ppm asignirana je C=O anilidna funkcija.

Tabela 3.8. ESI HPLC-MS Spektralni podaci za anilide naftnih kiselina sintetizovanih iz hlorda sa anilinom

ESI HPLC-MS $m/z = [\text{M}+\text{H}]^+$:	
•	alkanska serija ($Z=0$): 8.8%; 12-23 C; $m/z=298; 354; 368; 382; 396; 410; 424; 438; 452$.
•	monociklična serija ($Z=2$): 9.4%; 12-23 C; $m/z=296; 310; 352; 366; 380; 394; 408; 422; 436; 450$.
•	biciklična serija ($Z=4$): 35.1%; 12-29 C; $m/z=294; 308; 322; 336; 350; 364; 378; 392; 406; 420; 434; 448; 462; 532$.
•	triciklična serija ($Z=6$): 30.3%; 13-24 C; $m/z=306; 320; 334; 348; 362; 376; 390; 404; 418; 432; 446; 460$.
•	tetraciklična serija ($Z=8$): 11.6%; 16-23 C; $m/z=346; 360; 374; 388; 402; 416; 430; 444$.
•	pentaciklična serija ($Z=10$): 4.8%; 18-26 C; $m/z=372; 386; 400; 414; 428; 484$.



Slika 3.12. Trodimenzionalni dijagram HPLC-MS analize u pozitivnom jon modalitetu ESI za anilide naftnih kiselina

Analizom ESI HPLC-MS spektra (Slika 7.47., Tabela 3.8., Slika 3.12., Tabela 4.9.) vidi

se prisustvo anilida naftnih kiselina od C 12- C 29 atoma u molekulu. Dominantne su biciklične i triciklične klase anilida što je u saglasnosti sa masenim udelom tih klasa kiselina u smeši slobodnih kiselina (Slika 3.11.). Iz spektra se vidi da je amidacija acikličnih i monocikličnih naftnih kiselina tekla najteže, jer se njihov maseni udeo u smeši anilida značajno smanjio.

Reakcioni supstrat u ovim sintezama je smeša karboksilnih kiselina sa determinisanih šest Z-serija kiselina u rasponu prosečnih masa od 200-460 (C 12-31). U prvom delu naših radova je utvrđeno da one imaju vrlo veliki raspon kiselosti što podrazumeva i značajnu strukturnu raznolikost, pa je stoga očekivano da pojedini konstituenti ukupne smeše kiselina reaguju teže od drugih što može da utiče na prinos, odnosno na reaktivnost u celini. Sa aspekta daljih planova rada, odnosno za ispitivanje biološke aktivnosti određenih derivata što je i krajnji cilj rada u ovoj oblasti, strukturna promena smeše kiselina tokom derivatizacije mogla bi biti od ključnog značaja jer bi tako mogle da se izdiferenciraju aktivne supstance bilo u pozitivnom ili negativnom smislu. Zato je ESI HPLC-MS analiza dala dragocene podatke vezane za svaku pojedinačnu reakciju. U slučaju sinteze amida i anilida i prinosi su sasvim zadovoljavajući (amidi 65.74%, anilidi 96.48%), a uvid u sastav sintetizovanih azotnih derivata potvrđuje približno isti sastav kao i sastav kiselina.

3.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA NAFTENSKOG TIPA I NJIHOVIH DERIVATA

3.3.1. HORMONSKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA AUKSINSKOG TIPA

Iz ranijih radova^{93,94,72} i literaturnih podataka^{10,95,52-57} poznata je biološka aktivnost naftnih kiselina naftenskog tipa. Do sada je uglavnom ispitivana auksinska aktivnost naftenskih kiselina iz srednjih i viših uljnih destilata vojvođanske nafte „*Velebit*” i sintetičkih naftnih kiselina sintetizovanih oksidacijom iz naftenskih ugljovodonika iste nafte.

U ovom radu detaljno je ispitana hormonska auksinska aktivnost naftenskih kiselina izolovanih iz atmosferskog gasnog ulja nafte „*Velebit*”. U tu svrhu rađena su tri *in vitro* biološka testa.

Prvi, „*Koleoptil test*”, rađen je na dva supstrata, odnosno na semenu ozime pšenice novosadske sorte *Partizanka*^{89,96} i jare pšenice takođe novosadske sorte *Venera*. Dobijene vrednosti za hormonsku aktivnost utvrđenu „*Koleoptil testom*” upoređivane su sa efektima koji pokazuju sintetički auksinski biljni hormon α -naftilsirćetna kiselina (NAA) i prirodni auksinski biljni hormon 3-indolsirćetna kiselina (IAA).

Drugi, „*Test inhibicije klijanja*” semena rađen je sa semenom crne slačice, *Brassica nigra*, a rezultati su upoređivani sa vrednostima inhibicije koje se ostvaruju dejstvom prirodnog biljnog hormona, odnosno sa 3-indolsirćetnom kiselinom.

Treći, hormonski auksinski test kojim se utvrđuje aktivnost naftnih kiselina je „*Hipokotil test*”. Ovaj test rađen je na semenu krastavaca sorte *Tajfun*, meren je prirast mase hipokotila krastavca pod uticajem različitih koncentracija naftenskih kiselina. Rezultati su upoređivani sa uticajem 3-indolsirćetne kiseline na porast mase hipokotila semena krastavca.

3.3.1.1. HORMONSKA AKTIVNOST UTVRĐENA „*Koleoptil testom*”

Hormonska aktivnost naftenskih kiselina analogna auksinima potvrđena „*Koleoptil testom*” izvođena je sa dva različita genotipa pšenice *Venera* i *Partizanka* a poređenje je vršeno u jednom testu sa sintetičkim biljnim hormonom α -naftilsirćetnom kiselinom a u drugom sa prirodnim biljnim auksinskim hormonom 3-indolsirćetnom kiselinom.

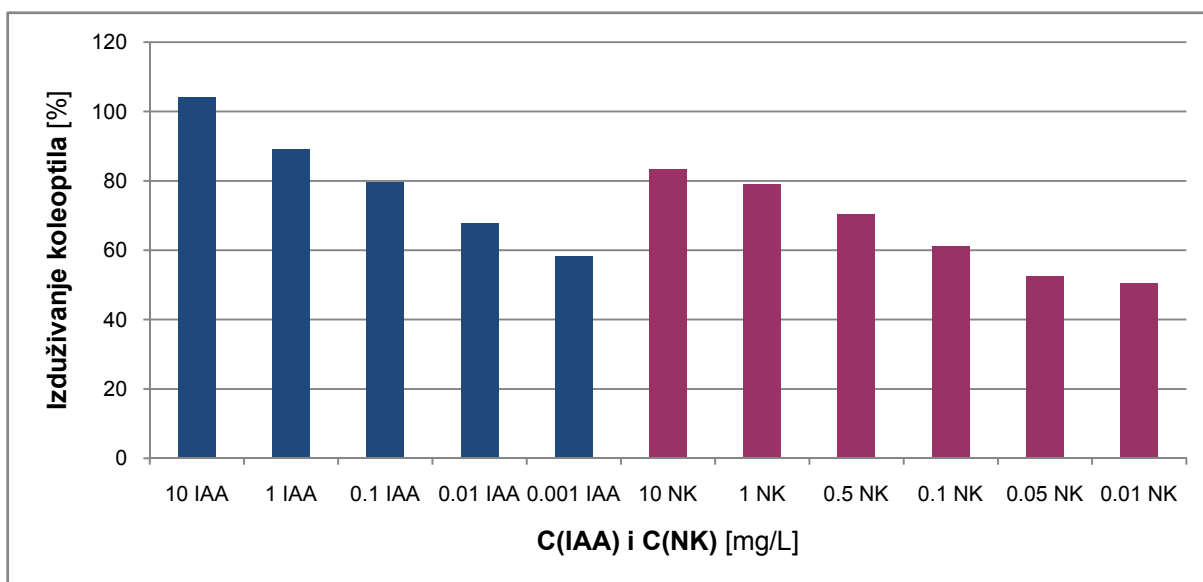
U testu sa ozimom pšenicom sorte *Partizanka* kao supstratom, rezultati su upoređivani sa sintetičkim hormonom α -naftilsirćetnom kiselinom (Tabela 3.9.). Semena pšenice, približno iste veličine, se drže u termostatu na 26°C na vlažnoj filter-hartiji, u mraku, 4 dana. Odaberu se koleoptili približno iste dužine (15 mm) i na rastojanju od po 2 mm od vrha seku se segmenti dužine 5 mm. Ovi segmenti u grupama od po 10 komada se nižu na staklene kapilare. Tri probe i kontrola se postavljaju u isto vreme. U svim slučajevima osnovni medijum je 0.1 mol/L rastvor saharoze. Kontrola je rađena sa destilovanom vodom, a probe sa istim zapreminama kalijumovih soli ispitivanih kiselina u koncentracijama: 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} mol/L. Upoređivanje je rađeno sa vodenim rastvorom α -naftilsirćetne kiseline (3.9 mL, 1×10^{-4} mol/L).

Tabela 3.9. Auksinska aktivnost vodenih rastvora kalijum-naftenata iz atmosferskog gasnog ulja nafte „Velebit” utvrđena „Koleoptil testom”, rađena sa semenom vojvođanske pšenice *Partizanka*

Koncentracija K-naftenata [mol/L]	Porast koleoptila [%]
1×10^{-5}	2.80
1×10^{-6}	9.20
1×10^{-7}	20.01
Koncentracija α -naftilsirćetne kiseline [mol/L]	Porast koleoptila [%]
1×10^{-4}	43.00

Naftenske kiseline su u niskim koncentracijama pokazale pozitivan fiziološki efekat, odnosno kalijumove soli naftenskih kiselina koncentracije 10^{-7} mol/L (0.05 mg/L) u auksinskom testu izazivaju najveću elongaciju koleoptila pšenice, čak za 20.01%. U poređenju sa α -naftilsirćetnom kiselinom koja spada u sintetske hormone rasta biljaka i ostvaruje elongaciju u ovom testu 43.0% naftenske kiseline bi se mogle svrstati u klasu srednje aktivnih supstanci^{89,96}.

U testu sa ozimom jaram pšenicom sorte *Venera* kao supstratom, rezultati su upoređivani sa auksinskom aktivnošću 3-indolsirćetne kiseline koja je prirodni biljni hormon. Test je izvođen u mraku uz svakodnevno zalivanje dva dana. Sečenje koleoptila se radi pod zelenim svetlom. Iz segmenata se izgura prvi list i segmenti se stavljaju u bočice sa rastvorima određenih koncentracija 3-indolsirćetne kiseline, kalijumovih soli naftenskih kiselina ili vode (kontrola) uz dodatak rastvora saharoze da koncentracija saharoze bude 1% (25%; 160 μ L).



Slika 3.13. Auksinska aktivnost vodenih rastvora kalijum-naftenata utvrđena „Koleoptil testom”, rađena sa semenom pšenice *Venera*

- 10 IAA-0.001 IAA (tretmani sa IAA): 10.0; 1.0; 0.10; 0.01; 0.001 [mg/L]
- 10 NK-0.01 NK (tretmani sa NK): 10.0; 1.0; 0.50; 0.10; 0.05; 0.01 [mg/L]

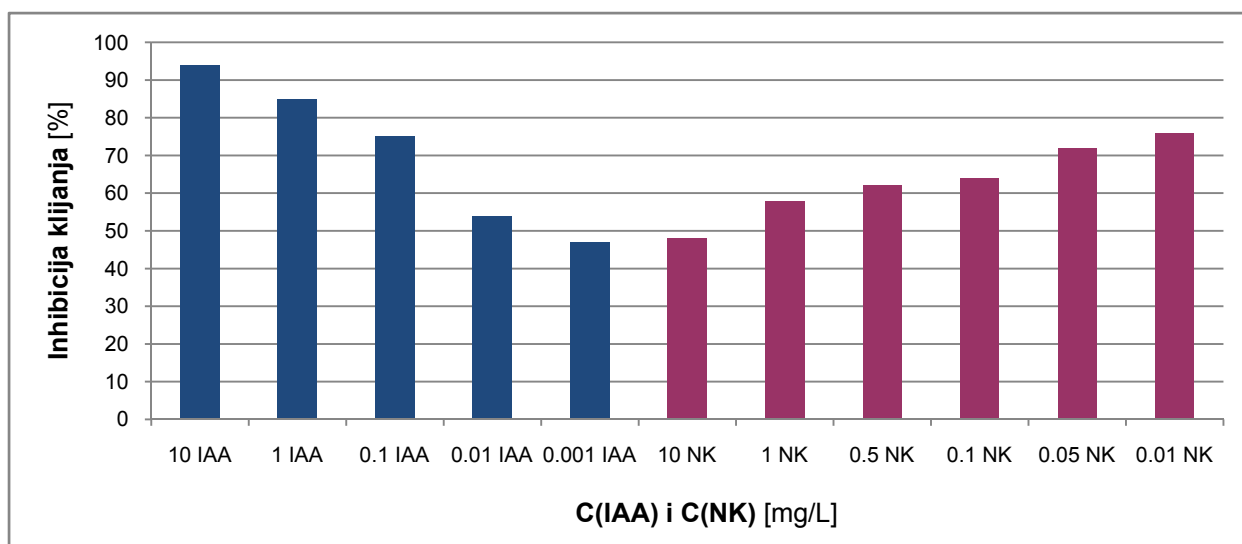
Kao što se iz gornjeg teksta vidi „*Koleoptil testovi*” su rađeni *in vitro* a rezultati su poređeni u prvom testu sa α -naftilsirćetnom kiselinom (sintetičkim biljnim hormonom rasta), a u drugom sa 3-indolsirćetnom kiselinom (prirodnim biljnim hormonom rasta). U oba slučaja je dobijena stimulatívna aktivnost, iako različita u apsolutnim vrednostima, ali u suštini u oba testa ustanovljen je približno isti odnos aktivnosti rastvora naftenskih kiselina i aktivnosti standardnih biljnih hormona. Naftenske kiseline u koncentraciji 1.0 mg/L su pokazale aktivnost kao IAA koncentracije 0.10 mg/L (Slika 3.13., Tabela 4.10.).

Takav relativni odnos aktivnosti naftenskih kiselina i auksinskih biljnih hormona svrstava naftenske kiseline u klasu aktivnih hormonskih supstanci, odnosno one se mogu uvrstiti u srednje aktivne analoge hormona rasta auksinskog tipa.

3.3.1.2. HORMONSKA AKTIVNOST UTVRĐENA „*Testom inhibicije klijanja*”

Hormonska aktivnost naftenskih kiselina proveravana je takođe *in vitro* „*Testom inhibicije klijanja*”. Test je rađen na semenu slačice (*Brasscia nigra*). Najveću inhibiciju pokazali su vodeni rastvori kalijum-naftenata u opsegu koncentracija 10^{-6} - 10^{-8} mol/L (1.0-0.01 mg/L), što se poklapa sa rezultatima „*Koleoptil testa*” sa ozimom pšenicom *Partizanka*.

Testovi su izvedeni tretiranjem semena slačice različitim koncentracijama kalijumovih soli naftenskih kiselina 10.0-0.01 mg/L (10^{-5} - 10^{-8} mol/L), poređenje je rađeno sa aktivnošću 3-indolsirćetne kiseline u opsegu koncentracija 10.0-0.001 mg/L (10^{-5} - 10^{-9} mol/L). Semena slačice *Brasscia nigra* rasporede se u *Petri* posude. Klijanje se izvodi u mraku, u zaklopljenim posudama. Nakon isključavanja semena se prebroje u svim ispitivanim rastvorima.



Slika 3.14. Auksinska aktivnost vodenih rastvora kalijum-naftenata utvrđena „*Testom inhibicije klijanja*”, rađena sa semenom slačice *Brasscia nigra*

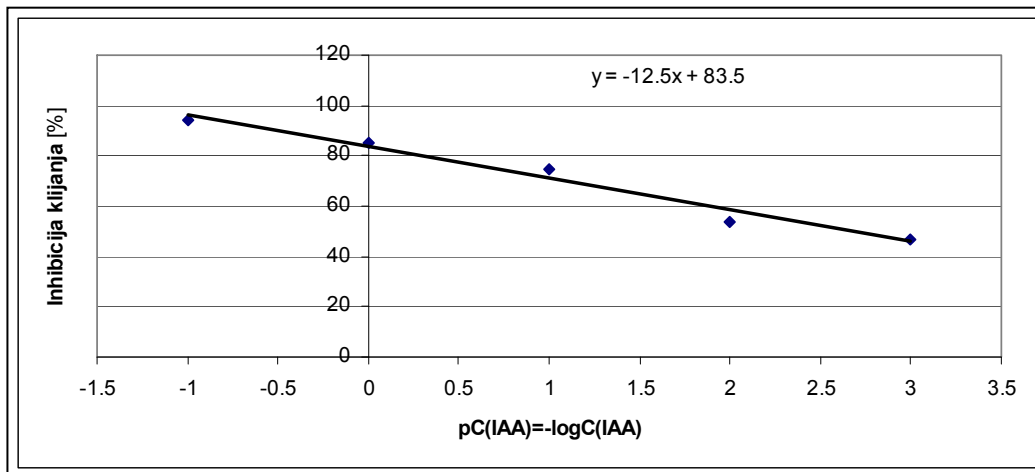
- 10 IAA-0.001 IAA (tretmani sa IAA): 10.0; 1.0; 0.10; 0.01; 0.001 [mg/L]
- 10 NK-0.01 NK (tretmani sa NK): 10.0; 1.0; 0.50; 0.10; 0.05; 0.01 [mg/L]

Na osnovu broja isključanih semena slačice nakon tretiranja rastvorom naftnih kiselina vidi se da je najveći uticaj naftenskih kiselina na inhibiciju klijanja postignut u rasponu koncentracija kiselina od 10^{-7} - 10^{-8} mol/L (0.05-0.01 mg/L), znači inhibitorni efekat,

odnosno auksinski efekat delovanjem naftenskih kiselina se ispoljava najviše pri nižim koncentracijama kiselina (Slika 3.14., Tabela 4.11.), što je u saglasnosti sa rezultatima testa datim u tabeli 3.9..

Tabela 3.10. Matematička relacija procenta inhibicije klijanja semena slačice izazvane rastvorima određenih koncentracija 3-indolsirćetne kiseline i $-\log C(\text{IAA})$, odnosno $pC(\text{IAA})$

$C(\text{IAA})$ [mg/L]	Inhibicija klijanja [IAA, %]	$pC(\text{IAA})$
10	94	-1
1	85	0
0.1	75	1
0.01	54	2
0.001	47	3



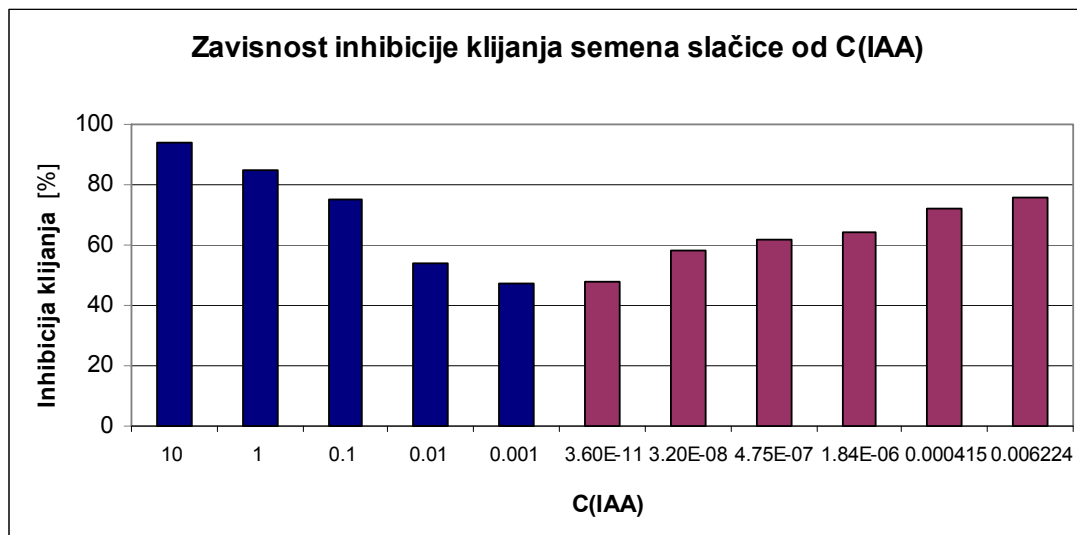
Slika 3.15. Zavisnost inhibicije klijanja slačice od $-\log C(\text{IAA})$

Linearna zavisnost inhibicije klijanja semena slačice od koncentracije 3-indolsirćetne kiseline (Slika 3.15.), dobijena preko $-\log C(\text{IAA})$ iz tabele 3.10., potvrđuje pravilno povećanje procenta inhibicije sa porastom koncentracije 3-indolsirćetne kiseline.

Izračunavanjem, pomoću jednačine $y = -12.5x + 83.5$ (Slika 3.15.), uspostavljena je relacija između procenata inhibicije klijanja semena slačice izazvane koncentracijama naftnih kiselina sa koncentracijama 3-indolsirćetne kiseline sa istim efektom inhibicije (Tabela 3.10. i 3.11., Slika 3.16.).

Tabela 3.11. Matematički izračunata relacija aktivnosti naftnih kiselina u odnosu na IAA

$C(\text{NK})$ [mg/L]	Inhibicija klijanja [NK, %]	$pC(\text{IAA})$ (izr.)	$C(\text{IAA})$ (izr.) [mg/L]
10	48	10.4410	3.62096E-11
1	58	7.5000	3.16228E-08
0.5	62	6.3235	4.74756E-07
0.1	64	5.7353	1.83953E-06
0.05	72	3.3824	0.000414617
0.01	76	2.2059	0.006224689

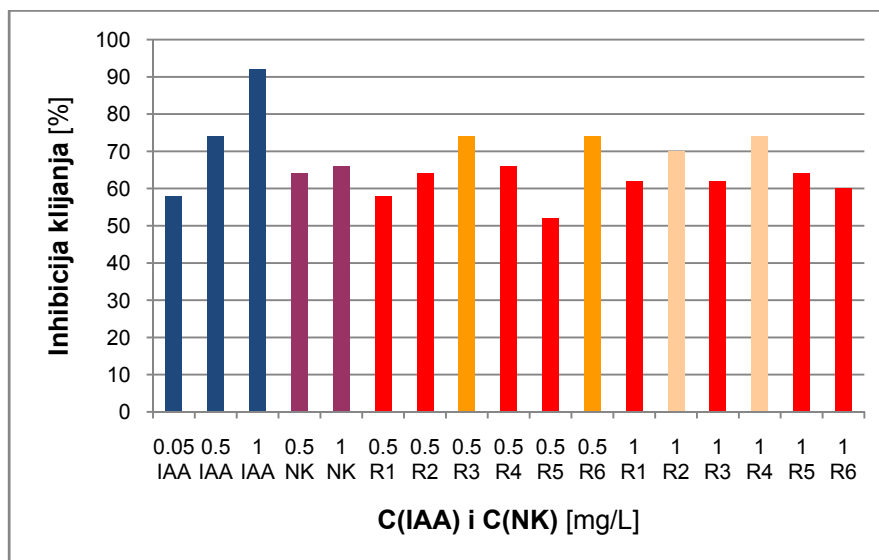


Slika 3.16. Aktivnosti naftnih kiselina predstavljene preko koncentracija IAA

Na slici 3.17. predstavljeni su rezultati „*Testa inhibicije klijanja*” semena slačice za ukupne naftne kiseline i za šest užih frakcija dobijenih iz smeše ukupnih kiselina razdvajanjem na bazi različite rastvorljivosti pri različitim pH vrednostima kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Tako je dobijeno šest užih frakcija. Oznake od R1–R6 se odnose na frakcije naftnih kiselina odgovarajućih pH vrednosti (Tabela 3.12.).

Tabela 3.12. pH Vrednosti frakcija naftenskih kiselina

Frakcija kiseline	R1	R2	R3	R4	R5	R6
pH Vrednost	12	10	8	7	4	2



Slika 3.17. Auksinska aktivnost vodenih rastvora ukupnih kalijum-naftenata i šest užih frakcija utvrđena „*Testom inhibicije klijanja*”, rađena sa semenom slačice *Brassica nigra*

- 0.05 IAA-1 IAA (tretmani sa IAA): 0.05; 0.50; 1.0 [mg/L]
- 0.5 NK-1 NK (tretmani sa ukupnim NK): 0.50; 1.0 [mg/L]
- 0.5 R1-0.5 R6 (tretmani sa frakcijama NK): 0.50 [mg/L]
- 1 R1-1 R6 (tretmani sa frakcijama NK): 1.0 [mg/L]

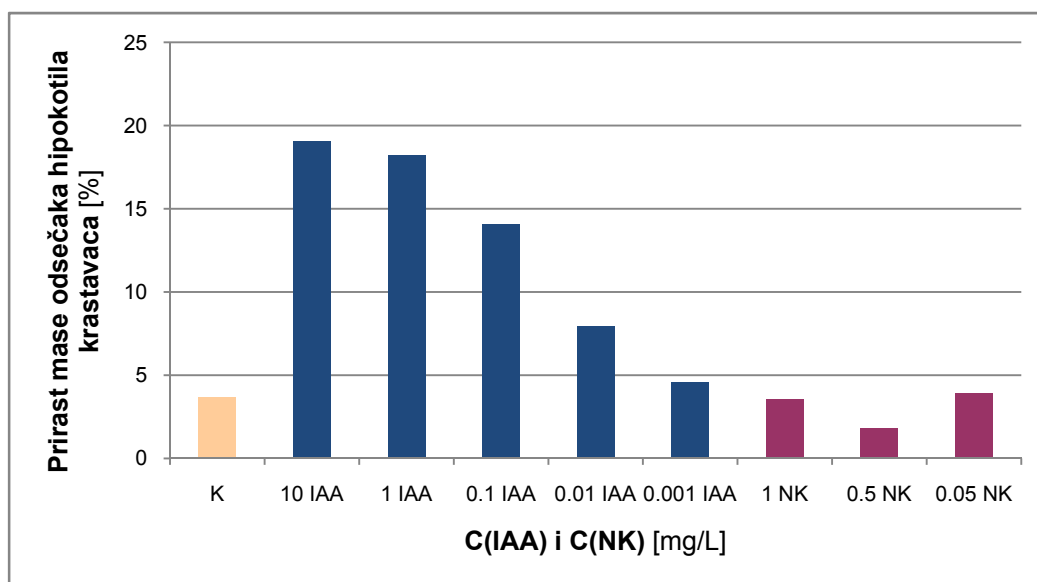
Ukupne naftne kiseline u odnosu na 3-indolsirćetnu kiselinu kao prirodni biljni hormon imaju ukupno nešto manji procenat inhibicije. Ovim testom je utvrđeno da je frakcionacijom kiselina po pH vrednostima došlo do razdvajanja kiselina tako da neke od tih frakcija R3 (0.5 mg/L) i R6 (0.5 mg/L) pokazuju istu aktivnost kao 3-indolsirćetna kiselina (0.5 mg/L), a frakcija R4 je takođe aktivna ali u poređenju sa 3-indolsirćetnom kiselinom to je 10 puta niža aktivnost.

Kako se iz masenih spektara niske rezolucije ovih užih frakcija kiselina vidi (Slika 7.8., 7.10. i 7.12.) te uže smeše kiselina imaju strukturnih razlika pa je logično i da se pojavljuju razlike u biološkoj aktivnosti. Bitno je takođe naglasiti da su upravo navedene frakcije pokazale veći procenat inhibicije u odnosu na ukupne naftne kiseline.

3.3.1.3. HORMONSKA AKTIVNOST UTVRĐENA „*Testom prirasta mase hipokotila*”

„*Hipokotil testom*” je praćena auksinska aktivnost merenjem prirasta mase hipokotila krastavaca nakon njihovog tretmana različitim koncentracijama kalijumovih soli naftenskih kiselina i upoređivana je sa aktivnošću 3-indolsirćetne kiseline kao prirodnog hormona rasta biljaka⁹⁷.

Seme krastavaca sorte *Tajfun* klija u termostatu (u mraku, na 25⁰C) na vlažnoj papirnoj podlozi. Nakon 4-5 dana izdanci dostignu potrebnu dužinu (5 do 8 cm), i tada se seku odsečci hipokotila dužine 10 mm koji se zatim peru, suše i meri se masa u grupama od po 10 komada. Ispiranje, sušenje i merenje hipokotila izvodi se pri fluorescentnoj svetlosti. Odmereni odsečci se zatim tretiraju rastvorima 3-indolsirćetne kiseline i kalijumovih soli naftenskih kiselina u standardnom medijumu. Nakon 6 h blagog treskanja na temperaturi od 25⁰C, odsečci se vade, suše i meri se povećanje mase tretiranih odsečaka hipokotila.



Slika 3.18. Porast mase hipokotila pod uticajem naftenskih kiselina

- K: kontrola (standardni medijum)
- 10 IAA-0.001 IAA (tretmani sa IAA): 10.0; 1.0; 0.10; 0.01 ; 0.001 [mg/L]
- 1 NK-0.05 NK (tretmani sa NK): 1.0; 0.50; 0.05 [mg/L]

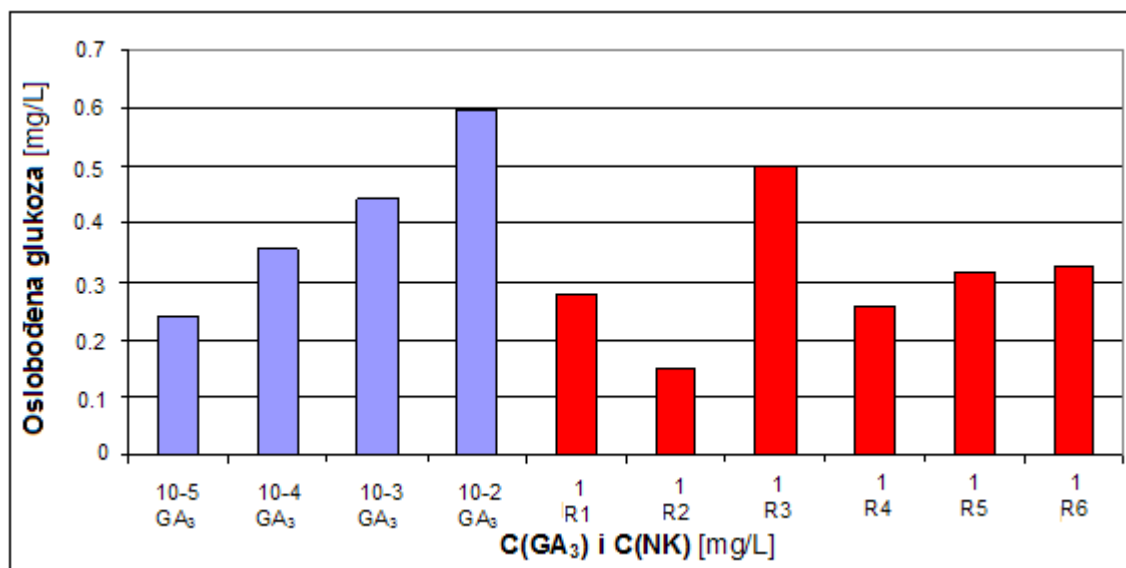
U ovom testu auksinskog tipa praćenjem porasta mase hipokotila kod semena krastavaca naftenske kiseline ne pokazuju povećanu aktivnost, znači da im je delovanje

na nivou kontrole, odnosno za koncentraciju 0.5 mg/L (10^{-6} mol/L) naftenskih kiselina utvrđena je blaga redukcija mase hipokotila nakon tretiranja (Slika 3.18., Tabela 4.12.). Ovaj test nije dao afirmativne rezultate za auksinsku aktivnost naftenskih kiselina kao prethodna dva, ali je koristan pokazatelj da se naftenske kiseline ne mogu koristiti za stimulaciju klijanja svih biljnih vrsta. Naime, poznato je da neke vrste semena sa kraćim vremenom klijavosti nisu osetljive na uticaj egzogenih hormona rasta, što je ovde potvrđeno.

3.3.2. HORMONSKA AKTIVNOST NAFTNIH KISELINA GIBERELINSKOG TIPRA UTVRĐENA „*Endosperm testom*”

U našim ranijim radovima utvrđena je visoka biološka aktivnost giberelenskog tipa naftenskih kiselina izolovanih iz vojvođanske nafte „*Kelebija*”⁷⁸. U ovom radu ispitivanja su rađena *in vitro* testovima na semenu ječma *Hordeum vulgare*. Poređenje nivoa aktivnosti naftenskih kiselina vršeno je određivanjem aktivnosti rastvora giberelinske kiseline (GA_3), najzastupljenijim prirodnim biljnim hormonom iz grupe giberelina. Ovi testovi su zasnovani na određivanju kvantitativnih biohemijskih parametara u semenu žitarica pod uticajem kalijum-naftenata. Potapanjem semena ječma u rastvor kalijumovih soli naftenskih kiselina koncentracije 10^{-7} mol/L značajno je stimulisana sinteza amilaze. Ta aktivnost se može kvantitativno pratiti spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije redukujućih šećera. Tretiranjem semena rastvorom naftenskih kiselina viših koncentracija (10^{-2} i 10^{-3} mol/L) utvrđena je inhibicija sinteze amilaze, a pozitivnu aktivnost pokazuju tek tretmani sa rastvorom naftenskih kiselina koncentracije 10^{-6} - 10^{-7} mol/L⁷².

„*Endosperm testom*” određivana je aktivnost amilaze spektrofotometrijskim praćenjem povećanja koncentracije redukujućih šećera u endospermu semena tretiranog ječma. Odabrana zrna se nakon sterilizacije kalcijum-hipohloritom seku poprečno 3 mm od kraja, delovi endosperma se mere u grupama od po 4 komada i inkubiraju 48 h na 30°C u 14 x 50 mm zatvorenim bočicama koje sadrže 1.00 mL testiranog rastvora i 300 µg streptomycin-sulfata. Rade se tri probe svakog tretmana. U kontroli je primenjena ista koncentracija giberelinske kiseline, GA_3 . Uticaj kalijum-naftenata na aktivnost α -amilaze u endospermu odražava se povećanjem koncentracije redukujućih šećera, a to se registruje spektrofotometrijski (na 520 nm) i rezultati se izražavaju u mg-ekvivalentima glukoze. Ove vrednosti se upoređuju sa aktivnošću GA_3 .



Slika 3.19. Giberelinska aktivnost vodenih rastvora frakcija naftenskih kiselina utvrđena „Endosperm testom”, rađena na semenima ječma *Hordeum vulgare*

- 10-5 GA₃-10-2 GA₃ (tretmani sa GA₃): 10⁻⁵; 10⁻⁴; 10⁻³; 10⁻² [mg/L]
- 1 R1-1 R6 (tretmani sa frakcijama NK): 1.0 [mg/L]

Pošto se giberelinska aktivnost ispoljava povećanjem koncentracije redukujućih šećera u endospermu semena u ispitivanom testu se vidi (Slika 3.19.) da delovanjem vodenih rastvora užih frakcija naftenskih kiselina u koncentraciji 1.0 mg/L (3.5×10^{-6} mol/L) frakcija izolovana pri pH 8 (R3) ima aktivnost koja je približno u opsegu aktivnosti giberelina koncentracije 10⁻²-10⁻³ mg/L, a frakcije R5 i R6 (izolovane pri pH 4 i 2) po aktivnosti odgovaraju GA₃ koncentracije 10⁻⁴ mg/L. Ovi rezultati pokazuju da je frakcionacijom došlo do koncentrisanja aktivnih struktura u uže frakcije, znači da se razlike koje se javljaju u fiziološkoj aktivnosti mogu pripisati strukturnim razlikama ispitivanih naftnih kiselina.

Ovim testovima utvrđeno je da se razdvajanjem fiziološki aktivnih smeša prirodnih naftnih kiselina mogu dobiti uže frakcije sa znatno većom aktivnošću što može imati veoma praktičan značaj.

Upoređivanjem rezultata dobijenih testom na auksine i testova na gibereline uočena je korelacija aktivnosti i sa strukturama naftenskih kiselina prisutnim u njihovim pojedinim frakcijama. Najveću auksinsku aktivnost pokazuju frakcije naftenskih kiselina R3 i R6 (Slika 3.17.) koje su izdvojene pri pH 8 i 2. Kiseline koje su frakciono izdvojene na pH 2 su jače, tj. kiseliije od onih koje su izdvojene na pH 8 i zbog toga se očekuje da su i srukturno različite. Iz masenih spektara niske rezolucije praćenjem fragmentnih serija to se može lepo uočiti.

3.3.3. OŽILJAVANJE BILJAKA

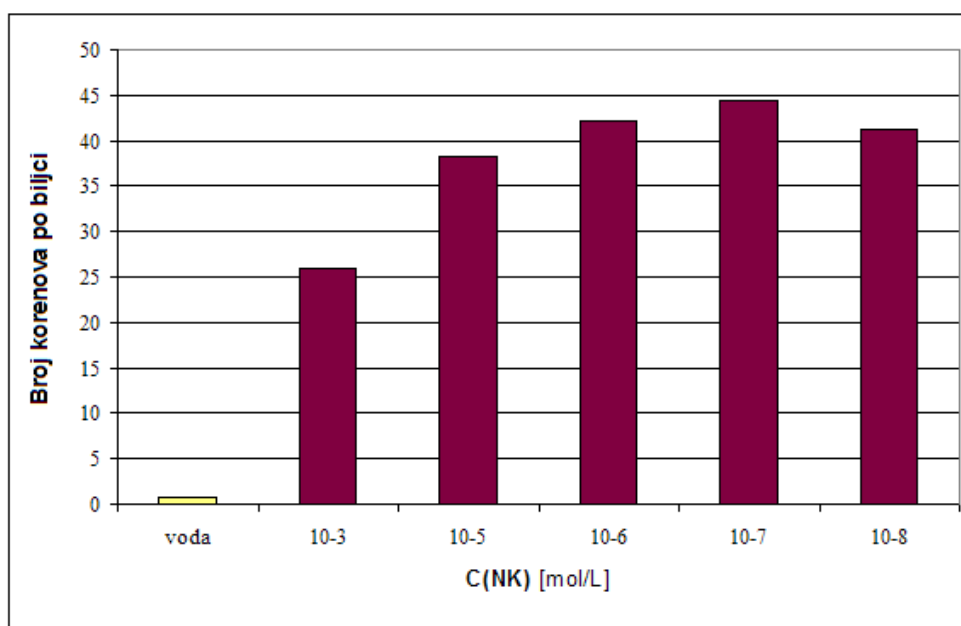
Razmnožavanje biljaka putem ožiljavanja reznica ne može se lako izvesti kod svih biljnih vrsta, to jest reznice biljaka raznih varijeteta i vrsta imaju različitu sposobnost ožiljavanja. Neke biljne vrste se lako ožiljavaju dok neke veoma teško i zahtevaju primenu različitih načina za stimulaciju ožiljavanja. Nije bilo poznato da li naftenske kiseline u obliku svojih soli i derivata mogu pospešivati ožiljavanje biljaka. Suština naše

pretpostavke je da pošto giberelini, kao hormoni rasta, aktiviraju sintezu amilopektina i amiloze da je takođe moguće očekivati da imaju uticaja i na pospešivanje formiranja adventivnih korenova kod reznica zeljastih i drvenastih biljaka.

Za ožiljavanje reznica naftenske kiseline se rastvore, u unapred određenoj koncentraciji, u toploj vodi (60°C) uz konstantno mešanje dodatkom baze (u ovom slučaju NaOH) dok se ne postigne pH rastvora 8. Primena ovog rastvora na odgovarajući način na reznice zeljastih⁹⁸ i drvenastih⁹⁹ biljaka dovodi do pospešivanja njihovog ožiljavanja i formiranja adventivnih korenova

3.3.3.1. OŽILJAVANJE REZNICA SUNCOKRETA

Mlade biljke suncokreta proizvedene su naklijavanjem semena u pesku i kasnijim prorastanjem ponika do visine od oko 15 cm i do formiranja klicinih listića-kotiledona i prvog para pravih listova. Odabranim poncima odstranjen je koren prerezivanjem na mestu gde je izbijao iz peska. Dobijene reznice ponika suncokreta, u grupama od deset komada, su potapane do visine od oko 6 cm u vodu i u rastvore različitih koncentracija preparata natrijumovih soli naftenskih kiselina (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} i 10^{-8} mol/L). Nakon 12 dana stajanja u komori (temperatura 20°C , vlažnost 80%, dan 12 sati noć 12 sati) i povremenog dolivanja vode da se nadokanadi isparena voda prebrojani su adventivni korenovi (svi koji su veći od 2 mm) i rezultati izraženi kao prosečni broj adventivnih korenova po biljci. Dobijeni rezultati su prikazni na slici 3.7..



Slika 3.20. Efikasnost ožiljavanja reznica suncokreta u zavisnosti od koncentracije natrijum-naftenata

Sa slike 3.20. se jasno vidi da rastvor natrijum-naftenata stimuliše formiranje adventivnih korenova a broj korenova po biljci je 40 puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor natrijum-naftenata u odnosu na one koje su bile potopljene u vodu. Najveći broj adventivnih korenova po biljci se formirao pri nižim koncentracijama natrijum-naftenata, tj. od 10^{-6} do 10^{-8} mol/L a razlike u broju korenova po biljci u tom opsegu koncentracija nisu bile signifikantne. Pri najvećoj koncentraciji natrijum-naftenata (10^{-3} mol/L) broj formiranih adventivnih korenova je bio znatno niži u poređenju sa brojem formiranim pri nižim koncentracijama, u proseku za 60%.

3.3.3.2. UKORENJIVANJE BOČNIH GRANA SUNCOKRETA

U *in vivo* testu korišćene su bočne grane biljaka suncokreta, nastale ukrštanjem u okviru roda *Helianthus*. Bočne grane su sa biljaka odsecane u fazi pojave prvog para listova, odnosno kada su dostigle dužinu od oko 3 cm. Nakon odsecanja grane su zabadane u pesak i u zavisnosti od varijante zalivane destilovanom vodom (kontrola) ili rastvorom preparata natrijumovih soli naftenskih kiselina u koncentraciji od 10^{-7} mol/L. Biljke su gajene u kontrolisanim uslovima, pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu 16 : 8 (svetlo : mrak). Nakon dve nedelje biljke su vađene iz peska i utvrđivano je prisustvo odnosno odsustvo korena, odnosno broj biljaka sa korenom od ukupnog broja postavljenih bočnih grana. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 3.21..



Slika 3.21. Uticaj natrijum-naftenata na ožiljavanje bočnih grana tri različita genotipa suncokreta

- 1; 3 i 5 biljke koje su tretirane sa rastvorom 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- 2; 4 i 6 biljke odgovarajućeg genotipa zalivane vodom (kontrola)

Na slici 3.21. se vidi pozitivan uticaj natrijum-naftenata na razvoj korena kod bočnih grana suncokreta, a naftne kiseline kao što se vidi pored razvoja korena, indirektno pozitivno utiču i na rast i razvoj biljaka. Procenat ožiljenih biljaka prilikom tretmana se kretao od 40 do 100% odnosno u proseku 78.5%.

3.3.3.3. OŽILJAVANJE REZNICA TOPOLE

Test je rađen *in vitro* na dve vrste topole. Radi ispitivanja mogućnosti primene rastvora natrijum-naftenata u ožiljavanju drvenastih biljaka sprovedeno je ožiljavanje reznica bele topole (*Populus alba*) i reznica američke crne topole (*Populus deltoides*). Reznice su potapane u rastvor natrijum-naftenata koncentracije 10^{-4} i 10^{-7} mol/L u kojima su stajale sve vreme eksperimenta. U drugoj varijanti reznice su potapane u rastvor natrijum-naftenata koncentracije 10^{-7} mol/L u trajanju od 1 sata ili 1 dana (24 sata) i nakon toga su premeštane u vodu i tako držane do kraja eksperimenta. Kao kontrolna varijanta za poređenje su služile reznice koje su bile potopljene u vodu sve vreme eksperimenta. Nakon isteka vremena eksperimenta (3 nedelje) izmerena je ukupna dužina korenčića, određen je ukupan broj korenčića po biljci kao i udeo korenčića rane u ukupnom broju korenčića. Dobijeni rezultati su prikazani u sledećim tabelama:

Tabela 3.13. Ožiljavanje reznica bele topole sorte *Populus alba*

Tretman	Ukupna dužina korenčića po biljci [cm]	Ukupan broj korenčića po biljci	Udeo korenčića na osnovnom rezu u ukupnom broju korenčića [%]	Udeo korenčića na osnovnom rezu i korenčića kore ukupno [%]
Reznice držane stalno u rastvoru Na-naftenata 10^{-4} mol/L	7.63	5.56	0.00	59.26
Reznice držane stalno u rastvoru Na-naftenata 10^{-7} mol/L	42.57	9.68	18.72	43.98
Reznice potapane u rastvor Na-naftenata 10^{-7} mol/L 1 dan a zatim držane u vodi	46.18	10.80	18.83	48.92
Reznice potapane u rastvor Na-naftenata 10^{-7} mol/L 1 sat a zatim držane u vodi	40.95	8.20	14.34	39.23
Kontrolne reznice držane u vodi	37.70	7.70	6.83	43.23

Tabela 3.14. Ožiljavanje reznica američke crne topole sorte *Populus deltoides*

Tretman	Ukupna dužina korenčića po biljci [cm]	Ukupan broj korenčića po biljci	Udeo korenčića na osnovnom rezu u ukupnom broju korenčića [%]	Udeo korenčića na osnovnom rezu i korenčića kore ukupno [%]
Reznice držane stalno u rastvoru Na-naftenata 10^{-4} mol/L	8.67	4.60	5.65	63.34
Reznice držane stalno u rastvoru Na-naftenata 10^{-7} mol/L	14.46	3.25	0.00	57.24
Reznice potapane u rastvor Na-naftenata 10^{-7} mol/L 1 dan a zatim držane u vodi	25.64	4.90	6.00	68.81
Reznice potapane u rastvor Na-naftenata 10^{-7} mol/L 1 sat a zatim držane u vodi	13.24	3.20	0.00	66.92
Kontrolne reznice držane u vodi	14.15	2.50	0.00	54.00

Dobijeni rezultati pokazuju da rastvor natrijum-naftenata koncentracije 10^{-7} mol/L značajno pospešuje formiranje adventivnih korenova kod reznica crne topole. Primena rastvora natrijum-naftenata koncentracije 10^{-4} mol/L je pokazala negativan efekat dok je pozitivan efekat dobijen sa nižom koncentracijom natrijum-naftenata. Natrijum-naftenati su doprineli povećanju ukupne dužine korenčića za 23% kod reznica bele topole a za 80% kod crne topole isto tako povećan je i ukupan broj korenčića za 40% kod bele topole a kod crne za skoro 100%. Od svih primenjenih tretmana (Tabela 3.13. i 3.14.) najbolji efekat je postignut sa jednodnevnom potapanjem reznica u rastvor preparata sa kasnijim čuvanjem u vodi. Ova činjenica je od velikog značaja za primenu navedenog preparata u praksi.

Uočen je jasan inhibitorni efekat na rast korenčića i izbojka u vodenom medijumu sa 10^{-4} mol/L naftenskih kiselina, dok za koncentraciju 10^{-7} mol/L značajna razlika od kontrole nije utvrđena. Tretman reznica koncentracijom 10^{-4} mol/L od jednog časa, nije značajnije uticao na parametre ožiljavanja, dok je tretman od 24 časa doprineo većem broju korenčića na donjih 5 cm reznice, kao i ukupnog broja korenčića nego kod kontrole. Pozitivan efekat na aktiviranje prvih izdanaka, kao i inhibitoran efekat na rast korenčića ukazuju na auksinski efekat ispitivanih soli naftenskih kiselina.

Korišćeni su klon bele topole (L-12, *Populus alba*, sekcija *Leuce*) i klon američke crne topole (S6-7, *Populus deltoides*, sekcija *Aigeiros*). Jednogodišnje šibe ožiljenice su proizvedene polovinom februara 2002.

Vodeni rastvor naftenskih kiselina u koncentraciji od 10^{-4} mol/L ostvario je stimulatívni efekat na broj korenčića kod klona S6-7, ali inhibitoran kod klona L-12. Ovo ukazuje na razlike u hormonalnom statusu reznica ova dva klona u smislu manje osetljivosti prema naftenskim kiselinama kod S6-7, i jače kod L-12. Ispitivani klonovi su genotipovi u eksperimentalnoj fazi, i pokazali su dobre rezultate u prinosu drvne mase. Pošto problemi u ožiljavanju ometaju rentabilnost rasadničke proizvodnje, kao i postizanje optimalne gustine zasada, ovi podaci ukazuju da bi se efikasnost zasada mogla povećati što znači i da bi se ovi klonovi mogli koristiti za proizvodnju biomase.

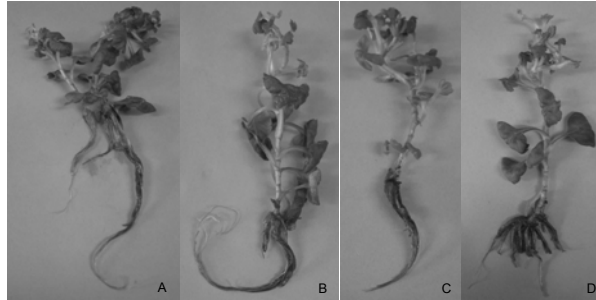
Danas se u rasadničkoj praksi koristi potapanje reznica u vodi u trajanju od jednog ili više dana u smislu poboljšanja ožiljavanja reznica topola. S obzirom da je jednodnevni tretman koncentracijom 10^{-4} mol/L dao najbolje efekte na ožiljavanje reznica crne topole dobijeni rezultati mogu imati praktičan značaj, u smislu korišćenja naftenskih kiselina kao sredstva za ožiljavanje reznica.

Genotip bele topole L-12 je na stalni tretman visokom koncentracijom soli naftenskih kiselina reagovao porastom broja korenčića na donjih 5 cm reznice, a genotip američke crne topole S6-7 smanjenjem pomenutog parametra, što je i najjasnija razlika među ispitivanim genotipovima u reakciji na sprovedene tretmane.

3.3.3.4. UKORENJIVANJE MIKROIZDANAKA HRIZANTEMA

Prethodni testovi formiranja korenova potvrđuju pozitivne efekte nižih koncentracija ukupnih naftenata. U *in vitro* testu ukorenjivanja mikroizdanaka kod hrizantema ispitivan je uticaj različitih koncentracija ukupnih natrijum-naftenata kao i njihovih užih frakcija razdvojenih na bazi različite rastvorljivosti na različitim pH vrednostima. Rezultati testa su upoređivani sa efektom koji se postiže tretmanom sa rastvorom 3-indolbuterne kiseline (IBA, 10 μ mol/L i više) i svi tretmani u kojima je koncentracija naftenskih kiselina bila 100 μ mol/L bili su na nivou kontrole.

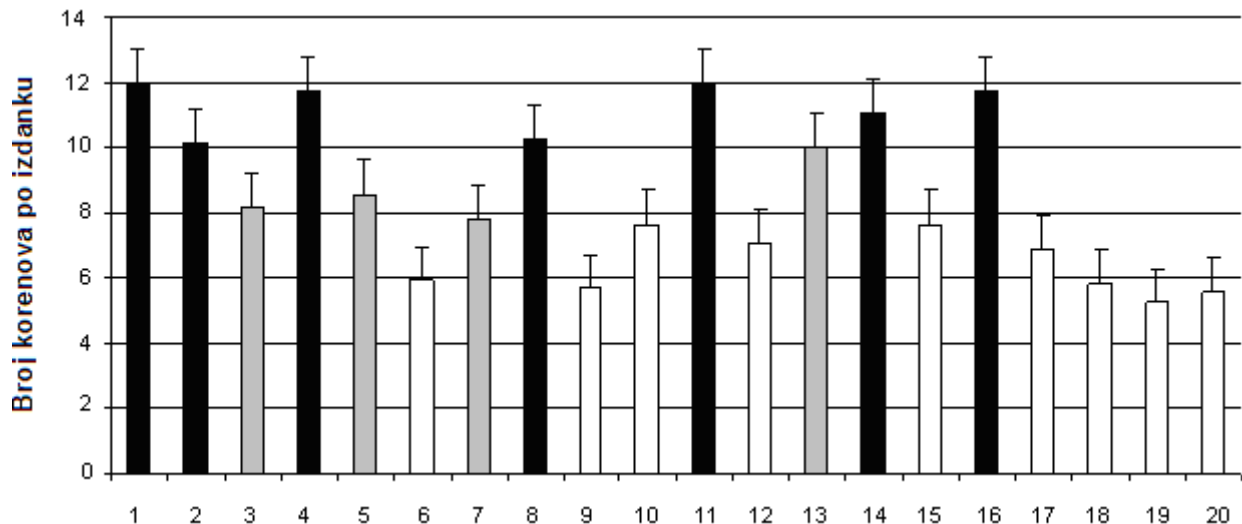
Ispitivani su efekti tri koncentracije (10, 50 i 100 $\mu\text{mol/L}$) naftenskih kiselina i njihovih užihih frakcija. Stimulacija ukorenjavanja je upoređivana sa efektom koji ima sintetički hormon auksinskog tipa 3-indolbuterna kiselina u istim uslovima testiranja na ukorenjivanje mikroizdanaka hrizantema (*Dendranthema x grandiflora* Ramat. cv. Escort). Zabeležen je broj korenova formiranih nakon četiri nedelje *in vitro* rasta. Najveći broj korenova dobijen je nakon tretmana sa rastvorom koji sadrži 10 $\mu\text{mol/L}$ ukupnih naftenata.



Slika 3.22. Efekat natrijum-naftenata i njihovih frakcija na ukorenjivanje *in vitro* gajenih izdanaka hrizantema (*Dendranthema x grandiflora* Ramat. cv. Escort)

- A= kontrola
- B= 10 $\mu\text{mol/L}$ NK
- C= 10 $\mu\text{mol/L}$ NK pH 2
- D= 50 $\mu\text{mol/L}$ NK pH 7

Trinaest od devetnaest tretmana je dalo značajno povećanje broja korenova kod ispitivanih hrizantema u poređenju sa kontrolom (Slika 3.22. i 3.23.). Tretmani sa višim koncentracijama IBA (50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ i 5 mmol/L) i svi tretmani u kojima je koncentracija natrijum-naftenata bila 100 $\mu\text{mol/L}$ bili su na nivou kontrole. Svi tretmani koji uključuju frakcije naftenskih kiselina imali su niži ili isti broj korenova kao tretman sa nižom koncentracijom ukupnih naftenskih kiselina (1, Slika 3.23.).



Slika 3.23. Broj korenova po mikroizdanku hrizantema četiri nedelje nakon tretmana.

- **Bele kolone** tretmani čiji efekat nije značajno bolji od efekta kontrole ($LSD_{0.05} = 2.195$)
- **Crne kolone** tretmani čiji efekat nije znatno lošiji od efekta najboljeg IBA-tretmana ($10 \mu\text{mol/L}$)
- Tretmani sa ukupnim NK: **1=** $10 \mu\text{mol/L}$ NK; **2=** $50 \mu\text{mol/L}$ NK; **3=** $100 \mu\text{mol/L}$ NK
- Tretmani sa frakcijama NK:
 - **4=** $10 \mu\text{mol/L}$ NK pH 2; **5=** $50 \mu\text{mol/L}$ NK pH 2; **6=** $100 \mu\text{mol/L}$ NK pH 2
 - **7=** $10 \mu\text{mol/L}$ NK pH 4; **8=** $50 \mu\text{mol/L}$ NK pH 4; **9=** $100 \mu\text{mol/L}$ NK pH 4
 - **10=** $10 \mu\text{mol/L}$ NK pH 7; **11=** $50 \mu\text{mol/L}$ NK pH 7; **12=** $100 \mu\text{mol/L}$ NK pH 7
 - **13=** $10 \mu\text{mol/L}$ NK pH 9; **14=** $50 \mu\text{mol/L}$ NK pH 9; **15=** $100 \mu\text{mol/L}$ NK pH 9
- Tretmani sa IBA: **16=** $10 \mu\text{mol/L}$ IBA, **17=** $50 \mu\text{mol/L}$ IBA, **18=** $100 \mu\text{mol/L}$ IBA, **19=** 5mmol/L IBA
- **20=** kontrolna biljka bez ikakvog tretmana

Tretmani sa višim koncentracijama ($100 \mu\text{mol/L}$) preparata koji sadrži totalne naftenate kao i njihove frakcije obično daju najmanje stimulatívne efekte na ožiljavanje genotipa hrizantema *in vitro*. Ista opažanja u vezi inhibitornih efekata visokih koncentracija natrijum-naftenata uočena su takođe i kod ožiljavanja reznica suncokreta⁹⁸.

Tretmani mikroizdanaka hrizantema sa natrijumovim solima ukupnih naftenskih kiselina i njihovim frakcijama generalno imaju stimulatívne efekte na ukorenjivanje. Najbolji rezultat dobijen je nakon tretiranja sa $10 \mu\text{mol/L}$ rastvorom naftenskih kiselina i tretmanom sa $50 \mu\text{mol/L}$ frakcijom kiselina izolovanom pri pH 7. Oba rezultata su na nivou aktivnosti 3-indolbuterne kiseline koncentracije $10 \mu\text{mol/L}$ što znači da u ovom slučaju frakcionacija nije neophodna. Naši rezultati potvrđuju mogućnost stimulacije ukorenjivanja upotrebom naftenskih kiselina u slučaju hrizantema i ukazuju na mogućnost njihove primene prvenstveno na neke agrokulturne i šumske drvene vrste¹⁰⁰.

Rezultati sugerišu na prisustvo velikog broja aktivnih supstanci u preparatu sa ukupnim naftenskim kiselinama i njihovu distribuciju među frakcijama.

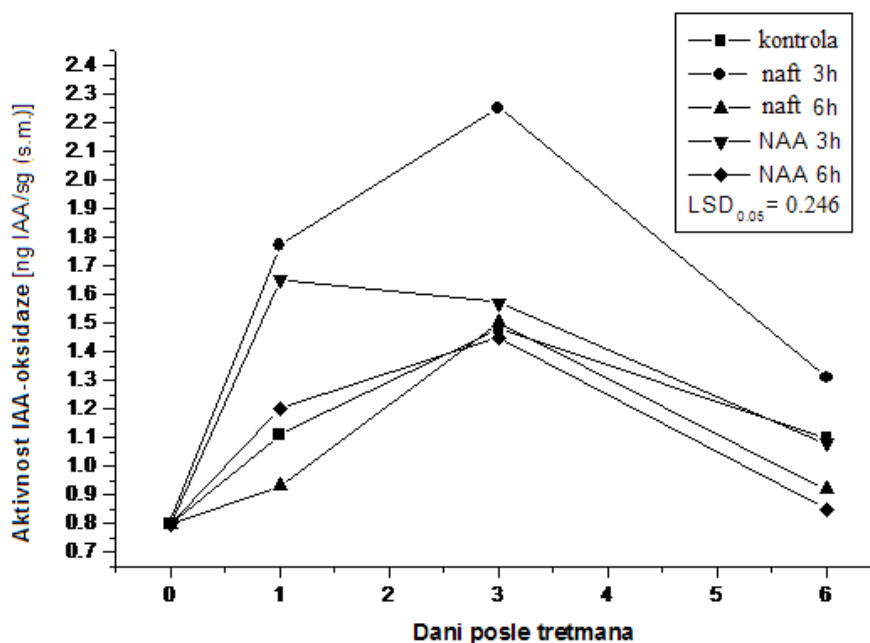
3.3.3.5. UTICAJ NAFTENSKIH KISELINA NA AKTIVNOST BILJNIH ENZIMA

Kao što je napred već pomenuto, efekti na ukorenjivanje mogu biti ispitivani i preko aktivnosti nekih enzima, kao što su oksidaza indolsirćetne kiseline, amilaza i peroksidaza¹⁰²⁻¹⁰⁵. Nivo totalnih peroksidaza i amilaze, kao i sadržaji redukujućih šećera i ukupnih proteina su određeni u bazalnim delovima reznica bagrema nakon tretmana sa natrijum-naftenatima ili natrijumovim solima α -naftilsirćetne kiseline, koncentracija

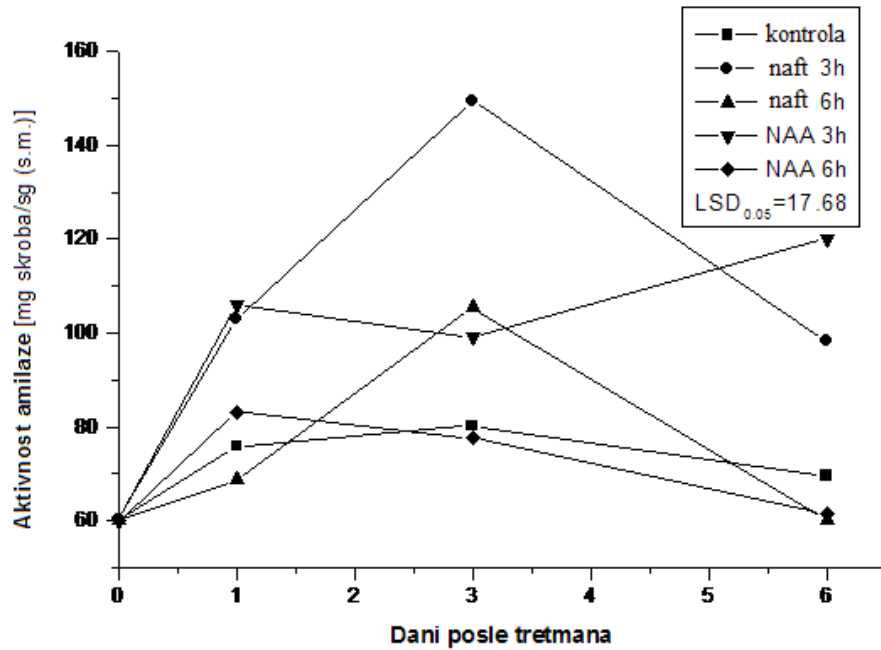
10^{-7} mol/L, u toku 3 i 6 časova. Visoke aktivnosti IAA-oksidadze i amilaze, zajedno sa niskom aktivnosti peroksidaze, koja je poznata kao stimulator inicijacije i aktivacije prvih izdanaka, su dobijene posle tročasovnog tretmana sa natrijum-naftenatima. Šestočasovni tretman je imao inhibitorski efekat na ispitivane biohemijske markere. Efekti tro- i šestočasovnih tretmana sa NAA su bili između odgovarajućih tretmana sa naftenatima.

Reznice mekog drveta uzete od odraslih stabala bagrema, genotip *Rozaszin-AC*, potopljene su u rastvor natrijum-naftenata koncentracije 10^{-7} mol/L, na 3 h za prvu grupu reznica i na 6 h za drugu grupu. Reznice su zatim premeštene u destilovanu vodu, dok su kontrolne reznice držane u destilovanoj vodi sve vreme. Radi poređenja, reznice su takođe tretirane na isti način sa α -naftilsirćetnom kiselinom iste koncentracije kao koncentracija natrijum-naftenata. Reznice su držane u staklenoj bašti na 25°C i relativnoj vlažnosti od 80%. Nakon 1; 3 i 6 dana reznice kraće od 2 cm su uzete za biohemijske analize.

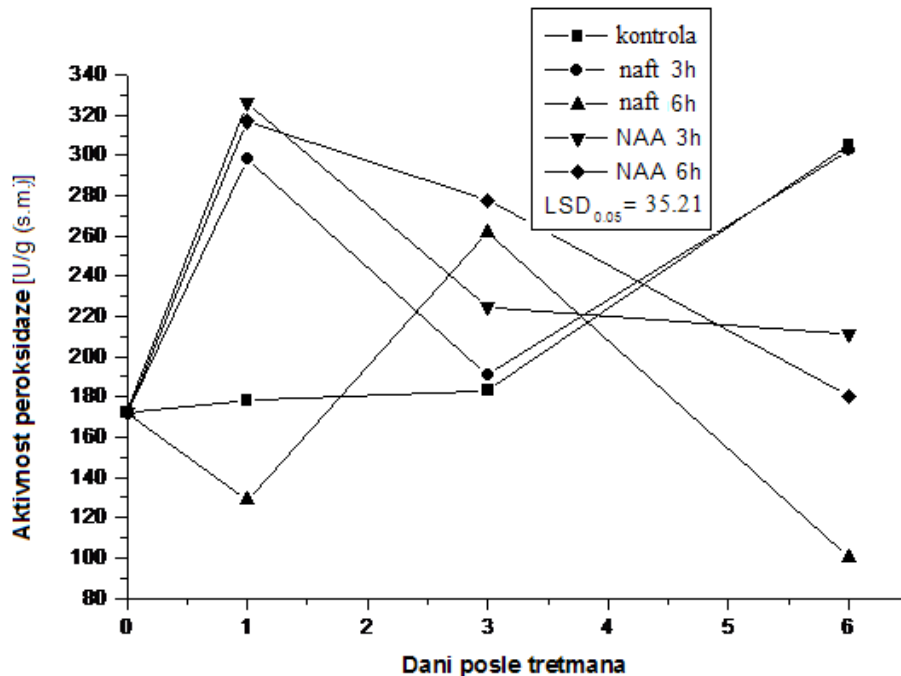
U svakom slučaju, aktivnosti IAA-oksidadze i amilaze su se povećavale do trećeg dana, a zatim smanjivale. Efekat je bio jače izražen posle tročasovnog tretmana sa natrijum-naftenatima u poređenju sa šestočasovnim tretmanom i kontrolom (Slika 3.24. i 3.25.). Ukupna peroksidazna aktivnost bila je povećana prvog dana nakon tretmana, ali je pokazala smanjenje nakon tri dana. Efekat je bio jače izražen posle tročasovnog tretmana natrijum-naftenatima (Slika 3.26.). Za sve tretmane, uključujući i kontrolu, sadržaj rastvornih proteina je bio povećan jedan dan posle tretmana, smanjen trećeg i ponovo povećan šestog dana, osim za šestočasovni tretman natrijum-naftenatima, kada je efekat bio sasvim suprotan (Slika 3.27.). Promene u sadržaju redukujućih šećera nisu potpuno jasne (Slika 3.28.). Efekti tro- i šestočasovnih tretmana sa NAA bili su između odgovarajućih tretmana sa natrijum-naftenatima.



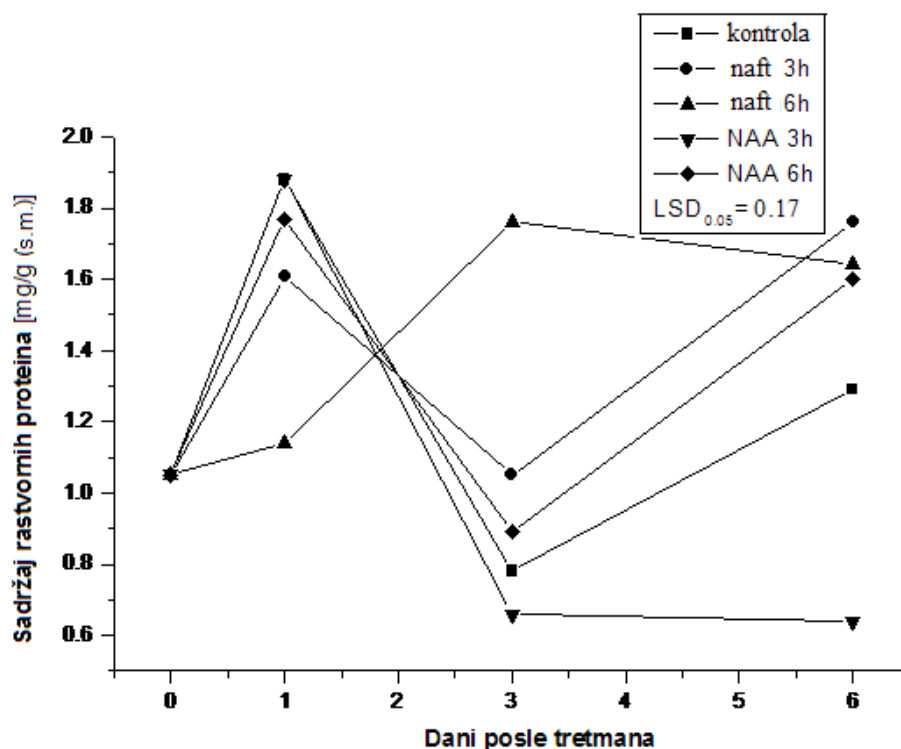
Slika 3.24. Aktivnost IAA-oksidadze u bazalnim delovima mladih reznica bagrema u prvih šest dana posle tro- i šestočasovnog potapanja reznica u 10^{-7} mol/L rastvore natrijum-naftenata i NAA



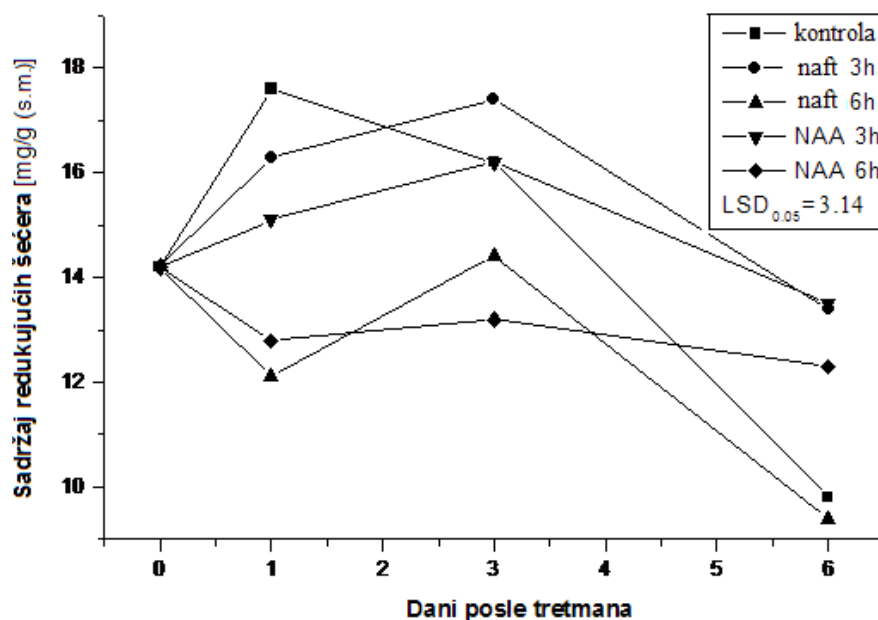
Slika 3.25. Aktivnost amilaze u bazalnim delovima mladih reznica bagrema u prvih šest dana posle tro- i šestočasovnog potapanja reznica u 10^{-7} mol/L rastvore natrijum-naftenata i NAA



Slika 3.26. Aktivnost peroksidaze u bazalnim delovima mladih reznica bagrema u prvih šest dana posle tro- i šestočasovnog potapanja reznica u 10^{-7} mol/L rastvore natrijum-naftenata i NAA



Slika 3.27. Sadržaji rastvornih proteina u bazalnim delovima mladih reznica bagrema u prvih šest dana posle tro- i šestočasovnog potapanja reznica u 10^{-7} mol/L rastvore natrijum-naftenata i NAA



Slika 3.28. Sadržaji redukujućih šećera u bazalnim delovima mladih reznica bagrema u prvih šest dana posle tro- i šestočasovnog potapanja reznica u 10^{-7} mol/L rastvore natrijum-naftenata i NAA

Rezultati dobijeni tri dana nakon tretmana pokazuju da su najviše aktivnosti IAA-oksidade i amilaze kao i najniža aktivnost peroksidaze dobijene posle tročasovnog tretmana sa 10^{-7} mol/L rastvorom natrijum-naftenata. Ovaj efekat je dobro poznat kao stimulativan za inicijaciju i aktivaciju procesa ožiljavanja.

Nasuprot stimulativnom efektu tročasovnog tretmana, šestočasovni tretman je imao inhibitorni efekat na ispitivane biohemijske markere (tj. niži nivo rastvornih proteina jedan dan nakon tretmana), koji je u saglasnosti sa sa prethodnim rezultatima.

Uprkos niskoj koncentraciji, kao što se vidi iz predstavljenih dijagrama, natrijum-naftenati tokom produženog tretmana pokazuju i neke štetne efekte.

Rezultati testa generalno pokazuju da natrijum-naftenati imaju stimulativni efekat na aktivnost enzima što je praćeno i potvrđeno pomoću nekoliko biohemijskih markera ukorenjavanja.

Ispitivanja biološke aktivnosti putem biohemijskih promena u reznicama bagrema (*Robinia pseudoacacia*)¹⁰¹ dovela su i do značajnog zaključka da i vreme trajanja tretmana naftenatima veoma utiče na njihovu aktivnost. Tročasovni tretman reznica bagrema natrijum-naftenatima dao je najbolje rezultate dok je šestočasovni tretman ispoljio inhibitorni efekat na ispitane biohemijske markere.

3.3.4. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA USVAJANJE JONA KOD BILJAKA

3.3.4.1. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA SADRŽAJ JONA TEŠKIH METALA KOD SOJE-DETOKSIKACIJA

Prisustvo teških metala u zemljištu uslovljeno je prirodnim procesima kao i antropogenim faktorima za koje se smatra da su glavni uzročnik povećanja sadržaja teških metala u poljoprivrednom zemljištu. Teški metali izazivaju štetne direktne ili indirektno efekte na praktično sve fiziološke procese kod biljaka, što u lancu ishrane ima direktnog negativnog uticaja na zdravlje čoveka.

Teški metali utiču na proces fotosinteze¹⁰⁶, mineralnu ishranu¹⁰⁷, aktivnost enzima¹⁰⁸, funkciju membrana¹⁰⁹, vodni režim¹¹⁰ i dr.. Toksični efekti teških metala na fiziološke i metaboličke procese kod biljaka su veoma složeni i zavise od brojnih činilaca: biljne vrste, vrste teškog metala i njegove koncentracije a razlikovanje direktnih i indirektnih efekata je veoma komplikovano.

Uprkos ovome, pojedine biljne vrste su razvile genotipove koji mogu bez vidljivih oštećenja da rastu na zemljištima zagađenim teškim metalima. Biljke imaju čitav niz potencijalnih mehanizama, kako na nivou cele biljke tako i na ćelijskom nivou, koji bi se mogli uključiti u detoksikaciju teških metala i time doprineti tolerantnosti biljaka prema efektima teških metala. Suština ovih mehanizama u prvom redu je izbegavanje pojave toksičnih koncentracija teških metala na osetljivim mestima kako na nivou cele biljke tako i u pojedinim kompartmentima ćelija kako bi se na taj način izbegli štetni efekti teških metala.

U svetu postoje pokušaji modifikacije mehanizama detoksikacije teških metala kod biljaka, putem određenih tretmana, kako bi se povećala njihova tolerantnost na

povećane koncentracije teških metala u zemljištu. Tako, pokušana je detoksikacija teških metala tretiranjem biljnim hormonima^{111,112}, povećanom koncentracijom specifičnih mineralnih materija u hranljivom medijumu kao što je sumpor¹¹³, fosfor¹¹⁴ i azot¹¹⁵, promenom uslova gajenja¹¹⁶ kao i putem izmene segmenata DNK koje kodiraju sekvence amino kiselina za metal transportne proteine¹¹⁷.

S obzirom da smeše prirodnih naftnih kiselina dobijene iz srednjih i viših uljnih frakcija vojvođanske nafte „*Velebit*” ispoljavaju fiziološku aktivnost sličnu biljnim hormonima tipa auksina i giberelina sa jedne strane, kao i na poznatu ulogu biljnih hormona u detoksikaciji teških metala kod biljaka sa druge strane, bilo je interesantno ispitati efekat tretmana naftnim kiselinama na biljke gajene u prisustvu teških metala.

Test uticaja naftnih kiselina na nivo kadmijuma u biljkama treba da pokaže moguće fiziološko delovanje naftnih kiselina koje dovodi do snižavanja nivoa teških metala u biljci, u ovom slučaju kadmijuma.

Tretirane biljke soje (*Glicine max* L.) su podeljene u četiri grupe: kontrola, gde su biljke gajene na hranljivom medijumu; tretman sa Cd, gde su biljke dalje gajene na hranljivom medijumu uz dodatak Cd²⁺ u koncentraciji od 1 mmol/L u obliku CdCl₂; tretman sa naftnim kiselinama, gde su biljke gajene na hranljivom medijumu uz dodatak naftnih kiselina u koncentraciji od 10⁻⁷ mol/L i kombinovani tretman gde su biljke gajene na hranljivom medijumu uz dodatak 1 mmol/L Cd²⁺ i 10⁻⁷ mol/L naftnih kiselina.

Nakon dve nedelje rasta biljaka pri ovakvim tretmanima to jest nakon pojave trećeg para listova vršeno je određivanje sadržaja Cd u pojedinim frakcijama interćelijskog prostora kao i sadržaja Cd unutar ćelija korena, stabla i listova biljaka soje. Aktivnost nitrat-reduktaze je određena po metodi *Witt-a*¹¹⁸, a sadržaj pigmenta prema *Von Wettstein*-ovoj metodi¹¹⁹.

Tabela 3.15. Uticaj natrijum-naftenata na sadržaj i raspodelu Cd kod mladih biljaka soje [µg/g suve mase]

Oblik Cd	Organ biljke					
	Koren		Stablo		List	
	Cd ¹⁾	Cd+NK ²⁾	Cd ¹⁾	Cd+NK ²⁾	Cd ¹⁾	Cd+NK ²⁾
međucelijski vodo-rastvorni Cd	3.89±0.16	0.71±0.03	2.41±0.12	1.42±0.05	1.01±0.03	0.47±0.03
međucelijski zamenjivi Cd	2.41±0.11	1.31±0.06	0.62±0.04	1.08±0.04	0.45±0.02	0.36±0.04
međucelijski kompleksirani Cd	38.77±1.71	40.20±1.80	45.55±1.73	8.74±0.39	12.23±0.47	4.77±0.21
ukupan međucelijski Cd	45.07±2.22	42.21±1.90	48.57±2.17	11.23±0.43	13.69±0.51	5.60±0.29
unutarćelijski Cd	155.00±6.90	86.50±3.90	51.20±2.10	51.70±2.20	21.80±1.10	14.4±0.08
ukupan sadržaj Cd	200.10±9.90	128.70±5.8	99.80±4.20	63.00±3.10	35.50±1.60	20.0±0.09

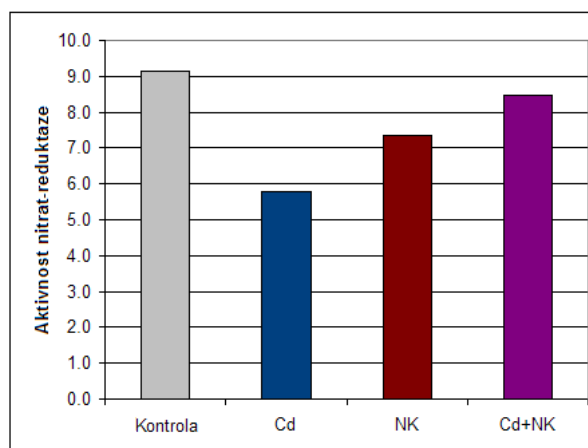
¹⁾ Biljke tretirane Cd

²⁾ Kombinovani tretman biljaka Cd i natrijum-naftenatima

Tretman naftenskim kiselinama signifikantno je smanjio sadržaj ukupnog kadmijuma kako u korenu tako i u stablu i listovima u proseku za oko 40% (u korenu 36%, stablu 37% a u listovima 44%). Sadržaj unutarćelijskog kadmijuma pri tretmanu sa naftenskim kiselinama kod korena i listova je smanjen za približno isti procenat kao i sadržaj

ukupnog kadmijuma u proseku (44% kod korena i 34% kod listova) u odnosu na sadržaj kadmijuma kod biljaka tretiranih samo kadmijumom, dok se kod stabla praktično nije menjao (Tabela 3.15.). Sadržaj međućelijskog kadmijuma kod korena se praktično nije menjao dok je kod stabla i listova došlo do njegovog značajnog smanjenja (77% kod stabla, i 59% kod listova) pri tretmanu sa natrijum-naftenatom u odnosu biljke tretirane samo kadmijumom.

Ispitan je efekat tretmana kadmijumom na aktivnost enzima nitrat-reduktaze jednog od ključnih enzima u metabolizmu azota kod biljaka. Rezultati su prikazani na slici 3.29..

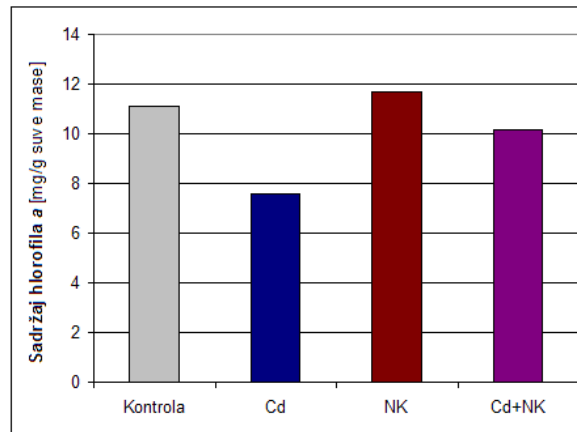


Slika 3.29. Efekat tretmana natrijum-naftenatima na aktivnost nitrat-reduktaze u listovima mladih biljaka soje gajenih u prisustvu kadmijuma

- Kontrola= biljke gajene samo na hranljivom rastvoru
- NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Cd= biljke gajene u prisustvu 1 mmol/L kadmijuma
- Cd+NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata i 1 mmol/L kadmijuma

Sa slike 3.29. se vidi da prisustvo kadmijuma u hranljivom medijumu negativno utiče na aktivnost nitrat-reduktaze jer dovodi smanjenja aktivnosti ovog enzima za 36% u odnosu na kontrolu. Prisutvo natrijum-naftenata u hranljivom medijumu sprečava negativni efekat kadmijuma tako da aktivnost nitrat-reduktaze sada iznosi 93.5% od aktivnosti ovog enzima kod kontrolnih biljaka.

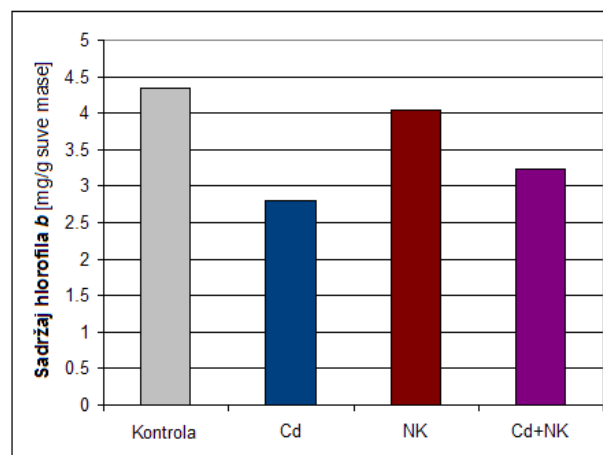
Takođe je ispitan efekat tretmana kadmijumom na sadržaj hlorofila *a* i *b* kao i karotenoida s obzirom da sadržaj ovih pigmenata može koristiti kao pokazatelj intenziteta fotosinteze kod biljaka. Rezultati su prikazani na slikama 3.30., 3.31. i 3.32..



Slika 3.30. Efekat tretmana natrijum-naftenatima na sadržaj hlorofila *a* u listovima mladih biljaka soje gajenih u prisustvu kadmijuma

- Kontrola= biljke gajene samo na hranljivom rastvoru
- NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Cd= biljke gajene u prisustvu 1 mmol/L kadmijuma
- Cd+NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata i 1 mmol/L kadmijuma

Sa slike 3.30. se uočava negativan uticaj prisustva kadmijuma u hranljivom medijumu i na sadržaj hlorofila *a* jer dolazi do smanjenja njegovog sadržaja za 32% u odnosu na dobijene vrednosti kod kontrolnih biljaka. Prisustvo natrijum-naftenata u hranljivom medijumu sprečava negativni uticaj kadmijuma tako da sadržaj hlorofila *a* sada iznosi 91.5% od njegovog sadržaja kod kontrolnih biljaka.

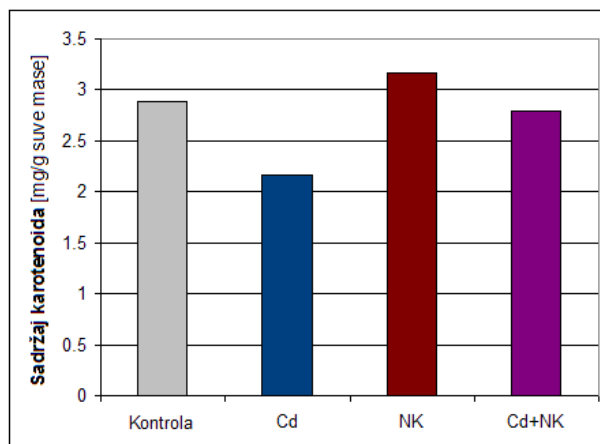


Slika 3.31. Efekat tretmana natrijum-naftenatima na sadržaj hlorofila *b* u listovima mladih biljaka soje gajenih u prisustvu kadmijuma

- Kontrola= biljke gajene samo na hranljivom rastvoru
- NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Cd= biljke gajene u prisustvu 1 mmol/L kadmijuma
- Cd+NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata i 1 mmol/L kadmijuma

Sa slike 3.31. takođe se uočava negativan uticaj prisustva kadmijuma u hranljivom medijumu i na sadržaj hlorofila *b*. Smanjenje sadržaja ovog pigmenta u odnosu na kontrolu iznosi 36%. Prisustvo natrijum-naftenata u hranljivom medijumu umanjuje negativni uticaj kadmijuma, ali znatno manje nego u slučaju hlorofila *a*, tako da sadržaj hlorofila *b* sada iznosi 74.5% od sadržaja ovog pigmenta kod kontrolnih biljaka. Ovo znači da tretman natrijum-naftenatima ne sprečava negativan uticaj kadmijuma ali ga

ipak ublažava jer je smanjenje sadržaja hlorofila *b* samo za 10% manje nego bez tretmana.



Slika 3.32. Efekat tretmana natrijum-naftenatima na sadržaj karotenoida u listovima mladih biljaka soje gajenih u prisustvu kadmijuma

- Kontrola= biljke gajene samo na hranljivom rastvoru
- NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Cd= biljke gajene u prisustvu 1 mmol/L kadmijuma
- Cd+NK= biljke gajene u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata i 1 mmol/L kadmijuma

Sa slike 3.32. se jasno uočava negativan uticaj prisustva kadmijuma u hranljivom medijumu i na sadržaj karotenoida jer dolazi smanjenja sadržaja ovih pigmenata za 24.6% u odnosu na kontrolu. Prisustvo natrijum-naftenata u hranljivom medijumu sprečava negativni efekat kadmijuma tako da sadržaj karotenoida sada iznosi 96.9% od sadržaja ovih pigmenata kod kontrolnih biljaka.

Rezultati istraživanja ukazuju na mogućnost da natrijum-naftenati deluju na nivou plazma membrane korena menjajući njenu propustljivost za jone kadmijuma. Tretman natrijum-naftenatima može da umani nepovoljno dejstvo suviška kadmijuma na neke fiziološko-biohemijske procese, na primer, na aktivnost nitrat-reduktaze i sadržaj fotosintetičkih pigmenata.

Na osnovu dobijenih rezultata (Tabela 3.15. i Slike 3.29.-3.32.) može se zaključiti da naftne kiseline, za koje se inače smatra da štetno deluju na biljni svet, mogu u niskim koncentracijama, najverovatnije putem suptilne modifikacije plazma membrane ćelija korena menjajući njenu propustljivost za jone kadmijuma, da smanje sadržaj kadmijuma u biljkama koje rastu na njegovoj povećanoj koncentraciji i time ublaže njegovu toksičnost.

O delovanju naftnih kiselina na nivou membrana, u literaturi postoje veoma oskudni podaci. Utvrđeno je da naftne kiseline kod životinja pri koncentracijama od 10^{-7} mol/L povećavaju propustljivost membrana za jone kalijuma. Dobijeni rezultati ukazuju da natrijum-naftenati najverovatnije deluju na nivou plazma membrane ćelija korena menjajući njenu propustljivost za jone kadmijuma. Pretpostavku potvrđuje zavisnost (sličnost) sadržaja međućelijskog kadmijuma i kadmijuma u hranljivom rastvoru, a znatno smanjeni njegov sadržaj unutar ćelija kod korena. Smanjenje sadržaja unutarćelijskog kadmijuma u korenu pri tretmanu sa natrijum-naftenatima je imalo za posledicu i smanjenje sadržaja unutarćelijskog kadmijuma u listovima. Sadržaj unutarćelijskog kadmijuma u stablu se nije značajno menjao, što ukazuje da se Cd u

ksilemu verovatno transportuje u vidu kompleksa, a u znatno manjoj meri u vidu jona. Isto tako se smatra da pri usvajanju Cd koren biljaka koristi prenosiocice odgovorne za druge dvovalentne katjone, kao što su prenosioci za Zn^{2+} , Cu^{2+} ili Fe^{2+} ili jonske kanale za Ca^{2+} i Mg^{2+} ¹²⁰.

Sličnih podataka u literaturi o uticaju naftnih kiselina na usvajanje katjona za biljne ćelije nema, postoje samo podaci o njihovom uticaju na usvajanje glukoze ⁵³ i jona fosfata ⁵⁶ kod biljaka pasulja. Na osnovu radova gde su biljke gajene u prisustvu naftnih kiselina može se posredno pretpostaviti da naftne kiseline pri većim koncentracijama mogu štetno da deluju na usvajanje vode kod biljaka ¹²¹. S obzirom da naftne kiseline u molekulu sadrže polarni i nepolarni deo to jest da su amfifilne molekule, molekule slične detergentima one mogu da deluju i kao površinski aktivne supstance ¹²⁰. Za detergente je poznato da utiču na stabilnost membrana biljnih ćelija i da su odgovorne za transport jona kroz ćeliju ¹⁰⁰ te zahvaljujući toj sličnosti može se pretpostaviti da naftne kiseline naftenskog tipa kao surfaktanti deluju na membrane korena putem specifične modifikacije transportera ili jonskih kanala i time menjaju njenu propustljivost za jone kadmijuma. Može se pretpostaviti da naftne kiseline deluju slično kao žučne kiseline za koje je poznato da pri višim koncentracijama oštećuju membrane životinjskih ćelija dok pri nižim koncentracijama izazivaju suptilne modifikacije membrane i promene njene propustljivosti ¹²⁰.

3.3.4.2. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA SADRŽAJ METALNIH JONA KOD SOJE

Iz prethodnih testova se vidi da tretman biljaka niskim koncentracijama natrijum-naftenata ublažava štetne efekte teških metala smanjujući njihov unos u biljku ¹²⁰.

Tretmanom sa natrijum-naftenatima (10^{-7} mol/L), koji u većim koncentracijama spadaju u grupu značajnih organskih kontaminata, u ovom testu utvrđeno je značajno povećanje koncentracije Mn, Fe, Zn i Ni ali smanjuje sadržaje K i Na u korenima mladih biljaka soje. S druge strane, u stabljikama i listovima primećeno je samo povećanje Fe i Mn. U korenima, sadržaj Mn je bio četiri puta veći a sadržaji Fe, Zn i Ni su povećani 17%, 60% i 68%, respektivno. Koncentracije K i Na u korenu smanjene su za 41% i 66%, u poređenju s kontrolom. Ovi rezultati potvrđuju značajan uticaj naftenata na mineralnu ishranu.

Mlade biljke soje (genotip NS-L-320-251) su rasle u Hoagland-ovom hranljivom rastvoru, koji sadrži: $Ca(NO_3)_2$, KNO_3 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, H_3BO_3 , $MnCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, MoO_3 i Fe kao Fe(III)-EDTA, do potpunog formiranja fiziološki aktivnog prvog lista. Biljke su nakon toga podeljene u dve grupe: kontrola (biljke su održavane u istom rastvoru) i tretirane biljke (rasle u prisustvu natrijum-naftenata koncentracije 10^{-7} mol/L). Dve nedelje posle tretmana biljaka koncentracije K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni i Na u korenima, stabljikama i listovima su određivane plamenom atomskom absorpcionom spektrometrijom posle suvog spaljivanja uzoraka.

Rast mladih biljaka soje je stimulisan prisustvom naftenata u hranljivom rastvoru, došlo je do povećanja sveže mase korenova i nadzemnih delova za oko 20%. Prisustvo naftenata povećava značajno sadržaj Mn, Fe, Zn i Ni ali smanjuje sadržaje K i Na u korenima. S druge strane, povećanje u Fe i Mn primećeno je samo u stabljikama i listovima.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da tretman sa natrijum-naftenatima utiče na akumulaciju šest od devet elemenata prisutnih u korenovima mladih biljaka soje. Interesantno je naglasiti da natrijum-naftenati stimulišu akumulaciju katjona koji imaju parcijalno ili potpuno popunjene *d*-orbitale u svojim elektronskim konfiguracijama, kao što su Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} i izuzetak je Cu^{2+} , ali nemaju efekta na akumulaciju katjona koji u spoljašnjim elektronskim orbitalama imaju konfiguracije atoma idealnih gasova (Ca^{2+} , Mg^{2+} , oksidacioni broj +2) a istovremeno smanjuju akumulaciju teških katjona sa oksidacionim brojem +1 (Na^+ , K^+). Pošto ispitivani naftenati predstavljaju u stvari smešu brojnih jedinjenja može se očekivati da individualne komponente ove smeše izazivaju na različite načine preuzimanje pojedinih jona.

Odvojeno od uticaja na preuzimanje ispitivanih pozitivnih jona, tretman sa natrijum-naftenatima može takođe stimulisati i njihovu translokaciju koja je evidentna iz povećanja sadržaja Mn u listovima soje (Tabela 3.16.).

Tabela 3.16. Efekat natrijum-naftenata na sadržaj i distribuciju nekih esencijalnih elemenata u mladim biljkama soje [$\mu g/g$ suve mase]

- Kontrola: biljke rasle u Hoagland-ovom hranljivom rastvoru
 - Na-naft: biljke rasle u Hoagland-ovom hranljivom rastvoru uz dodatak 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Sve vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm s.d. ($n = 3$).

Esencijalni element	Organ biljke					
	Koren		Stabljika		List	
	Kontrola	Na-naft	Kontrola	Na-naft	Kontrola	Na-naft
K	44450 \pm 48.0	25984.0 \pm 26*	23218 \pm 3011	22613 \pm 2996	28400 \pm 3211	29112 \pm 3098
Ca	2280 \pm 312	2620.0 \pm 299	3310 \pm 286	3515 \pm 301	6762 \pm 641	7425 \pm 598
Mg	1938 \pm 188	1830.0 \pm 191	4120 \pm 358	4701 \pm 441	4688 \pm 451	4313 \pm 392
Fe	1262 \pm 131	1474.0 \pm 13*	46.0 \pm 3.7	67.0 \pm 5.9*	180.2 \pm 19.1	192.5 \pm 20.3
Mn	28.4 \pm 2.1	120.4 \pm 17*	12.8 \pm 1.9	17.6 \pm 2.8	54.3 \pm 3.3	79.8 \pm 4.5*
Zn	23.5 \pm 2.4	37.4 \pm 4*	11.8 \pm 1.3	13.8 \pm 1.7	13.1 \pm 1.4	14.9 \pm 1.5
Cu	17.5 \pm 1.9	19.5 \pm 3.1	7.4 \pm 0.5	8.8 \pm 0.6	9.2 \pm 0.6	10.7 \pm 0.8
Ni	3.1 \pm 0.4	5.2 \pm 0.6*	5.2 \pm 0.6	6.2 \pm 0.8	2.6 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3
Na	175.4 \pm 18.1	59.2 \pm 6.7*	420 \pm 44.1	380 \pm 40.1	192.2 \pm 21.5	120.5 \pm 18.9

*vrednosti značajno različite od odgovarajućih kontrola (*t*-test).

3.3.4.3. UTICAJ NAFTNIH KISELINA NA SADRŽAJ METALNIH JONA KOD CELERA I MRKVE

Ispitivanja na celeru i mrkvi su potvrdila da uticaj naftenata na mineralnu ishranu zavisi od primenjenog elementa i da su načini preuzimanja određenih jona različiti, što ima za posledicu ili povećanje ili smanjenje sadržaja pojedinih jona u pojedinim delovima biljaka. Testom je utvrđeno da su ovi efekti različiti kada se proučavaju na različitim biljnim kulturama, a to je veoma važno za donošenje opštih zaključaka.

Mlade biljke celera i mrkve, gajene u hranljivom medijumu, tretirane su natrijumovim solima naftenskih kiselina (10^{-7} mol/L) folijarno ili prisustvom u hranljivom medijumu (Tabela 3.17. i 3.18.). Jedino je tretman putem prisustva naftenata u hranljivom medijumu smanjio svežu masu korena i nadzemnog dela oko 20% kod obe biljke. Oba tretmana uticala su na sadržaj Fe, Cu, Mn, Mg i Ca kod biljaka celera i Fe, Mn, Zn i Na

kod biljaka mrkve. Kod biljaka celera došlo je do smanjenja sadržaja navedenih nutrienata dok je u korenu biljaka mrkve došlo do povećanja sadržaja Fe za 45%, Mn za 70% i Zn za 37%. Takođe je važno je naglasiti da je kod ovih biljaka prisustvo naftenata u hranljivom medijumu dovelo do smanjenja mase korenova i nadzemnih delova (Slika 3.33.-3.36.), što je potpuno suprotno od rezultata dobijenih kod biljaka soje.

Tabela 3.17. Efekat natrijum-naftenata na sadržaj nekih metalnih jona kod mladih biljaka celera, računato na suhu masu

- Kontrola= biljke gajene u hranljivom medijumu
- Naftenati u medijumu= biljke gajene u hranljivom medijumu u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Folijarni tretman naftenatima= biljke tretirane folijarno istom koncentracijom naftenata

Svaka vrednost predstavlja srednju vrednost \pm s.d. (n = 3).

	Koren			Nadzemni deo		
	Kontrola	Naftenati u medijumu	Folijarni tretman naftenatima	Kontrola	Naftenati u medijumu	Folijarni tretman naftenatima
Fe [$\mu\text{g/g}$]	1119.0 \pm 47.30	920.30 \pm 67.3*	1122.0 \pm 110.1	158.83 \pm 5.91	87.80 \pm 9.22*	120.83 \pm 16.35*
Cu [$\mu\text{g/g}$]	6.95 \pm 0.37	12.64 \pm 0.90*	6.95 \pm 0.16	3.97 \pm 1.00	4.90 \pm 1.09	7.85 \pm 1.30*
Mn [$\mu\text{g/g}$]	635.0 \pm 25.24	541.67 \pm 49.7*	340.80 \pm 18.3*	64.10 \pm 1.08	59.17 \pm 1.17*	46.60 \pm 3.25*
Zn [$\mu\text{g/g}$]	26.25 \pm 2.70	26.04 \pm 1.28	21.34 \pm 1.8*	19.60 \pm 1.38	20.17 \pm 1.95	17.45 \pm 1.08
Mg [%]	0.28 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03*	0.34 \pm 0.02*	0.16 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02*	0.15 \pm 0.02
Ca [%]	0.37 \pm 0.03	0.48 \pm 0.05*	0.35 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02	0.31 \pm 0.005	0.25 \pm 0.03*
Na [%]	0.43 \pm 0.08	0.44 \pm 0.06	0.38 \pm 0.03	0.42 \pm 0.11	0.11 \pm 0.03*	0.17 \pm 0.04*
K [%]	8.76 \pm 0.53	7.86 \pm 0.18	6.74 \pm 0.60*	9.10 \pm 1.34	11.89 \pm 0.41*	12.76 \pm 1.37*

*vrednosti značajno različite od odgovarajućih kontrola (t-test).

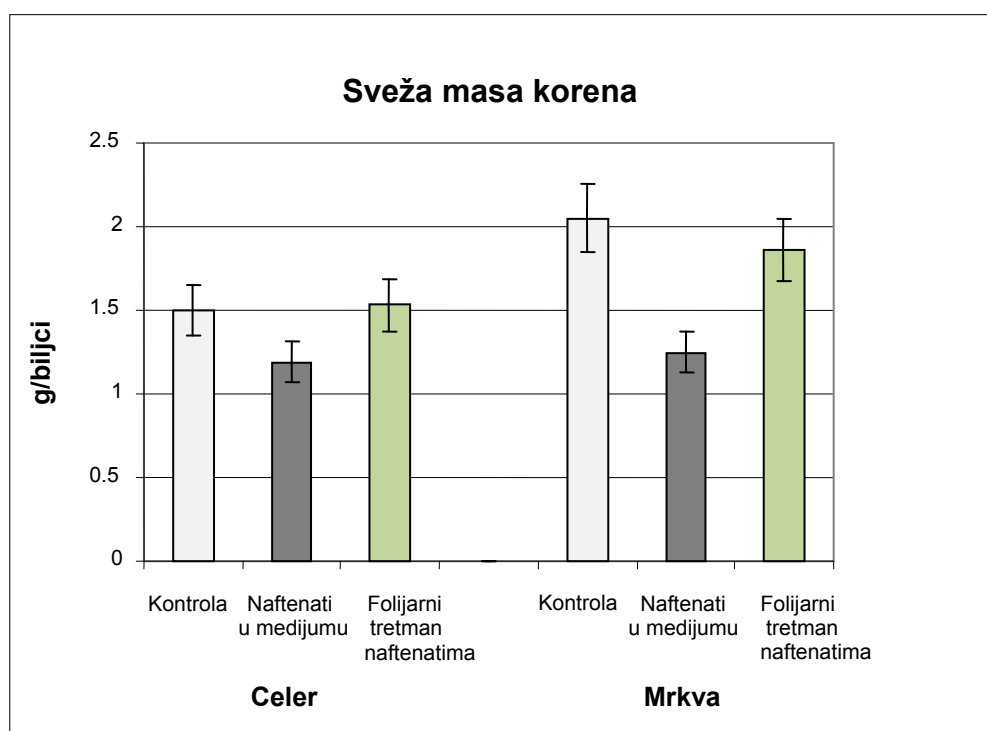
Tabela 3.18. Efekat natrijum-naftenata na sadržaj nekih metalnih jona kod mladih biljaka mrkve, računato na suhu masu

- Kontrola= biljke gajene u hranljivom medijumu
- Naftenati u medijumu= biljke gajene u hranljivom medijumu u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Folijarni tretman naftenatima= biljke tretirane folijarno istom koncentracijom naftenata

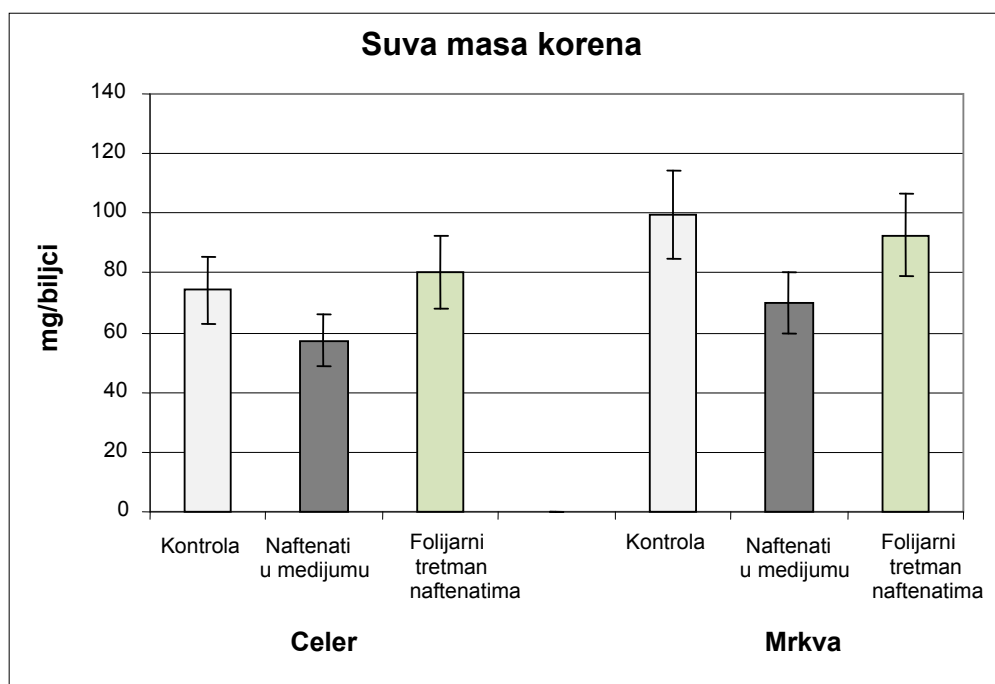
Svaka vrednost predstavlja srednju vrednost \pm s.d. (n = 3).

	Koren			Nadzemni deo		
	Kontrola	Naftenati u medijumu	Folijarni tretman naftenatima	Kontrola	Naftenati u medijumu	Folijarni tretman naftenatima
Fe [$\mu\text{g/g}$]	480.18 \pm 22.09	693.50 \pm 91.25*	576.54 \pm 145.58	108.09 \pm 7.60	127.18 \pm 8.52*	127.91 \pm 9.48*
Cu [$\mu\text{g/g}$]	4.32 \pm 2.05	6.97 \pm 2.77	5.14 \pm 0.25	4.31 \pm 0.52	5.72 \pm 0.11*	8.98 \pm 0.51*
Mn [$\mu\text{g/g}$]	119.54 \pm 32.53	201.99 \pm 13.22*	121.67 \pm 36.91	42.60 \pm 1.63	46.07 \pm 1.24	46.46 \pm 2.65
Zn [$\mu\text{g/g}$]	29.56 \pm 5.32	40.69 \pm 7.16*	33.15 \pm 1.23	14.91 \pm 0.57	18.52 \pm 0.47*	19.84 \pm 0.93*
Mg [%]	0.21 \pm 0.03	0.24 \pm 0.05	0.22 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01
Ca [%]	0.33 \pm 0.02	0.37 \pm 0.12	0.37 \pm 0.03	2.88 \pm 0.51	2.71 \pm 0.32	2.12 \pm 0.54*
Na [%]	0.24 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04*	0.33 \pm 0.03*	0.12 \pm 0.03	0.11 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02
K [%]	6.71 \pm 0.26	6.47 \pm 0.62	6.63 \pm 0.96	6.75 \pm 0.34	8.97 \pm 0.91*	6.83 \pm 0.38

*vrednosti značajno različite od odgovarajućih kontrola (t-test).

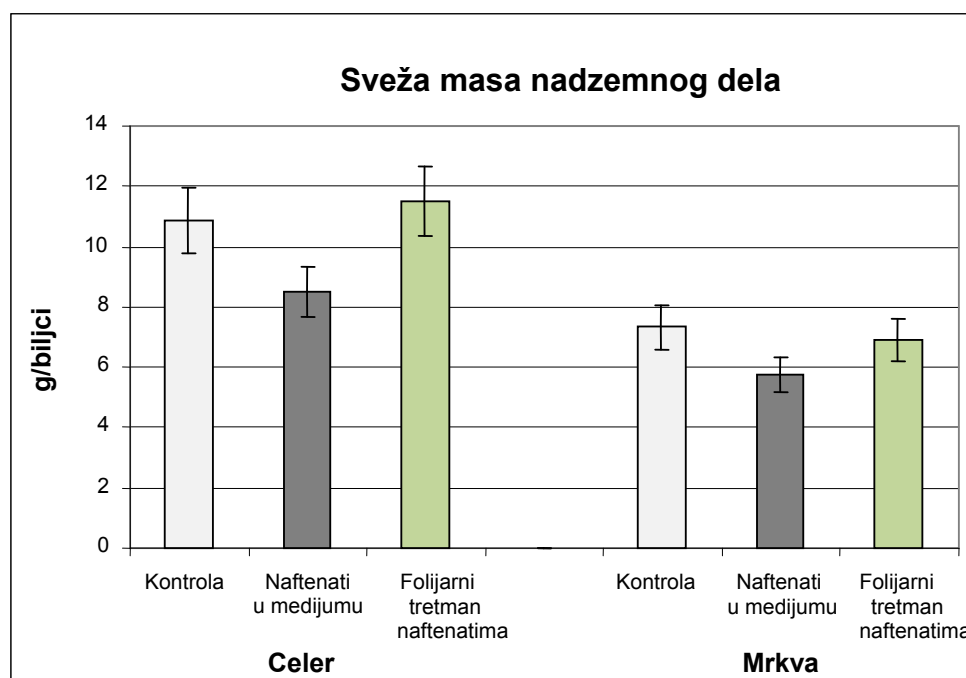
**Slika 3.33.** Efekat natrijum-naftenata na svežu masu korena kod mladih biljaka mrkve i celera

- Kontrola= biljke gajene u hranljivom medijumu
- Naftenati u medijumu= biljke gajene u hranljivom medijumu u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Folijarni tretman naftenatima= biljke tretirane folijarno istom koncentracijom naftenata



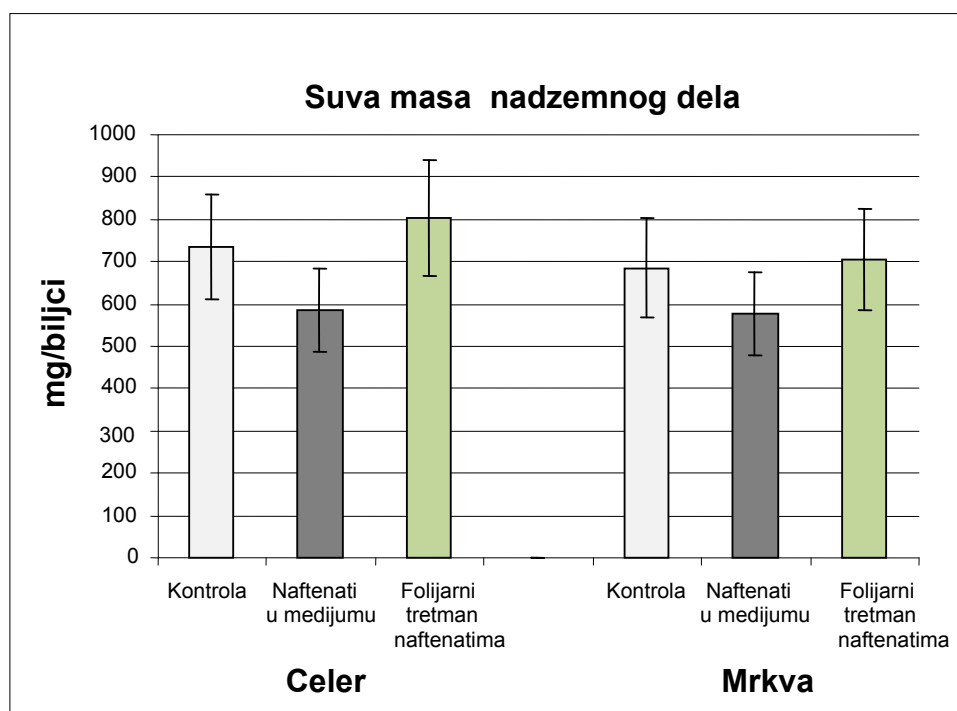
Slika 3.34. Efekat natrijum-naftenata na suhu masu korena kod mladih biljaka mrkve i celera

- Kontrola= biljke gajene u hranljivom medijumu
- Naftenati u medijumu= biljke gajene u hranljivom medijumu u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Folijarni tretman naftenatima= biljke tretirane folijarno istom koncentracijom naftenata



Slika 3.35. Efekat natrijum-naftenata na svežu masu nadzemnog dela kod mladih biljaka mrkve i celera

- Kontrola= biljke gajene u hranljivom medijumu
- Naftenati u medijumu= biljke gajene u hranljivom medijumu u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Folijarni tretman naftenatima= biljke tretirane folijarno istom koncentracijom naftenata



Slika 3.36. Efekat natrijum-naftenata na suhu masu nadzemnog dela kod mladih biljaka mrkve i celera

- Kontrola= biljke gajene u hranljivom medijumu
- Naftenati u medijumu= biljke gajene u hranljivom medijumu u prisustvu 10^{-7} mol/L natrijum-naftenata
- Folijarni tretman naftenatima= biljke tretirane folijarno istom koncentracijom naftenata

Jedino je tretman putem prisustva naftenata u hranljivom medijumu smanjio svežu masu korena i nadzemnog dela oko 20% kod obe biljke. Oba tretmana uticala su na sadržaj Fe, Cu, Mn, Mg i Ca kod biljaka celera i Fe, Mn, Zn i Na kod biljaka mrkve. Kod biljaka celera došlo je do smanjenja sadržaja navedenih metala dok je u korenu biljaka mrkve došlo do povećanja sadržaja Fe za 45%, Mn za 70% i Zn za 37%. Folijarnim tretmanom je značajno povećana masa nadzemnog samo kod celera.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

OPŠTE METODE

IR Spektri su snimljeni na FT spektrofotometru *Nexus 670* (*ThermoNicolet*, detektor DTGS), a položaj traka je dat u cm^{-1} . NMR Spektri su snimljeni na instrumentu *Bruker AC 250 E*, a hemijska pomeranja (δ -skala) su izražena u *ppm* vrednostima u odnosu na tetrametilsilan kao interni standard. ^1H NMR Spektri su asignirani metodom *homo*-dekuplovanja. ^{13}C NMR Spektri su asignirani metodom selektivnog dekuplovanja. Kvantitativni ^{13}C NMR spektri sa selektivnim dekuplovanjem protona bez NOE su mereni pulsnim programom za inverzno dekuplovanje u kojem je vreme relaksacije $d_1 = 20$ sec i flip vreme od 90° pulsa bilo 6 μsec . Posmatrani opseg frekvencija je bio fiksiran na 200 ppm, pri operativnoj frekvenciji od 62.9 MHz i frekvenciji ozračivanja od 4000 Hz. Broj skenova je bio 12800 a područje vremenske akumulacije je bilo 32 K. Kvantitativna analiza je bazirana na intenzitetu svakog regiona signala (C_q , $\text{CH}+\text{CH}_2$, CH_3 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{Ar}$, $\underline{\text{C}}-\text{Ar}$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{Bn}$) uz integrator kada je CCl_4 bio dodat direktno u rastvarač (oko 10%). Maseni spektri niske rezolucije MS-ESI spektri snimljeni su elektrosprej masenom HPLC metodom detekcije na *Finningan LCQ advantage MAX spectrometer* (*Waltham*, USA). Snimani su spektri molekularnih serija kiselina $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}+2\text{H}]^+$ ili $[\text{M}+23]^+$ u pozitivnom jon modalitetu u 0.1%-noj trifluorsirćetnoj kiselini u acetonitrilu ili sirćetnoj kiselini i rastvoru acetonitril-voda 1 : 1 i 0.1%-na mravlja kiselina, spektri molekularnih serija kiselina $[\text{M}-1]^-$ u negativnom jon modalitetu u rastvoru 0.1%-og trietilamina rastvoren u smeši acetonitril-voda 70 : 30 uz dodatak 2% NH_4OH . Referentni molekularni jon je od cikloheksilpentanske kiseline. Opseg masa 50-600, injektirano 50 μL uzorka. Spektri su obrađivani i analizirani u *X-calibur* programu.

Za izvođenje reakcija uz mikrotalasnu aktivaciju korišćen je aparat *Microwave Synthesis Sistem-CEM Discover BenchMate*, sa magnetnim mešanjem, opcijom standardnog hlađenja i infracrvenim sistemom za kontrolu i detekciju reakcione temperature. Sinteze su rađene na maloj skali ($V_{\text{max}} = 5.00$ mL), uz refluks.

Tok reakcija je praćen tankoslojnom hromatografijom (TLC) na aluminijumskim folijama *Silica gel 60 F₂₅₄* (*Merck*). Hromatogrami su izazivani sa 50%-nom sumpornom kiselinom uz naknadno zagrevanje na 120°C . Za „fleš” hromatografiju na koloni korišćen je *Silica gel 60* (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM; *Merck*). Protok eluenta kroz kolonu je 50 mL/min. Ekstrakti su sušeni sa anhidrovanim natrijum-sulfatom. Organski rastvarači su uparavani na rotacionom vakuum uparivaču, pri temperaturama vodenog kupatila do 35°C .

Biološka ispitivanja rađena su pomoću tri testa. U „*Koleoptil testu*” aktivnost rastvora različitih koncentracija kalijumovih soli naftenskih kiselina je upoređivana sa aktivnošću vodenog rastvora α -naftilsirćetne kiseline, odnosno rastvorima određenih koncentracija 3-indolsirćetne kiseline, merenjem porasta dužine koleoptila pšenice. „*Test inhibicije klijanja*” semena rađen je sa semenom crne slačice, prebrojavanjem iskljalih semena nakon tretmana različitim koncentracijama kalijumovih soli naftenskih kiselina i odgovarajućim koncentracijama 3-indolsirćetne kiseline. U „*Hipokotil testu*” meren je

prirast mase hipokotila krastavca pod uticajem različitih koncentracija kalijumovih soli naftenskih kiselina. Rezultati su upoređivani sa uticajem odgovarajućih koncentracija 3-indolsirćetne kiseline na porast mase hipokotila semena krastavca.

4.1. IZOLOVANJE SIROVIH NAFTENSKIH KISELINA

4.1.1. IZOLOVANJE NAFTENSKIH KISELINA ADSORPCIJOM NA ALUMINIJUMOKSIDU

Uljni destilat (100.00 g) meša se sa adsorbensom (*Aluminiumoxid 90 activ*, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM; *Merck*; 20.00 g), na temperaturi od 60°C, u toku 4 h. Odvajanje neadsorbovanog neutralnog ulja vrši se ceđenjem preko *Büchner*-ovog levka sa slojem celita, uz ispiranje taloga petroletrom. Adsorbens sa naftenskim kiselinama se meša sa acetonom (20.0 mL) na 60°C, u toku 20-30 minuta. Acetonski ekstrakt se odvoji ceđenjem. Adsorbensu sa naftenskim kiselinama se doda dietil-etar (15.0 mL) i koncentrovana hlorovodonična kiselina (5.0 mL). Nakon mešanja uz zagrevanje na 60°C u toku 30 minuta, etarski ekstrakt naftenskih kiselina se procedi, ispere sa vodom (3 x 5.0 mL), suši anhidrovanim natrijum-sulfatom i uparava pri čemu se dobijaju sirove naftenske kiseline (0.3558 g; 0.36%; K_b 88 [mg KOH/g]).

IR (KBr film): 3500-3000 (ν O-H); 2990-2900 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 2920-2500 (ν O-H); 1708 (ν C=O); 1457-1409 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (δ C-O-H); 1289 (ν C-O); 942 (δ O-H).

4.1.2. IZOLOVANJE NAFTENSKIH KISELINA ALKALNOM EKSTRAKCIJOM SA AMONIJAKOM

OPŠTA PROCEDURA

Uljnom destilatu (400.00 g) dodaje se ekstragent (20.0 mL, metanol-voda-koncentrovani amonijak 8.0 : 7.6 : 4.4) i smeša se povremeno mućka (5-6 puta) u toku 5-10 minuta. Nakon toga smeša se ostavi u levku za odvajanje, sve do potpunog razdvajanja slojeva (24-45 h). Donji, vodeni sloj se odvoji i nakon uparavanja na rotavaporu dobiju se sirove naftenske kiseline.

Obrađivanjem ukupne polazne količine ulja (132800 g), u 332 ogleda, dobijaju se sirove naftenske kiseline (325.36 g; u odnosu na polazno ulje izolovano je 0.245%; K_b 123 [mg KOH/g]).

IR (KBr film): 3500-3000 (ν O-H); 2980-2900 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 2930-2500 (ν O-H); 1705 (ν C=O); 1457-1412 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (δ C-O-H); 1261 (ν C-O); 802 (δ O-H).

4.1.3. PREČIŠĆAVANJE SIROVIH NAFTENSKIH KISELINA

- *PREČIŠĆAVANJE NAFTENSKIH KISELINA ALKALNOM EKSTRAKCIJOM SA KALIJUM-HIDROKSIDOM*

OPŠTA PROCEDURA

Sirove naftenske kiseline (100.00 g) rastvore se u petroletru (500-600 mL). Uz konstantno mešanje se dodaje 0.5 mol/L kalijum-hidroksid u etanolu, do pH 8.5. Razblaži se vodom i u levku za odvajanje se odvoji petroletarski sloj. Vodeni sloj se još tri puta tretira sa petroletrom (3 x 50 mL), a zatim lagano uz mešanje zakiseli sa

sumpornom kiselinom (1 : 1), do pH 3. Naftenske kiseline se izdvajaju na površini vodenog sloja, a njihova ekstrakcija se vrši dietil-etrom (70; 50; 30 mL). Etarski ekstrakt se ispira vodom (3 x 100 mL), suši anhidrovanim natrijum-sulfatom i uparava.

Na osnovu kiselinskog broja i IR spektra utvrđuje se stepen čistoće kiselina i po potrebi postupak se ponavlja.

Nakon tri ponovljena prečišćavanja dobijene su naftenske kiseline (208.30 g; 64.02%; K_b 188.86 [mg KOH/g]).

- **HROMATOGRAFSKO PREČIŠĆAVANJE NAFTENSKIH KISELINA**

Naftenske kiseline (0.1610 g) su prečišćene „fleš” hromatografijom na silikagelu (*Silica gel 60* (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM; *Merck*)), na koloni \varnothing 2 cm, uz protok eluenta (petroletar-Et₂O 8 : 2) od 50 mL/min pri čemu se dobija analitički uzorak naftenskih kiselina (0.1425 g; 88.51%; K_b 199.78 [mg KOH/g]).

IR (KBr film): 3500-3000 (ν O-H); 2980-2850 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 2800-2500 (ν O-H); 1704 (ν C=O); 1457-1414 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (δ C-O-H); 1292 (ν C-O); 904 (δ O-H).

¹H NMR (CDCl₃): 4.27-6.16, 98.1% (CH₃+CH₂+CH); 14.38-15.42, 1.9% (OH).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.12-14.42, 2.5% (CH₃); 19.22-46.88, 92.3% (C_q+CH+CH₂); 180.20-180.65, 5.2% (C=O).

ESI HPLC-MS: Negativni jon modalitet, [M-H]⁻, 0.1% trietilamin u rastvoru acetonitril-voda 70 : 30.

Dominantne klase kiselina: Biciklične i triciklične strukture.

Mikroanaliza: Izračunato [%]: C= 77.14; H= 11.42. **Nađeno** [%]: C= 75.71; H= 9.72.

Prosečna molekulska formula: C₂₂H₄₀O₂.

Tabela 4.1. Maseni udeo determinisanih naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija u smeši ukupnih kiselina u spektru niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljenom u negativnom jon modalitetu [M-H]⁻

BROJ C-ATOMA U KISELINI	KLASE KARBOKSILNIH KISELINA						MASENI UDEO KISELINA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	$C_nH_{2n-Z}O_2$						
	Alkanske $C_nH_{2n}O_2$ Z= 0	Monociklične $C_nH_{2n-2}O_2$ Z= 2	Biciklične $C_nH_{2n-4}O_2$ Z= 4	Triciklične $C_nH_{2n-6}O_2$ Z= 6	Tetraciklične $C_nH_{2n-8}O_2$ Z= 8	Pentaciklične $C_nH_{2n-10}O_2$ Z= 10	
	MASENI UDEO KISELINA [%]						
15	0.55	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.82
16	0.38	0.33	0.71	0.00	0.00	0.00	1.42
17	0.66	0.55	0.82	0.93	0.00	0.00	2.96
18	0.38	0.99	1.15	1.10	0.00	0.00	3.62
19	0.71	1.15	2.30	2.14	0.00	0.00	6.30
20	0.49	1.32	2.69	2.36	0.00	0.00	6.86
21	0.60	2.09	3.79	2.20	0.00	0.00	8.68
22	1.15	2.09	4.17	1.54	1.04	0.00	9.99
23	1.37	3.18	3.79	2.30	1.37	1.15	13.16
24	1.15	1.32	4.01	4.28	1.92	1.10	13.78
25	0.99	0.88	2.91	3.13	1.65	1.04	10.60
26	0.88	0.55	2.36	2.25	1.26	1.04	8.34
27	0.44	0.00	2.09	1.65	1.04	0.66	5.88
28	0.82	0.00	1.54	1.15	0.77	0.00	4.28
29	0.00	0.00	0.93	0.00	0.99	0.00	1.92
30	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	0.00	0.60
31	0.00	0.00	0.77	0.00	0.00	0.00	0.77
	10.57	14.72	34.63	25.03	10.04	4.99	

4.2. RAZDVAJANJE NAFTENSKIH KISELINA EKSTRAKCIJOM NA BAZI RAZLIČITE KISELOSTI

Naftenske kiseline (1.0000 g; 3.56 mmola) i destilovana voda (300 mL) pomešaju se na sobnoj temperaturi, a zatim se dodaje 5% rastvor NaOH, do pH 11 (10.00 mL). Nakon potpunog rastvaranja se, polako uz mešanje na hladno u malim porcijama (1.00 mL), dodaje 5% rastvor H₂SO₄. Promena pH vrednosti se stalno prati. Kada se pH snizi za jednu pH jedinicu sa etrom se vrši ekstrakcija izdvojenih kiselina (30.0; 30.0 i 20.0 mL). Ekstrakcije su rađene u opsegu pH 10 do pH 2. Ekstrakti se suše anhidrovanim Na₂SO₄ a ekstrakciono sredstvo se ukloni uparavanjem na rotavaporu.

Tabela 4.2. Preraspodela mase naftenskih kiselina po pH vrednostima

pH Vodenog rastvora	10	9	8	7	6	5	4	3	2
Masa (NK) [mg]	0.0957	0.1269	0.0591	0.0485	0.0244	0.1171	0.2394	0.1676	0.1012
Maseni udeo [%]	9.57	12.69	5.91	4.85	2.44	11.71	23.94	16.76	10.12

- KISELINE NERASTVORNE U VODI NA pH 4

IR (KBr film): 3500-3000 (ν O-H); 2980-2850 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 2800-2500 (ν O-H); 1704 (ν C=O); 1457-1414 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (δ C-O-H); 1292 (ν C-O); 904 (δ O-H).

ESI HPLC-MS: Pozitivni jon modalitet, [M+23]⁺, 0.1% trifluorsirćetna kiseline u acetonitrilu, rastvor nosač je acetonitril-voda 1 : 1 i 0.1% natrijum-formijat.

Tabela 4.3. Maseni udeo determinisanih naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija u smeši kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora ukupnih kiselina na pH 4. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u pozitivnom jon modalitetu.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	KLASE KARBOKSILNIH KISELINA					MASENI UDEO KISELINA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	$C_nH_{2n-Z}O_2$					
	Alkanske $C_nH_{2n}O_2$ Z= 0	Monociklične $C_nH_{2n-2}O_2$ Z= 2	Biciklične $C_nH_{2n-4}O_2$ Z= 4	Triciklične $C_nH_{2n-6}O_2$ Z= 6	Tetraciklične $C_nH_{2n-8}O_2$ Z= 8	
MASENI UDEO KISELINA [%]						
14	0.00	0.00	0.56	0.00	0.00	0.56
15	0.00	0.87	0.44	0.00	0.00	1.31
16	0.00	1.06	1.37	1.06	0.00	3.49
17	0.62	0.00	2.62	3.56	0.00	6.80
18	0.94	1.87	3.37	5.05	0.00	11.23
19	1.12	1.81	3.43	5.18	1.18	12.72
20	1.18	1.87	1.68	6.24	4.43	15.40
21	1.25	2.31	3.24	6.11	4.56	17.47
22	1.25	1.87	2.06	3.56	3.56	12.30
23	1.44	1.12	1.50	2.06	2.00	8.12
24	1.18	0.00	1.25	1.56	0.75	4.74
25	0.75	0.00	1.12	1.06	0.62	3.55
26	0.00	0.00	0.75	0.62	0.00	1.37
27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0.00	0.00	0.50	0.44	0.00	0.94
	9.73	12.78	23.89	36.50	17.10	

- KISELINE NERASTVORNE U VODI NA pH 8

IR (KBr film): 3500-3000 (ν O-H); 2980-2850 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 2800-2500 (ν O-H); 1704 (ν C=O); 1457-1414 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (δ C-O-H); 1292 (ν C-O); 904 (δ O-H).

ESI HPLC-MS: Negativni jon modalitet, [M-H]⁻, 0.1% trietilamin u rastvoru acetonitril-voda 70 : 30.

Tabela 4.4. Maseni udeo determinisanih naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija u smeši kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora ukupnih kiselina na pH 8. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u negativnom jon modalitetu [M-H]⁻.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	KLASE KARBOKSILNIH KISELINA					MASENI UDEO KISELINA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	$C_nH_{2n-Z}O_2$					
	Alkanske $C_nH_{2n}O_2$ Z= 0	Monociklične $C_nH_{2n-2}O_2$ Z= 2	Biciklične $C_nH_{2n-4}O_2$ Z= 4	Triciklične $C_nH_{2n-6}O_2$ Z= 6	Tetraciklične $C_nH_{2n-8}O_2$ Z= 8	
MASENI UDEO KISELINA [%]						
15	0.00	0.00	0.78	0.00	0.00	0.78
16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17	0.00	0.00	0.88	0.00	0.00	0.88
18	0.00	0.00	0.78	0.97	0.00	1.75
19	0.97	0.00	1.07	1.07	0.00	3.11
20	0.97	1.07	2.72	2.92	1.85	9.53
21	0.88	0.78	3.41	3.99	0.00	9.06
22	0.97	2.24	5.26	3.02	0.00	11.49
23	1.70	1.75	4.87	5.26	0.00	13.58
24	0.78	1.07	3.31	7.01	4.77	16.94
25	0.00	2.82	3.60	2.72	0.00	9.14
26	0.00	5.26	2.72	2.34	2.14	12.46
27	0.88	0.00	1.65	2.14	1.75	6.42
28	0.00	1.17	1.46	1.07	1.17	4.87
	7.15	16.16	32.51	32.51	11.68	

- KISELINE NERASTVORNE U VODI NA pH 10

IR (KBr film): 3500-3000 (ν O-H); 2980-2850 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 2800-2500 (ν O-H); 1704 (ν C=O); 1457-1414 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (δ C-O-H); 1292 (ν C-O); 904 (δ O-H).

ESI HPLC-MS: Pozitivni jon modalitet, [M+H]⁺, 0.1% sirćetna kiselina u rastvoru acetonitril-voda 70 : 30.

Tabela 4.5. Maseni udeo determinisanih naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija u smeši kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora ukupnih kiselina na pH 10. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u pozitivnom jon modalitetu [M+H]⁺.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	KLASE KARBOKSILNIH KISELINA						MASENI UDEO KISELINA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	C _n H _{2n-Z} O ₂						
	Alkanske C _n H _{2n} O ₂ Z= 0	Monociklične C _n H _{2n-2} O ₂ Z= 2	Biciklične C _n H _{2n-4} O ₂ Z= 4	Triciklične C _n H _{2n-6} O ₂ Z= 6	Tetraciklične C _n H _{2n-8} O ₂ Z= 8	Pentaciklične C _n H _{2n-10} O ₂ Z= 10	
MASENI UDEO KISELINA [%]							
13	0.00	0.00	1.33	0.00	0.00	0.00	1.33
14	0.98	1.00	0.78	0.00	0.00	0.00	2.76
15	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.02
16	0.78	1.33	0.44	0.78	0.00	0.00	3.33
17	1.56	1.11	0.00	1.06	0.00	0.00	3.73
18	2.39	1.11	1.67	1.56	0.00	0.00	6.73
19	3.89	2.05	1.67	0.00	0.00	0.00	7.61
20	4.11	1.44	1.44	0.00	1.44	0.00	8.43
21	4.83	1.11	1.11	2.00	1.33	0.00	10.38
22	3.50	1.89	1.78	2.22	3.66	0.00	13.05
23	1.33	0.00	1.22	1.67	3.05	2.50	9.77
24	0.89	1.00	1.00	1.50	2.33	2.22	8.94
25	0.00	0.89	0.89	1.56	0.00	2.44	5.78
26	0.00	1.00	1.00	1.89	3.11	1.56	8.56
27	0.00	0.00	1.00	0.00	1.89	1.67	4.56
28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.83
29	0.00	0.00	0.00	1.56	0.89	0.78	3.23
	25.28	13.93	15.33	15.80	17.70	12.00	

4.3. DERIVATIZACIJA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1. SINTEZE ESTARA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1.1. SINTEZE METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1.1.1. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA DIAZOMETANOM

Dobijanje diazometana

Etanol (96%, 2.50 mL) se dodaje u vodeni rastvor kalijum-hidroksida (0.50 g kalijum-hidroksida u 0.90 mL vode), koji se nalazi u destilacionom balonu. Balon se poveže sa levkom za dokapavanje i kondenzatorom. Kondenzator se preko lule, plastičnim crevom spoji sa dve ispiralice. Obe ispiralice se hlade ledom, prva je prazna a u drugoj se nalazi dietil-etar za hvatanje viška diazometana. Reakcioni sud se zagreva na 65°C preko uljanog kupatila i iz levka za dokapavanje se lagano dodaje rastvor *N*-nitrozo-*N*-metil-*p*-toluensulfonamida (DIAZALD) (2.15 g; 0.01 mol) u suvom dietil-etru (20.0 mL). Brzina dokapavanja se usklađuje s brzinom destilacije etarskog rastvora diazometana. Destilacija se vrši sve dok destilat ima žutu boju. Etarski destilat sadrži diazometan (oko 0.30 g; 7.15 mmola).

Metilovanje naftenskih kiselina diazometanom

Naftenske kiseline (0.5693 g; 2.03 mmola) rastvore se u smeši metanol-voda (10 : 1; oko 4.0 mL) i na sobnoj temperaturi se kapalicom u malim porcijama (0.5-1.0 mL) dodaje svež etarski rastvor diazometana. Prestanak izdvajanja mehurića azota nakon ponovnog dodavanja rastvora diazometana, kao i stabilna žuto-zelena boja viška diazometana znak su da je esterifikacija završena.

Etar se oddestiluje u vakuumu a ostatak se ponovo rastvori u etru (15.0 mL) i tretira 0.1 mol/L vodenim rastvorom natrijum-hidroksida (1 x 5.0 mL). Etarski ekstrakt se ispere vodom (2 x 5.0 mL) i suši anhidrovanim natrijum-sulfatom. Nakon uklanjanja etra zaostaju sirovi metil-estri naftenskih kiselina (0.5826 g; 97.47%) koji se prečiste „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3). Pri tome se dobijaju čisti metil-estri naftenskih kiselina (0.5706 g; 95.47%).

IR (KBr film): 2820-2980 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1739 (ν C=O); 1459-1435 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1377 (ν_{as} C-O-C); 1252-1167 (ν_{sim} C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃): [0.52-1.00 (CH₃) i 1.00-2.60 (CH₂+CH)], 90.1%; 3.54-3.70, 9.9% (OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.06-14.35, 3.9% (CH₃); 19.64-43.32, 85.2% (C_q+CH+CH₂); 51.23-51.32, 7.0% (OCH₃); 173.50-178.24, 3.8% (C=O).

ESI HPLC-MS: Pozitivni jon modalitet, [M+23]⁺, 0.1% trifluorsirćetna kiselina u acetonitrilu, rastvor nosač je acetonitril-voda 1 : 1 i 0.1% natrijum-formijat.

Dominantna klasa estara: Biciklične i monociklične strukture.

Mikroanaliza: Izračunato [%]: C= 77.4; H= 11.6. **Nađeno** [%]: C= 76.04; H= 10.79.

Prosečna formula metil-estara: C₂₁H₃₉ COOCH₃.

Tabela 4.6. Maseni udeo determinisanih metil-estara naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija estara u smeši sintetizovanih metilnaftenata. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u pozitivnom jon modalitetu $[M+23]^+$.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	HOMOLOGE Z-SERIJE METILNAFTENATA						MASENI UDEO KISELINA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	Alkanski metil- naftenati Z= 0	Monociklični metil- naftenati Z= 2	Biciklični metil- naftenati Z= 4	Triciklični metil- naftenati Z= 6	Tetraciklični metil- naftenati Z= 8	Pentaciklični metil- naftenati Z= 10	
	MASENI UDEO METIL-ESTARA [%]						
12	0.54	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	1.04
13	0.00	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89
14	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35
15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17	0.00	0.69	0.50	0.00	0.00	0.00	1.19
18	0.00	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00	1.00
19	0.99	0.00	0.89	0.00	0.00	0.00	1.88
20	0.89	2.38	2.13	0.00	0.00	0.00	5.40
21	1.44	2.88	4.16	2.38	1.04	0.00	11.90
22	0.84	3.87	4.81	2.92	1.24	0.00	13.68
23	3.12	3.67	4.26	1.39	0.99	0.00	13.43
24	1.74	4.41	4.12	4.21	1.09	0.00	15.57
25	0.00	2.18	2.53	3.82	2.53	0.00	11.06
26	0.00	1.49	2.18	2.18	1.44	0.69	7.98
27	0.00	1.29	1.83	1.14	1.39	0.84	6.49
28	0.00	0.00	1.59	1.44	0.89	0.50	4.42
29	0.00	0.00	0.84	0.00	0.89	0.84	2.57
30	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	0.54	1.14
	9.56	25.10	30.94	19.48	11.50	3.41	

4.3.1.1.2. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM

Naftenske kiseline (0.4960 g; 1.77 mmola) rastvore se u suvom metanolu (2.50 mL) i doda se koncentrovana sumporna kiselina (10.0 μ L). Reakciona smeša se meša uz refluks, u toku 4 h. Reakcija je praćena tankoslojnom hromatografijom (benzen-EtOAc 18 : 0.25). Reakciona smeša se upari, ostatak se rastvori u dietil-etru (15.0 mL), a zatim se ispere sa zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 5.0 mL), zatim sa vodom (3 x 5.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja i uparavanja etarske faze dobijaju se sirovi metil-estri naftenskih kiselina (0.5054 g; 97.04%). Prečišćavanjem na koloni „fleš” silikagela (petroletar-Et₂O 9 : 0.3) dobijaju se čisti metil-estri (0.4703 g; 90.30%).

¹H NMR (CDCl₃): 0.59-2.60 (CH₃+CH₂+CH); 3.60-3.70 (OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 13.99-46.61 (CH₃+C_q+CH+CH₂); 51.19-57.30 (OCH₃); 173.68-177.09 (C=O).

4.3.1.1.3. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA

Naftenske kiseline (0.2997 g; 1.07 mmola) se rastvore u suvom metanolu (1.50 mL), doda se koncentrovana sumporna kiselina (6.0 μ L; 0.107 mmola) i silikagel (0.0204 g). Uslovi reakcije u mikrotalasnom reaktoru uz reflux: 150 W, 65^oC, 5 min.. Tok esterifikacije je praćen pomoću TLC (benzen-EtOAc 18 : 0.25). Nakon hlađenja reakciona smeša se upari a ostatak rastvori u dietil-etru (15.0 mL). Etarski rastvor se tretira zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 5.0 mL) a zatim ispere vodom (3 x 5.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja rastvora i uparavanja rastvarača dobijaju se sirovi metil-estri naftenskih kiselina (0.2963 g; 94.15%). Čisti metil-estri (0.1997 g; 63.46%) dobijeni su „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.05-47.17 (CH₃+C_q+CH+CH₂); 51.21-51.31 (OCH₃); 173.67 (C=O).

4.3.1.1.4. SINTEZA METIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA p-TOLUENSULFONSKOM KISELINOM UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA

Naftenske kiseline (0.2942 g; 1.05 mmola) se rastvore u suvom metanolu (1.50 mL), doda se *p*-toluensulfonska kiselina (0.0181 g; 0.105 mmola) i silikagel (0.0162 g). Reakcioni uslovi i obrada reakcione smeše su kao u sintezi 4.3.1.1.3.. Dobijeni su sirovi metil-estri naftenskih kiselina (0.2950 g; 95.50%). Prečišćavanjem na koloni „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3) dobijaju se čisti metil-estri (0.1626 g; 52.64%).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.01-43.32 (CH₃+C_q+CH+CH₂); 47.68-51.19 (OCH₃); 173.18-173.88 (C=O).

4.3.1.2. SINTEZE ETIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1.2.1. SINTEZA ETIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM

Naftenske kiseline (0.5287 g; 1.88 mmola) se rastvore u suvom etanolu (2.50 mL), doda se koncentrovana sumporna kiselina (10.0 μ L i reakciona smeša se meša uz reflux 8 h. Tok esterifikacije je praćen pomoću TLC (benzen-EtOAc 18 : 0.25). Nakon otparavanja viška etanola iz reakcione smeše ostatak se rastvori u dietil-etru (15.0 mL) a dobijeni etarski rastvor ispere zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 5.0 mL), pa sa vodom (3 x 5.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja rastvora i uparavanja rastvarača dobijaju se sirovi etil-estri naftenskih kiselina (0.5630 g; 96.82%). Čisti etil-estri (0.5336 g; 91.76%) dobijaju se nakon „fleš” hromatografije (petroletar-Et₂O 9 : 0.3).

IR (KBr film): 2926-2857 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1736 (ν C=O); 1490-1430 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1376 (ν_{as} C-O-C); 1251 (ν_{sim} C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃): 0.58-2.68, 94.8% (CH₃+CH₂+CH); 3.96-4.24, 5.2% (OCH₂).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.07-14.19, 9.8% (CH₃); 19.60-50.97, 79.4% (C_q+CH+CH₂); 59.97, 6.0% (OCH₂); 173.08-176.18, 4.8% (C=O).

ESI HPLC-MS: Pozitivni jon modalitet, [M+H]⁺, 0.1% trifluorsirćetna kiselina u acetonitrilu, rastvor nosača acetonitril-voda 1 : 1 i 0.1% mravlja kiselina.

Dominantna klasa estara: Biciklične i triciklične strukture.

Mr 308.85.

Prosečna formula etil-estara: $C_{17}H_{29}COOC_2H_5$.

Tabela 4.7. Maseni udeo determinisanih etil-estara naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija estara u smeši sintetizovanih etilnaftenata. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u pozitivnom jon modalitetu $[M+H]^+$.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	HOMOLOGE Z-SERIJE ETILNAFTENATA					MASENI UDEO ESTARA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	Alkanski etilnaftenati Z= 0	Monociklični etilnaftenati Z= 2	Biciklični etilnaftenati Z= 4	Triciklični etilnaftenati Z= 6	Tetraciklični etilnaftenati Z= 8	
	MASENI UDEO ETIL-ESTARA [%]					
12	1.18	0.00	1.06	0.00	0.00	2.24
13	1.62	0.00	2.25	0.00	0.00	3.87
14	2.68	1.81	3.43	1.50	0.00	9.42
15	3.37	2.81	4.80	2.74	0.00	13.72
16	2.00	3.24	5.93	2.93	0.00	14.10
17	1.56	3.43	6.24	3.93	0.00	15.16
18	1.18	1.75	3.31	2.74	0.00	8.98
19	0.00	0.94	2.31	2.31	1.75	7.31
20	1.12	1.00	2.00	1.62	0.00	5.74
21	1.31	0.00	1.62	1.68	1.44	6.05
22	0.00	0.00	0.00	1.12	0.00	1.12
23	0.00	0.00	0.69	0.00	0.00	0.69
24	0.00	0.00	1.44	1.62	1.12	4.18
25	0.00	0.00	0.00	0.87	0.00	0.87
26	0.00	0.94	0.00	0.00	0.00	0.94
27	0.00	0.00	0.81	0.00	0.00	0.81
28	0.00	0.00	0.69	0.00	0.31	1.00
29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.69
30	0.00	0.00	0.00	0.00	1.18	1.18
31	0.00	0.00	0.00	0.00	1.44	1.44
32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50
	16.02	15.92	36.58	23.06	8.43	

4.3.1.2.2. SINTEZA ETIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA

Naftenske kiseline (0.3051 g; 1.09 mmola) se rastvore u suvom etanolu (1.50 mL), doda se koncentrovana sumporna kiselina (6.0 μ L; 0.107 mmola) i silikagel (0.0168 g). U mikrotalasnom reaktoru u otvorenom sistemu uz refluks primenjeni su reakcioni uslovi: 150 W; 79^oC; 5 min, praćenjem toka reakcije u intervalima od jednog minuta. Obrada reakcione smeše je kao u postupku 4.3.1.1.3.. Dobijeni su sirovi etil-estri naftenskih kiselina (0.3094 g; 92.19%). Prečišćavanjem „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3) dobijaju se čisti etil-estri (0.1237 g; 36.86%).

¹³C NMR(CDCl₃): 14.07-50.13 (CH₃+C_q+CH+CH₂); 60.01-65.99 (OCH₂); 173.34-173.84 (C=O).

4.3.1.3. SINTEZE *n*-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1.3.1. SINTEZA *n*-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA KATALIZOVANA SUMPORNOM KISELINOM

Naftenske kiseline (0.5194 g; 1.85 mmola) rastvore se u suvom *n*-butanolu (2.50 mL), doda se koncentrovana sumporna kiselina (10.0 μ L) i reakciona smeša se uz refluks meša 6 h. Tok reakcije je praćen pomoću TLC (benzen-EtOAc 18 : 0.25). *n*-Butanol se ukloni destilacijom u vakuumu a ostatak se rastvori u dietil-etri (15.0 mL). Etarski rastvor se ispere zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 5.0 mL) a zatim sa vodom (3 x 5.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja i uparavanja etarskog rastvora zaostaju sirovi estri, čijim se prečišćavanjem „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3) dobijaju čisti *n*-butil-estri (0.5873 g; 94.24%).

IR (KBr film): 2927-2871 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1736 (ν C=O); 1470-1400 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (ν_{as} C-O-C); 1248 (ν_{sim} C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃): 0.64-2.38, 95.85% (CH₃+CH₂+CH); 3.76-4.12, 4.1% (OCH₂).

¹³C NMR (CDCl₃): 13.00-15.00, 10.7% (CH₃); 16.00-45.00, 80.5% (CH+CH₂); 63.00-65.00, 5.6% (OCH₂); 172.50-175.50, 3.2% (C=O).

Mr 336.91.

Prosečna formula *n*-butil-estara: C₁₇H₃₁ COOC₄H₉.

4.3.1.3.2. SINTEZA *n*-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA

Naftenske kiseline (0.3087 g; 1.10 mmola) se rastvore u suvom *n*-butanolu (1.50 mL) doda se koncentrovana sumporna kiselina (6.0 μ L; 0.107 mmola) i silikagel (0.0169 g). Uslovi reakcije u mikrotalasnom reaktoru u otvorenom sistemu uz refluks su: 150 W; 118⁰C; 5 min., praćenje toka reakcije pomoću TLC (benzen-EtOAc 18 : 0.25) rađeno je u intervalima od jednog minuta. Obradom reakcione smeše, kao u postupku 4.3.1.1.3., dobijeni su sirovi *n*-butil-estri naftenskih kiseline (0.3704 g; 91.50%). Prečišćavanjem „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3) dobijeni su čisti *n*-butil-estri (0.2265 g; 61.15%).

¹H NMR (CDCl₃): 0.83-2.36 (CH₃+CH₂+CH); 3.90-4.18 (OCH₂).

¹³C NMR (CDCl₃): 13.64-47.72 (CH₃+CH+CH₂); 63.89-63.96 (OCH₂); 173.35-173.83 (C=O).

4.3.1.4. SINTEZE *terc*-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1.4.1. SINTEZA *terc*-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA IZ HLORIDA KISELINA

Naftenske kiseline (0.5082 g; 1.81 mmola) i sveže predestilovan tionil-hlorid (0.26 mL, 3.60 mmola) mešaju se na oko 100⁰C, oko 1 h tj. dok ne prestane izdvajanje gasovitog hlorovodonika i sumpor(IV)-oksida). Gasovi se apsorbuju u za to pripremljenim trapovima za hvatanje gasova. Nakon toga, doda se nova količina tionil-hlorida (0.26 mL, 3.60 mmola) i reakcija se nastavi, pri istim uslovima u toku još 1 h. Višak tionil-hlorida se zatim ukloni vakuum destilacijom, a sirovi hloridi naftenskih kiseline se rastvore u suvom dietil-etri (0.72 mL), uz mešanje i blago ključanje. Pri istim reakcionim uslovima dobijenom rastvoru se postepeno dokapava rastvor dobijen mešanjem *terc*-butil alkohola (2.54 mL), *N,N*-dimetilaniлина (0.32 mL; 2.50 mmola) i suvog dietil-etra (0.72 mL), nakon čega se reakcija izvodi u toku 1 h. Tok reakcije je praćen pomoću

TLC (petroletar-Et₂O 9 : 0.3). U do sobne temperature rashlađenu reakcionu smešu doda se voda (1.48 mL) a odvojeni organski sloj se ispere prvo rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 3.0 mL) a zatim vodom (4 x 3.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja etarskog rastvora i uparavanja etra zaostaje sirova smeša *terc*-butil-estara, koja se prečisti „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 0.3). Dobijaju se čisti estri (0.4889 g; 80.17%).

IR (KBr film): 2954-2858 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1731 (ν C=O); 1460-1400 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1391-1367 (ν_{as} C-O-C); 1256 (ν C(CH₃)₃); 1151 (ν_{sim} C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃): 0.64-1.36, 67.1% (CH₃ +CH₂+CH); 1.38-1.60, 32.9% (OC(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 13.00-15.50, 3.4% (CH₃); 18.00-56.00, 88.9% (CH+CH₂+CH₃-*t*Bu); 78.00-81.00, 4.3% (C_q-*t*Bu); 172.00-177.50, 3.4% (C=O).

Mr 336.91.

Prosečna formula *terc*-butil-estara: C₁₇H₃₁COOC(CH₃)₃.

4.3.1.4.2. SINTEZA *terc*-BUTIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO - KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA

Naftenske kiseline (0.2953 g; 1.05 mmola), suvi *terc*-butil alkohol (1.50 mL), koncentrovana sumporna kiselina (6.0 μ L; 0.107 mmola) i silikagel (0.0162 g), u mikrotalasnom reaktoru uz refluks mešaju se pri sledećim uslovima: 150 W; 83⁰C; 5 min. Praćenje toka reakcije pomoću TLC (benzen-EtOAc 18 : 0.25) rađeno je u intervalima od jednog minuta. Obradom reakcione smeše na način koji je opisan u postupku 4.3.1.1.3., dobijeni su *terc*-butil-estri naftenskih kiseline (0.3029 g; 85.49%).

¹H NMR (CDCl₃): 0.86-1.45 (CH₃ +CH₂+CH); 1.45 (OC(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.09-48.54 (CH₃+CH+CH₂+CH₃-*t*Bu); 60.03-76.48 (C_q-*t*Bu); 178.74 (C=O).

4.3.1.5. SINTEZE BENZIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.1.5.1. SINTEZA BENZIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA IZ HLORIDA KISELINA

Naftenske kiseline (0.5027 g; 1.79 mmola) i sveže predestilovan tionil-hlorid (0.26 mL; 3.60 mmola) se mešaju na temperaturi ključanja 1 h (tj. dok ne prestane izdvajanje hlorovodonika i sumpor(IV)-oksida). Gasovi se apsorbuju u trapovima za hvatanje gasova. Zatim se doda nova količina tionil-hlorida (0.26 mL; 3.60 mmola) i zagrevanje se nastavi još 1 h. Nakon udaljavanja viška tionil-hlorida destilacijom u vakuumu, ostatak se rastvori u dietil-etru (0.70 mL) uz mešanje i refluks, a zatim se dokapava smeša benzil alkohola (2.52 mL), *N,N*-dimetilanilina (0.32 mL; 2.50 mmola) i suvog dietil-etra (0.70 mL). Reakciona smeša se uz refluks meša na oko 100⁰C u toku 1 h. Praćenje toka reakcije rađeno je pomoću TLC (petroletar-Et₂O 9 : 0.4). Nakon hlađenja do sobne temperature i dodatka vode (1.40 mL), organska faza se odvoji i tretira najpre zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 3.0 mL) a zatim vodom (4 x 3.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja etarskog rastvora i uklanjanja etra uparavanjem, zaostala sirova smeša se prečisti „fleš” hromatografijom (petroletar-Et₂O 9 : 1), pri čemu se dobijaju čisti benzil-estri naftenskih kiseline (0.5606 g; 84.43%).

IR (KBr film): 3066-3034 (ν C-H Ar); 2925-2857 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1736 (ν C=O); 1587-1498 (ν C-C Ar); 1470-1410 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1378 (ν_{as} C-O-C); 1158 (ν_{sim} C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃): 0.66-2.40, 83.0% (CH+CH₂+CH₃); 5.05-5.15, 5.3% (OCH₂); 7.28-7.40, 11.7% (H-Ar).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.08-14.37, 3.5% (CH₃); 19.15-53.64, 57.2% (C+CH+CH₂), 65.89-66.61 4.8% (CH₂-Bz), 124.32-129.18, 27% (CH-Ar); 136.04-136.19, 3.9% (C-Ar); 172.83-176.40, 3.6% (C=O).

Mr 370.92.

Prosečna formula benzil-estara: C₁₇H₃₁ COOCH₂C₆H₅.

4.3.1.5.2. SINTEZA BENZIL-ESTARA NAFTENSKIH KISELINA UZ KO-KATALITIČKO DEJSTVO MIKROTALASA

Naftenske kiseline (0.3065 g; 1.09 mmola), suvi benzil alkohol (1.50 mL), koncentrovana sumporna kiselina (6.0 μL; 0.107 mmola) i silikagel (0.0168 g) mešaju se uz refluks u mikrotalasnom reaktoru pri reakcionim uslovima: 150 W; 207⁰C; 5 min.). Tok reakcije je praćen pomoću TLC (petroletar-Et₂O 9 : 0.4) u intervalima od 1 min.. Nakon hlađenja reakciona smeša je rastvorena u dietil-etru (15.0 mL) i prenetu u levak za odvajanje. Etarski rastvor je ispran zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 5.0 mL), a potom sa vodom (3 x 5.0 mL), do pH 7. Nakon sušenja rastvora i uklanjanja etra uparavanjem dobijaju se sirovi benzil-estri naftenskih kiselina u smeši sa zaostalim benzil-alkoholom (1.8677 g). Čisti benzil-estri (0.2058 g; 50.83%) dobijaju se nakon „fleš” hromatografije (petroletar-Et₂O 9 : 1).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.08-53.64 (CH₃+C+CH+CH₂), 65.89-66.61 (CH₂ iz Bn), 124.32-129.18 (CH-Ar); 136.04-136.19 (C-Ar); 172.83-176.40 (C=O).

4.3.2. SINTEZE AMIDA NAFTENSKIH KISELINA

4.3.2.1. SINTEZA AMIDA NAFTENSKIH KISELINA SA AMONIJAKOM

Naftenske kiseline (0.4784 g; 1.70 mmola), sveže predestilovani tionil-hlorid (0.25 mL, 3.40 mmola) mešaju se na oko 100⁰C, 1 h odnosno dok ne prestane izdvajanje gasovitog hlorovodonika i sumpor(IV)-oksida, koji se uvode u trapove za hvatanje gasova. Nakon toga, doda se nova količina tionil-hlorida (0.25 mL; 3.40 mmola) i reakcija se nastavi, pri istim uslovima u toku još 1 h. Višak tionil-hlorida se zatim ukloni vakuum destilacijom, a zaostali sirovi hloridi naftenskih kiselina se ohlade u ledenom kupatilu (0⁰C) i uz neprestano mešanje i hlađenje polako im se dokapava prethodno ohlađen amonijak (1.92 mL; 0.102 mol). Brzina dokapavanja se podesi tako da bele pare ne iščezavaju, a pošto se celokupna količina amonijaka doda, reakciona smeša se ostavi u ledenom kupatilu dodatnih 15 minuta. Reakcija je praćena pomoću TLC (toluen-EtOAc 1 : 1). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu reakciona smeša se razblaži dietil-etrom (10.0 mL), vodeni sloj se ispusti a etarski rastvor ispere razblaženom hlorovodoničnom kiselinom (1 x 3.0 mL) pa sa vodom, do pH 7. Nakon sušenja etarskog rastvora rastvarač se ukloni uparavanjem, pri čemu zaostaju sirovi amidi naftenskih kiselina (0.4740 g; 99.43%). Prečišćavanjem „fleš” hromatografijom (toluen-EtOAc 1 : 1) izolovani su čisti amidi (0.3134 g; 65.74%).

IR (KBr film): 3350 (ν_{as} CONH₂); 3194 (ν_{sim} CONH₂); 2926-2857 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1659-1612 (ν C=O); 1455 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1408 (δ NH); 1132 (ν CN).

¹H NMR (CDCl₃): 5.49-6.95 (HN-C=O).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.07-14.35 (CH₃); 19.43-47.50, (C+CH+CH₂); 176.72-175.85 (C=ONH₂).

ESI HPLC-MS: Pozitivni jon modalitet, [M+H]⁺, 0.1% trifluorsirćetna kiselina u acetonitrilu, rastvor nosača acetonitril-voda 1 : 1 i 0.1% mravlja kiselina.

Dominantna klasa amida: Biciklične strukture (33.45%) sa dominantnim strukturama kiselina od C 16-22 i triciklične strukture (24.65%) sa dominantnim strukturama kiselina od C 17-23.

Mr 279.82.

Prosečna formula amida: C₁₈H₃₃CONH₂.

Tabela 4.8. Maseni udeo determinisanih amida naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija amida u smeši sintetizovanih amida naftnih kiselina. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u pozitivnom jon modalitetu [M+H]⁺.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	HOMOLOGE Z-SERIJE AMIDA NAFTNIH KISELINA						MASENI UDEO AMIDA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	Alkanska Z= 0	Monociklična Z= 2	Biciklična Z= 4	Triciklična Z= 6	Tetraciklična Z= 8	Pentaciklična Z= 10	
	MASENI UDEO AMIDA NAFTNIH KISELINA [%]						
12	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.38
13	0.35	0.00	0.88	0.00	0.00	0.00	1.23
14	0.00	0.00	1.11	0.00	0.00	0.00	1.11
15	0.00	0.92	2.00	0.77	0.00	0.00	3.69
16	0.00	1.38	3.84	1.15	0.50	0.00	6.87
17	0.00	1.77	3.73	2.88	0.73	0.00	9.11
18	0.38	0.46	2.65	3.30	1.00	0.00	7.79
19	1.00	2.23	3.84	2.30	0.96	0.00	10.33
20	0.84	1.23	2.07	1.65	1.61	0.00	7.40
21	0.58	2.30	2.34	2.04	1.38	1.27	9.91
22	1.11	1.38	2.30	2.65	1.88	1.19	10.51
23	0.84	0.00	1.27	2.57	2.15	1.27	8.10
24	0.46	1.38	1.61	1.34	1.08	0.92	6.79
25	0.00	0.69	1.81	1.23	0.88	0.77	5.38
26	0.00	0.54	1.46	1.08	0.69	0.88	4.65
27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.96	0.96
28	0.00	0.00	0.92	0.69	0.00	0.00	1.61
29	0.00	0.00	0.54	0.46	0.42	0.46	1.88
30	0.00	0.00	0.35	0.31	0.73	0.00	1.39
31	0.00	0.00	0.35	0.23	0.27	0.00	0.85
	5.56	14.28	33.45	24.65	14.28	7.72	

4.3.2.2. SINTEZA ANILIDA NAFTENSKIH KISELINA

Naftenske kiseline (0.5049 g; 1.80 mmola) i sveže predestilovani tionil-hlorid (0.26 mL; 3.60 mmola) se mešaju na temperaturi ključanja oko 1 h, sve dok ne prestane izdvajanje gasovitog hlorovodonika i sumpor(IV)-oksida, u aparaturi snabdevenoj trapom za hvatanje gasova, a zatim se doda nova količina tionil-hlorida (0.26 mL; 3.60 mmola) i zagrevanje se nastavi još 1 h. Nakon udaljavanja viška tionil-hlorida destilacijom u vakuumu, ostatak se rastvori u čistom dietil-etru (2.50 mL). Rastvoru hlorida naftenskih kiselina uz mešanje se na sobnoj temperaturi dokapava rastvor anilina (0.98 mL, 10.80 mmola) u dietil-etru (10.0 mL) i reakciona smeša se meša još 30 min. tj. dok miris hlorida ne nestane. Provera toka reakcije je vršena pomoću TLC (benzen-EtOAc 18 : 0.25). Reakcija se prekida dokapavanjem viška razblažene hlorovodonične kiseline (1 : 1; 2.50 mL), uz mešanje a rezultujuća reakciona smeša se meša još dodatnih 15 minuta. Vodeni sloj se odvoji a etarski se ispere prvo zasićenim

rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (1 x 5.0 mL) pa sa vodom (2 x 5.0 mL), do pH 7. Rastvor se osuši, etar se upari i zaostaje smeša sirovih anilida naftenskih kiselina (0.6347 g; 99.18%). Čisti anilidi (0.6174 g; 96.48%) dobijaju se nakon „fleš” hromatografije (toluen-EtOAc 18 : 0.5).

IR (KBr film): 3350-3260 (ν_{as} CN); 2925-2856 (ν_{as} i ν_{sim} CH₂, CH₃); 1659 (ν C=O); 1600 (ν C-C Ar); 1499-1442 (δ_{as} CH₃, CH₂ cikl.); 1377-1251 (ν C_{Ar}-N); 754-692 (ν NH).

¹H NMR (CDCl₃): 0.28-2.10, 85.4% (CH+CH₂+CH₃); 6.62-7.28, 13.5% (H-Ar); 7.58-8.20, 1.0% (NH).

¹³C NMR (CDCl₃): 14.07-14.35, 1.0% (CH₃); 19.13-47.50, 65.7% (C+CH+CH₂); 119.98-128.69, 24.4% (CH-Ar); 138.12, 5.0% (C-Ar); 171.73-175.20, 4.0% (C=O).

ESI HPLC-MS: Pozitivni jon modalitet, [M+H]⁺, 0.1% trifluorsirćetna kiselina u acetonitrilu, rastvor nosača acetonitril-voda 1 : 1 i 0.1% mravlja kiselina.

Dominantna klasa anilida: Biciklične (35.06%) sa dominantnim strukturama kiselina od C 16-21 i triciklične strukture (30.31%) sa dominantnim strukturama kiselina od C 14-21.

Mr 355.91.

Prosečna formula anilida: C₁₇H₃₁ CONHC₆H₅.

Tabela 4.9. Maseni udeo determinisanih anilida naftnih kiselina, kao i udeo homologih Z-serija anilida u smeši sintetizovanih anilida naftnih kiselina. Spektar niske rezolucije ESI HPLC-MS snimljen je u pozitivnom jon modalitetu [M+H]⁺.

BROJ C-ATOMA U KISELINI	HOMOLOGE Z-SERIJE ANILIDA NAFTNIH KISELINA						MASENI UDEO ANILIDA SA ISTIM BROJEM C-ATOMA [%]
	Alkanska Z= 0	Monociklična Z= 2	Biciklična Z= 4	Triciklična Z= 6	Tetraciklična Z= 8	Pentaciklična Z= 10	
	MASENI UDEO ANILIDA NAFTNIH KISELINA [%]						
12	0.38	0.32	0.51	0.00	0.00	0.00	1.21
13	0.00	0.45	0.96	1.16	0.00	0.00	2.57
14	0.00	0.00	1.41	2.06	0.00	0.00	3.47
15	0.00	0.00	2.70	3.21	0.00	0.00	5.91
16	0.58	0.64	4.18	3.92	0.90	0.00	10.22
17	1.03	1.03	4.18	4.88	2.12	0.00	13.24
18	1.09	0.96	6.42	4.30	2.50	1.16	16.43
19	2.06	1.93	5.14	3.15	1.73	0.77	14.78
20	1.48	1.16	3.40	3.21	1.28	1.35	11.88
21	0.64	1.16	2.12	2.12	1.48	0.58	8.10
22	1.22	1.28	1.86	1.28	1.16	0.38	7.18
23	0.32	0.51	1.03	0.64	0.45	0.00	2.95
24	0.00	0.00	0.64	0.38	0.00	0.00	1.02
25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.51	0.51
27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
29	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00	0.00	0.51
	8.80	9.44	35.06	30.31	11.62	4.75	

4.4. BIOLOŠKI TESTOVI NA AUKSINE

4.4.1. „Koleoptil test“

Priprema rastvora:

RASTVORI 3-INDOLSIRČETNE KISELINE U VODI

3-Indolsirčetna kiselina (0.0125 g) rastvara se u sveže prokuvanoj destilovanoj vodi (25.0 mL), uz dokapavanje rastvora kalijum-hidroksida (5.0 mmol/L) do potpunog rastvaranja. Pripremljeni rastvor koncentracije 500 mg/L se čuva na -18°C.

- Razblaživanje ovog rastvora 3-indolsirčetne kiseline izvodi se sa sveže prokuvanom destilovanom vodom. Pripremana su razblaženja sledećih koncentracija: 10.0; 1.0; 0.10; 0.01 i 0.001 mg/L.

RASTVOR SAHAROZE

Saharoza (5.00 g) se rastvori u sveže prokuvanoj destilovanoj vodi (20.0 mL).

RASTVORI KALIJUMOVIH SOLI NAFTENSKIH KISELINA U VODI

Naftenske kiseline (0.0250 g) se odmere u čašu (50 mL), doda se sveže prokuvana destilovana voda (10.0 mL) i zatim se uz neprestano mešanje, pomoću transpipete postepeno dodaje 10%-ni rastvor kalijum-hidroksida u vodi do potpunog rastvaranja. Rastvor kalijumovih soli ima pH~13.5, pa se pH vrednost podešava na pH 9.5 dokapavanjem 10%-nog rastvora hlorovodonične kiseline i dopuni vodom do 25.0 mL. Rastvor je koncentracije 1.0 g/L.

- Razblaženja su pravljena sveže prokuvanom destilovanom vodom. Koncentracije razblaženja kalijumovih soli naftenskih kiselina su: 10.0; 1.0; 0.5; 0.1; 0.05 i 0.01 mg/L.

Opis metode:

Semena jare pšenice sorte *Venera* se operu i potope u vodu na sobnoj temperaturi u toku 18-20 h. Nabubrela semena se ređaju na vlažni filter-papir, u zdeli za klijanje u vertikalnom položaju, kako bi se kasnije klice izduživale bez krivljenja koleoptila. Prvi dan se seme termostatira na 25°C, a drugi dan na 16-18°C. S obzirom na veoma visoke spoljne temperature u periodu izvođenja testa, urađena je modifikacija postupka tako da je izostavljena faza bubrenja i seme je postavljeno 69 h, na temperaturi od 27-29.5°C, u mraku, uz svakodnevno zalivanje. Za test se odaberu koleoptili koji su izrasli pravolinijski a dužine su 14-15 mm, jer su oni najosetljiviji na dejstvo auksina. Odabir je izveden pažljivo tako da razlika u dužini odabranih koleoptila ne bude veća od 2 mm. Od odabranih koleoptila na rastojanju od 5 mm od vrha odsecaju se segmenti dužine 6 mm. Ovaj deo rada se izvodi u mraku. Iz segmenata se izgura prvi list tankim staklenim štapićem. Segmenti koleoptila (po 5 komada) se stavljaju u bočice sa rastvorima određenih koncentracija 3-indolsirčetne kiseline, kalijumovih soli naftenskih kiselina ili vode (po 4.00 mL), uz dodatak rastvora saharoze da koncentracija saharoze u rezultujućem rastvoru kojim se tretiraju segmenti koleoptila bude 1% (25%; 160 µL). U svakom ogledu se paralelno rade po dve probe: dve probe kontrole (K), po dve od svakog rastvora 3-indolsirčetne kiseline koncentracija: 10.0, 1.0, 0.10, 0.01 i 0.001 mg/L (IAA, standardna kriva), kao i po 2 probe sa rastvorima kalijumovih soli naftenskih kiselina (NK) u koncentracijama: 10.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 i 0.01 mg/L. Bočice stoje u

termostatu na 26⁰C, u toku 22 h, nakon čega se meri njihova dužina. Porast dužine koleoptila se izražava u % (Izduživanje koleoptila [%]= (d_{kraj.}-d_{poč.}/d_{poč.}) x 100).

Tabela 4.10. Izduživanje koleoptila pšenice sorte *Venera* pod uticajem različitih koncentracija rastvora kalijumovih soli naftenskih kiselina (NK) i rastvora 3-indolsirćetne kiseline (IAA)

C [mg/L]	C [mol/L]	Izduživanje koleoptila [%]
3-Indolsirćetna kiselina		
10.0	5.7 x 10 ⁻⁵	104.1666667
1.0	5.7 x 10 ⁻⁶	89.28571429
0.1	5.7 x 10 ⁻⁷	79.76190476
0.01	5.7 x 10 ⁻⁸	67.85714286
0.001	5.7 x 10 ⁻⁹	58.33333333
Kalijumove soli naftenskih kiselina		
10.0	3.5 x 10 ⁻⁵	83.33333333
1.0	3.5 x 10 ⁻⁶	79.16666667
0.5	1.7 x 10 ⁻⁶	70.27777778
0.1	3.5 x 10 ⁻⁷	61.11111111
0.05	1.7 x 10 ⁻⁷	52.38095238
0.01	3.5 x 10 ⁻⁸	50.55555556
Kontrola		51.78571429

4.4.2. „Test inhibicije klijanja”

Seme slačice *Brassica nigra*, koje pri 25⁰C klija 50% približno u toku 18 h postavi se u *Petri* posude (ø 7 cm) sa filter-hartijom u podlozi. U posude se dodaje po 2.50 mL kalijumovih soli naftenskih kiselina koncentracija od 10.0-0.01mg/L, zatim 3-indolsirćetna kiselina u koncentracijama od 10.0-0.001 mg/L i kontrola koja se radi sa sveže prokuvanom destilovanom vodom. Svi ogledi se rade paralelno sa po dve probe. U svaku posudu se stavi po 50 semenki slačice. Klijanje se izvodi u mraku, u zaklopljenim posudama, pri temperaturi od 25⁰C. Prebrojavanjem se ustanovi kada isklija 50% (±2%) semena. U ovom testu vreme klijanja je 23 sata. Isklijalim se smatraju ona semena sa izdankom čija dužina iznosi polovinu dužine semena.

Tabela 4.11. Inhibicija klijanja semena slačice sorte *Brassica nigra* pod uticajem različitih koncentracija rastvora kalijumovih soli naftenskih kiselina (NK) i rastvora 3-indolsirćetne kiseline (IAA)

C [mg/L]	C [mol/L]	Inhibicija klijanja [%]
3-Indolsirćetna kiselina		
10.0	5.7×10^{-5}	94
1.0	5.7×10^{-6}	85
0.1	5.7×10^{-7}	75
0.01	5.7×10^{-8}	54
0.001	5.7×10^{-9}	47
Kalijumove soli naftenskih kiselina		
10.0	3.5×10^{-5}	48
1.0	3.5×10^{-6}	58
0.5	1.7×10^{-6}	62
0.1	3.5×10^{-7}	64
0.05	1.7×10^{-7}	72
0.01	3.5×10^{-8}	76

4.4.3. „Test prirasta mase hipokotila”

Priprema rastvora:

STANDARDNI MEDIJUM

- Koncentrovani rastvor kalijum-hlorida (200 mmol/L) se priprema rastvaranjem kalijum-hlorida (0.1491 g; 0.002 mola) u sveže prokuvanoj destilovanoj vodi (10.0 mL).
- Rastvor kalcijum-hlorida (10 mmol/L) priprema se rastvaranjem kalcijum-hlorida (0.1110 g; 0.001 mola) u sveže prokuvanoj destilovanoj vodi (100 mL).
- Rastvor hloramfenikola (1.0 g/L) priprema se rastvaranjem hloramfenikola (0.0100 g) takođe u sveže prokuvanoj destilovanoj vodi (10.0 mL).
- Rastvor pufera (400 g/L) se priprema rastvaranjem tris-(hidroksimetil)-aminometana (0.50 g) u sveže prokuvanoj destilovanoj vodi (1.25 mL).

Za pripremu standardnog medijuma odmeri se (po 5.00 mL) koncentrovanog rastvora kalijum-hlorida, kalcijum-hlorida i hloramfenikola, u odmerni sud od 500 mL. Sadržaj suda se dopuni prokuvanom destilovanom vodom i podesi pH na 7, dodatkom pufera.

3-INDOLSIRĆETNA KISELINA

Koncentrovani rastvor (500 mg/L) se priprema rastvaranjem 3-indolsirćetne kiseline (0.0125 g) u standardnom medijumu, uz dokapavanje rastvora kalijum-hidroksida (5.0 mmol/L) dok se sve ne rastvori, u odmernom sudu (25 mL). Rastvor se čuva na -18°C .

- Razblaživanjem standardnim medijumom, pripremljeni su rastvori 3-indolsirćetne kiseline koncentracija 10.0, 1.0, 0.10, 0.01 i 0.001 mg/L, za standardnu krivu.

KALIJUMOVE SOLI NAFTENSKIH KISELINA

Priprema rastvora kalijumovih soli naftenskih kiselina, koncentracije 1.0 g/L opisana je u 4.4.1.

- Razblaživanjem rastvora kalijumovih soli naftenskih kiselina standardnim medijumom pripremljeni su rastvori sledećih koncentracija: 1.0; 0.50, i 0.05 mg/L.

Opis metode:

Za test je korišćeno seme krastavaca sorte *Tajfun*. Klijanje se izvodi u mraku, na vlažnoj papirnoj podlozi, termostatorano na 25⁰C. Kada izdanci dostignu dužinu od 5 do 8 cm (nakon 4-5 dana), pri zelenoj svetlosti seku se odsecci hipokotila dužine 10 mm. Odsecci hipokotila se odmah stavljaju u vodu nakon čega se peru 30 minuta, pod mlazom tekuće vode, zatim se prosuše blagim upijanjem filter-hartijom i meri se masa u grupama od po 10 komada. Postupak ispiranja, sušenja i merenja hipokotila izvodi se pri fluorescentnoj svetlosti. Mase odmerenih odsečaka su reda veličine 250 mg. Odmereni odsecci se stavljaju u bočice koje sadrže rastvore: standardni medijum (kao kontrola), 3-indolsirćetna kiselina u standardnom medijumu i kalijumove soli naftenskih kiselina u standardnom medijumu, (po 3.00 mL). Aktivnost naftenskih kiselina ispitivana je sa tri koncentracije, a standardna kriva je rađena sa pet različitih koncentracija 3-indolsirćetne kiseline (Tabela 4.3.). Za svaki ispitivani rastvor postavljaju se 4 probe. Labavo zatvorene bočice se blago treskaju (70 pokreta u minuti) u vodenom kupatilu, temperiranom na 25⁰C. Nakon 6 h, odsecci se vade, osuše i meri se povećanje mase tretiranih odsečaka.

Tabela 4.12. Prirast mase hipokotila krastavaca sorte *Tajfun* pod uticajem različitih koncentracija rastvora kalijumovih soli naftenskih kiselina (NK) i rastvora 3-indolsirćetne kiseline (IAA)

C [mg/L]	C [mol/L]	Prosečni prirast mase [%]
3-Indolsirćetna kiselina		
10.0	5.7 x 10 ⁻⁵	19.04952685
1.0	5.7 x 10 ⁻⁶	18.24919902
0.1	5.7 x 10 ⁻⁷	14.09538904
0.01	5.7 x 10 ⁻⁸	7.932127956
0.001	5.7 x 10 ⁻⁹	4.591865806
Kalijumove soli naftenskih kiselina		
1.0	3.5 x 10 ⁻⁶	3.58088614
0.5	1.7 x 10 ⁻⁶	1.820514204
0.05	1.7 x 10 ⁻⁷	3.947631279
Kontrola		3.710143814

5. ZAKLJUČAK

U prvom delu ovog rada data je detaljna grupno-strukturna analiza naftnih kiselina izolovanih iz srednjih uljnih komercijalnih frakcija vojvođanske nafte „Velebit”. U izolovanoj smeši prirodnih naftnih kiselina analizom IR-, ^1H - i ^{13}C NMR- i ESI-MS spektara niske rezolucije, kao i iz rezultata elementarne mikroanalize kvalitativno i kvantitativno je određeno šest klasa karboksilnih kiselina opšte molekulske formule $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$. To su karboksilne kiseline u opsegu masa 240-466 sa 15-31 C atoma u molekulu koje su grupisane u pet cikloalkil Z-serija: monociklična- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$, 14.72%), biciklična- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-4}\text{O}_2$, 34.63%), triciklična- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-6}\text{O}_2$, 25.03%), tetraciklična- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-8}\text{O}_2$, 10.04%), pentaciklična klasa karboksilnih kiselina ($\text{C}_n\text{H}_{2n-10}\text{O}_2$, 4.99%) i jedna alkanska klasa kiselina sa alkil grupama otvorenog niza ($\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$, 10.57%).

Razdvajanjem na bazi različite kiselosti i njihove rastvorljivosti u vodi na određenim pH vrednostima u rasponu od pH 2-10 dobijeno je devet užih frakcija kiselina. Ekstrakcijom sa etrom u vodi nerastvornih kiselina u rasponu od po jedne pH jedinice dobijena je sledeća distribucija masa: 9.57% (pH 10), 12.69% (pH 9), 5.91% (pH 8), 4.85% (pH 7), 2.44% (pH 6), 11.71% (pH 5), 23.94% (pH 4), 16.76% (pH 3) i 10.12% (pH 2). Razdvajanjem kiselina na bazi njihove kiselosti oko 50% mase kiselina ekstrahovano je od pH 2-4, znači u grupi jačih kiselina. Masenom spektrometrijom niske rezolucije ESI-MS vidi se da su ekstrakcijom nerastvornih kiselina na pH 4 u smeši skoncentrisane kiseline sa više prstenova u alkilnom delu sa maksimumom na tricikličnim kiselinama (36.50%), dok su pojedinačno najzastupljenije tetraciklične strukture kiselina $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (4.43%) i $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (4.56%). Na pH 8 biciklične- i triciklične strukture su zastupljene ukupno sa 65.02% sa maksimalno zastupljenim kiselinama sa 20-26 C atoma u molekulu, a izdvajaju se $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_2$ (5.26%) biciklične- i $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_2$ (7.01%) triciklične strukture, a od tetracikličnih struktura kiselina izdvaja se $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_2$ (4.77%). Na pH 10 najzastupljenije izolovane kiseline su aciklične, odnosno masne kiseline zastupljene sa 25.28%, a najdominantnije su strukture $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_2$ (4.83%), dok su ostale klase kiselina ujednačene po svom masenom udelu u odnosu na sastav u ukupnoj polaznoj smeši kiselina. Kako je veliki deo ovog rada usmeren na ispitivanja biološke aktivnosti kiselina dobro poznavanje struktura svih klasa kiselina kao i poznavanje njihove kiselosti značajni su podaci za kreiranje daljih ispitivanja u toj oblasti. U ovom radu prvi put je uspostavljanjem korelacije između strukture i kiselosti kiselina izvršeno razdvajanje kiselina na uže frakcije. Pomoću ESI-MS analize utvrđeno je da su relativni odnosi klasa kiselina u smešama kiselina izdvojenih ekstrakcijom na pH 4; 8 i 10 različiti u odnosu na polaznu smešu ukupnih kiselina, što znači da se na ovaj način može očekivati strukturna asocijacija kiselina posebno izražene biološke aktivnosti.

Drugi deo rada obuhvata derivatizaciju izolovanih prirodnih naftnih kiselina. Sintetizovani su funkcionalni kiseonični metil-, etil-, *n*-butil-, *terc*-butil- i benzil-derivati naftnih kiselina kao i funkcionalni azotni derivati: amidi i anilidi naftnih kiselina.

Sinteze navedenih estara rađene su klasičnim postupcima i modifikovanom metodom esterifikacije u kiselu-katalizovanim uslovima upotrebom mikrotalasa kao ko-katalizatora, što je imalo za cilj skraćenje reakcionog vremena i poboljšanje ekoloških sintetskih uslova.

Metilnaftenati, estri koji se najlakše dobijaju sintetizovani su :

- metilovanjem nafnih kiselina sa diazometanom (95.47%)
- esterifikacijom nafnih kiselina sa metanolom u prisustvu sumporne kiseline kao katalizatora uz konvencionalno zagrevanje (97.04%), reakciono vreme od 4 sata
- esterifikacijom nafnih kiselina sa metanolom u prisustvu sumporne kiseline i uz ko-katalitičko dejstvo mikrotalasa snage 150 W, (63.46%), reakciono vreme 5 min., skraćenje reakcionog vremena je 48 puta
- esterifikacijom nafnih kiselina sa metanolom u prisustvu *p*-toluensulfonske kiseline uz ko-katalitičko dejstvo mikrotalasa snage 150 W, (52.64%), reakciono vreme 5 min., skraćenje reakcionog vremena je 48 puta

Modifikacijom sinteze metilnaftenata MT-zagrevanjem 48 puta je skraćeno vreme trajanja sinteze, prinosi ni promenom reakcionih parametara (vreme, snaga MT) nisu bitno promenjeni. Strukturnom analizom ESI-MS spektra metilnaftenata dobijenih metilovanjem nafnih kiselina utvrđen je sastav metilestara i upoređujući Z-klase kiselina, odnosno strukture početnih karboksilnih kiselina i metil-estara, odnos klasa je u dobroj podudarnosti. Najvećih odstupanja ima klasa Z= 2, odnosno monociklične strukture kiselina i analogni estri. Prinos estara u ovoj sintezi je 95.47%, pa se nameće zaključak da su se esterifikacijom selektivno najmanje esterifikovale monociklične kiseline.

Esterifikacija nafnih kiselina etil alkoholom rađena je u uslovima kisele katalize uz konvencionalno zagrevanje, vreme trajanja je 8 sati (91.76%), dok je modifikacijom metode MT-zagrevanjem (150 W) prinos 92.19%, vreme trajanja reakcije je 5 min., 96 puta je skraćeno reakciono vreme.

Esterifikacija nafnih kiselina *n*-butil alkoholom rađena je uz sumpornu kiselinu kao katalizator i uz konvencionalno zagrevanje u trajanju od 6 sati (94.24%), dok u uslovima MT-zagrevanja (150 W) u trajanju od 5 min., što predstavlja 72 puta kraće reakciono vreme uz zadovoljavajući prinos *n*-butilnaftenata (61.15%).

Sinteza *terc*-butilnaftenata rađena je prevođenjem nafnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa *terc*-butil alkoholom nastaju *terc*-butilnaftenati (80.17%). Modifikovanom metodom klasične reakcije esterifikacije nafnih kiselina *terc*-butil alkoholom katalizovanom sumpornom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (150 W) ostvaren je prinos od 85.49% a vreme trajanja reakcije je 5 minuta.

Sinteza benzilnaftenata rađena je prevođenjem nafnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa benzil alkoholom nastaju benzilnaftenati (84.43%), a modifikovanom metodom klasične kiselu-katalizovane esterifikacije nafnih kiselina benzil alkoholom u uslovima MT-zagrevanja (150 W) ostvaren je prinos od 85.49% uz reakciono vreme od 5 minuta.

Za reakciju esterifikacije nafnih kiselina *terc*-butil alkoholom i benzil alkoholom u uslovima MT-zagrevanja skraćenje reakcionog vremena nije moguće izračunati pošto klasična esterifikacija sa ova dva alkohola teče veoma dugo i sa niskim prinosima.

Strukturnom analizom ESI-MS spektra etilnaftenata dobijenih esterifikacijom naftnih kiselina uz kiselu katalizu sa sumpornom kiselinom utvrđen je grupno-strukturni sastav etilnaftenata. Upoređivanjem Z-klasa kiselina, odnosno struktura početnih karboksilnih kiselina i struktura etilestara, vidi se da je relativni odnos Z-klasa kiselina i estara približno isti za sve klase osim za pentaciklične kiseline koje su u smeši kiselina zastupljene sa 4.99% a u smeši estara ih ima u tragovima. Prinos estara u ovoj sintezi je 91.76%, pa se nameće zaključak da su se esterifikacijom selektivno najmanje esterifikovale pentaciklične kiseline.

Sinteza amida naftnih kiselina rađena je iz hlorida reakcijom sa amonijakom. Prinos čistih amida je 65.74%, a reakcija amidacije sa amonijakom trajala je 15 minuta.

Strukturnom analizom ESI-MS spektra amida naftnih kiselina utvrđen je grupno-strukturni sastav amida. Upoređivanjem Z-klasa kiselina, odnosno struktura početnih karboksilnih kiselina i struktura amida, vidi se da je promenjen relativni odnos Z-klasa samo u slučaju masnih i pentacikličnih struktura kiselina. Među strukturama amida naftenskih kiselina takođe su dominantne biciklične- i triciklične strukture, kao i u smeši slobodnih kiselina.

Sinteza anilida naftnih kiselina rađena je iz hlorida reakcijom sa anilinom. Prinos čistih anilida je 96.48%, a reakcija amidacije anilinom trajala je 30 minuta.

Strukturnom analizom ESI-MS spektra anilida naftnih kiselina utvrđen je grupno-strukturni sastav proizvoda, anilida. Upoređivanjem Z-klasa kiselina u smeši reaktanata, i anilida, vidi se da je promenjen relativni odnos Z-klasa kiselina samo u slučaju monocikličnih struktura kiselina. Među strukturama anilida naftenskih kiselina takođe su dominantne biciklične- i triciklične strukture kao i u smeši slobodnih kiselina.

U trećem delu ovog rada ispitivana je biološka aktivnost naftnih kiselina auksinskog i giberelinskog tipa, njihov uticaj na ožiljavanje reznica, ukorenjivanje bočnih grana i mikroizdanaka biljaka, aktivnost biljnih hormona, kao i na usvajanje metalnih jona kod biljaka.

Aktivnost naftenskih kiselina utvrđena je pomoću tri *in vitro* biološka testa. „*Koleoptil test*“, rađen je na dva supstrata, odnosno na semenu ozime pšenice novosadske sorte *Partizanka* i jare pšenice takođe novosadske sorte *Venera*. Referentna aktivnost u testu rađena je sa α -naftilsirćetnom- i 3-indolsirćetnom kiselinom. Kalijumove soli naftenskih kiselina koncentracije 10^{-7} mol/L (0.05 mg/L) u auksinskom testu sa ozimom pšenicom sorte *Partizanka* kao supstratom izazivaju najveću elongaciju koleoptila pšenice, čak za 20.01%. Utvrđeno je da naftenske kiseline u koncentraciji 1.0 mg/L pokazuju aktivnost kao IAA koncentracije 0.10 mg/L. U oba slučaja je dobijena afirmativna aktivnost, iako različita u apsolutnim vrednostima. U oba testa ustanovljen je približno isti odnos aktivnosti rastvora naftenskih kiselina i aktivnosti standardnih biljnih hormona. Takav relativni odnos aktivnosti naftenskih kiselina i auksinskih biljnih hormona svrstava naftenske kiseline u klasu aktivnih hormonskih supstanci, odnosno one se mogu uvrstiti u srednje aktivne analoge hormona rasta auksinskog tipa.

„*Test inhibicije klijanja*“ semena rađen je sa semenom crne slačice, *Brassica nigra*, a rezultati su upoređivani sa vrednostima inhibicije koju ostvaruje 3-indolsirćetna kiselina. Najveći uticaj naftenskih kiselina na inhibiciju klijanja postignut u rasponu koncentracija kiselina od 10^{-7} - 10^{-8} mol/L (0.05-0.01 mg/L). Testovi za šest užih frakcija dobijenih iz

smeše ukupnih kiselina razdvajanjem na bazi različite rastvorljivosti pri različitim pH vrednostima pokazuju istu aktivnost kao 3-indolsirćetna kiselina (0.5 mg/L), a da je frakcija izdvojena iz vodenog rastvora na pH 7 takođe aktivna ali u poređenju sa 3-indolsirćetnom kiselinom to je 10 puta niža aktivnost. Kako je iz masenih spektara niske rezolucije ovih užih frakcija kiselina utvrđeno te frakcije kiselina imaju strukturnih razlika pa je logično i da se pojavljuju razlike u biološkoj aktivnosti. Bitno je takođe naglasiti da su upravo navedene frakcije pokazale veći procenat inhibicije u odnosu na ukupne naftne kiseline u višim koncentracijama.

Hormonski auksinski test kojim se utvrđuje aktivnost naftnih kiselina je „*Hipokotil test*“. Ovaj test rađen je na semenu krastavaca sorte *Tajfun*, meren je prirast mase hipokotila krastavca pod uticajem različitih koncentracija naftenskih kiselina. Rezultati su upoređivani sa uticajem 3-indolsirćetne kiseline na porast mase hipokotila semena krastavca. Naftenske kiseline u ovom testu nisu pokazale povećanu aktivnost, znači da im je delovanje na nivou kontrole, odnosno za koncentraciju 0.5 mg/L (10^{-6} mol/L) naftenskih kiselina utvrđena je blaga redukcija mase hipokotila nakon tretiranja. Ovaj test nije dao afirmativne rezultate za auksinsku aktivnost naftenskih kiselina kao prethodna dva, ali je koristan pokazatelj da se naftenske kiseline ne mogu koristiti za stimulaciju klijanja svih biljnih vrsta.

Hormonska aktivnost giberelenskog tipa ispitivanih kalijumovih soli naftenskih kiselina utvrđena je „*Endosperm testom*“, u kojem je određivana aktivnost amilaze spektrofotometrijskim praćenjem povećanja koncentracije redukujućih šećera u endospermu semena tretiranog ječma i poređena sa aktivnošću rastvora giberelinske kiseline (GA_3). Rezultati ovih testova pokazuju da delovanjem vodenih rastvora užih frakcija naftenskih kiselina u koncentraciji 1.0 mg/L (3.5×10^{-6} mol/L) frakcija izolovana pri pH 8 ima aktivnost koja je približno u opsegu aktivnosti giberelina koncentracije 10^{-2} - 10^{-3} mg/L. ESI-MS analizom frakcije 8 vidi se dominacija tricikličnih kiselina sa 20-25 C aoma u molekulu i posebno C 24 kao dominantne tetraciklične kiseline (4.77%), a frakcije izolovane pri pH 4 i 2 po aktivnosti odgovaraju GA_3 koncentracije 10^{-4} mg/L, što sugerise da je frakcionacijom došlo do koncentrisanja aktivnih struktura u uže frakcije, razlike u aktivnosti mogu se pripisati strukturnim razlikama ispitivanih naftnih kiselina.

Testovi izvedeni na reznicama suncokreta pokazuju da rastvor natrijum-naftenata stimuliše formiranje adventivnih korenova a broj korenova po biljci je 40 puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor natrijum-naftenata u odnosu na one koje su bile potopljene u vodu. Najveći broj adventivnih korenova po biljci se formirao pri nižim koncentracijama natrijum-naftenata, tj. od 10^{-6} do 10^{-8} mol/L a razlike u broju korenova po biljci u tom opsegu koncentracija nisu bile signifikantne. Pri najvećoj koncentraciji natrijum-naftenata (10^{-3} mol/L) broj formiranih adventivnih korenova je bio znatno niži u poređenju sa brojem formiranim pri nižim koncentracijama, u proseku za 60%.

Ožiljavanje drvenastih biljaka rađeno je na reznicama bele topole (*Populus alba*) i reznicama američke crne topole (*Populus deltoides*). Rastvor natrijum-naftenata koncentracije 10^{-7} mol/L značajno pospešuje formiranje adventivnih korenova kod reznica crne topole. Primena rastvora natrijum-naftenata koncentracije 10^{-4} mol/L je pokazala negativan efekat a pozitivan efekat dobijen sa nižom koncentracijom natrijum-naftenata. Natrijum-naftenati povećavaju ukupne dužine korenčića za 23% kod reznica bele topole a za 80% kod crne topole a isto tako povećan je i ukupan broj korenčića za 40% kod bele topole a kod crne za skoro 100%. Od svih primenjenih

tretmana najbolji efekat je postignut sa jednodnevnom potapanjem reznica u rastvor preparata sa kasnijim čuvanjem u vodi. Uočen je i jasan inhibitorni efekat na rast korenčića i izbojka u vodenom medijumu sa 10^{-4} mol/L naftenskih kiselina, dok za koncentraciju 10^{-7} mol/L značajna razlika od kontrole nije utvrđena. Tretman reznica koncentracijom 10^{-4} mol/L od jednog časa, nije uticao na parametre ožiljavanja, dok je tretman od 24 časa doprineo većem broju korenčića na donjih 5 cm reznice, kao i ukupnog broja korenčića nego kod kontrole. Vodeni rastvor naftenskih kiselina u koncentraciji od 10^{-4} mol/L ostvario je stimulatívni efekat na broj korenčića kod crne topole, ali inhibitoran kod bele topole. Pošto problemi u ožiljavanju ometaju rentabilnost rasadničke proizvodnje, kao i postizanje optimalne gustine zasada, ovi podaci ukazuju da bi se efikasnost zasada mogla povećati što znači i da bi se ovi klonovi mogli koristiti za proizvodnju biomase.

U *in vitro* testu ukorenjivanja mikroizdanaka kod hrizantema ispitivan je uticaj različitih koncentracija ukupnih natrijum-naftenata kao i njihovih užih frakcija razdvojenih na bazi različite rastvorljivosti na različitim pH vrednostima. Rezultati testa su upoređivani sa efektom 3-indolbuterne kiseline ($10 \mu\text{mol/L}$ i više). Najveći broj korenova dobijen je nakon tretmana sa rastvorom koji sadrži $10 \mu\text{mol/L}$ ukupnih naftenata i tretmanom sa $50 \mu\text{mol/L}$ frakcijom kiselina izolovanom pri pH 7. Oba rezultata su na nivou aktivnosti 3-indolbuterne kiseline koncentracije $10 \mu\text{mol/L}$ što znači da u ovom slučaju frakcionacija nije neophodna.

Efekti natrijum-naftenata na ukorenjivanje praćeni su merenjem nivoa totalnih peroksidaza i amilaze, kao i sadržaja redukujućih šećera i ukupnih proteina u bazalnim delovima reznica bagrema (*Rozaszin-AC*). Nakon 1; 3 i 6 dana reznice su uzete za biohemijske analize. U svakom slučaju, aktivnosti IAA-oksidade i amilaze su se povećavale do trećeg dana, a zatim su se smanjivale. Efekat je bio jače izražen posle tročasovnog tretmana sa natrijum-naftenatima u poređenju sa šestočasovnim tretmanom i kontrolom. Sadržaj rastvornih proteina je bio povećan jedan dan posle tretmana, smanjen trećeg i ponovo povećan šestog dana, osim za šestočasovni tretman natrijum-naftenatima, kada je efekat bio sasvim suprotan.

Test uticaja naftnih kiselina na nivo kadmijuma u biljkama pokazuje fiziološko delovanje naftnih kiselina na snižavanje nivoa teških metala u biljci, u ovom slučaju kadmijuma. Određivanje sadržaja Cd vršeno je u pojedinim frakcijama interćelijskog prostora kao i unutar ćelija korena, stabla i listova biljaka soje. Naftenske kiseline (10^{-7} mol/L) smanjuju sadržaj ukupnog kadmijuma kako u korenu tako i u stablu i listovima u proseku za oko 40%. Sadržaj unutarćelijskog kadmijuma pri tretmanu sa naftenskim kiselinama kod korena i listova je smanjen za približno isti procenat kao i sadržaj ukupnog kadmijuma u proseku (44% kod korena i 34% kod listova) u odnosu na sadržaj kadmijuma kod biljaka tretiranih samo kadmijumom, dok se kod stabla praktično nije menjao. Sadržaj međućelijskog kadmijuma kod korena se praktično nije menjao dok je kod stabla i listova došlo do njegovog značajnog smanjenja (77% kod stabla, i 59% kod listova) pri tretmanu sa natrijum-naftenatima u odnosu biljke tretirane samo kadmijumom. Istovremeno, ispitan je i efekat tretmana kadmijumom na aktivnost enzima nitrat-reduktaze jednog od ključnih enzima u metabolizmu azota kod biljaka, pri čemu je ustanovljeno da prisustvo kadmijuma u hranljivom medijumu negativno utiče na aktivnost nitrat-reduktaze jer dovodi smanjenja aktivnosti ovog enzima za 36% u odnosu na kontrolu. Natrijum-naftenati u hranljivom medijumu sprečavaju negativni efekat kadmijuma tako da aktivnost nitrat-reduktaze sada iznosi 93.5% od aktivnosti ovog enzima kod kontrolnih biljaka. Takođe je evidentno da prisustvo kadmijuma u

hranljivom medijumu ima negativan efekat na sadržaj hlorofila *a* i *b* kao i karotenoida-njihovi sadržaji su smanjeni za 32%, 36% i 24.6%, respektivno, u odnosu na dobijene vrednosti kod kontrolnih biljaka. Međutim, prisustvo natrijum-naftenata u hranljivom medijumu sprečava negativni uticaj kadmijuma tako da sadržaj hlorofila *a* sada iznosi 91.5% a sadržaj karotenoida sada iznosi 96.9% od njegovog sadržaja kod kontrolnih biljaka. Prisustvo natrijum-naftenata u hranljivom medijumu umanjuje negativni uticaj kadmijuma i na sadržaj hlorofila *b*, ali znatno manje nego u slučaju hlorofila *a*, tako da sadržaj hlorofila *b* sada iznosi 74.5% od sadržaja ovog pigmenta kod kontrolnih biljaka. Ovo znači da tretman natrijum-naftenatima ne sprečava negativan uticaj kadmijuma ali ga ipak ublažava jer je smanjenje sadržaja hlorofila *b* samo za 10% manje nego bez tretmana. Nameće se zaključak da tretman niskim koncentracijama natrijum-naftenata ne sprečava ali može da umani nepovoljno dejstvo suviška kadmijuma na neke fiziološko-biohemijske procese kao i njegovu toksičnost.

Tretman biljaka niskim koncentracijama natrijum-naftenata utiče na akumulaciju nekih esencijalnih elemenata kod mladih biljaka soje. Tretmanom sa natrijum-naftenatima (10^{-7} mol/L), koji u većim koncentracijama spadaju u grupu značajnih organskih kontaminata, utvrđeno je značajno povećanje koncentracije Mn, Fe, Zn i Ni ali smanjuje sadržaje K i Na u korenima mladih biljaka soje. S druge strane, u stabljikama i listovima primećeno je samo povećanje Fe i Mn. U korenima, sadržaj Mn je bio četiri puta veći a sadržaji Fe, Zn i Ni su povećani 17%, 60% i 68%, respektivno. Koncentracije K i Na u korenu smanjene su za 41% i 66%, u poređenju s kontrolom. Odvojeno od uticaja na preuzimanje ispitivanih pozitivnih jona, tretman sa natrijum-naftenatima može takođe stimulisati i njihovu translokaciju koja je evidentna iz povećanja sadržaja Mn u listovima soje.

Ispitivanja na celeru i mrkvi su potvrdila da uticaj naftenata na mineralnu ishranu zavisi od primenjenog elementa i da je način preuzimanja određenih jona različit, što ima za posledicu ili povećanje ili smanjenje sadržaja pojedinih jona u nekim delovima biljaka. Mlade biljke celera i mrkve, gajene su u hranljivom medijumu i tretirane su natrijumovim solima naftenskih kiselina (10^{-7} mol/L) folijarno ili prisustvom u hranljivom medijumu. Jedino je tretman putem prisustva naftenata u hranljivom medijumu smanjio svežu masu korena i nadzemnog dela oko 20% kod obe biljke. Oba tretmana uticala su na sadržaj Fe, Cu, Mn, Mg i Ca kod biljaka celera i Fe, Mn, Zn i Na kod biljaka mrkve. Kod biljaka celera došlo je do smanjenja sadržaja navedenih nutrienata dok je u korenu biljaka mrkve došlo do povećanja sadržaja Fe za 45%, Mn za 70% i Zn za 37%. Kod ovih biljaka prisustvo naftenata u hranljivom medijumu dovelo je do smanjenja mase korenova i nadzemnih delova, što je potpuno suprotno od rezultata dobijenih kod biljaka soje. Folijarnim tretmanom je značajno povećana masa nadzemnog dela samo kod celera.

6. SUMMARY

The first part of this work presents a detailed group and structural analysis of naphthenic acids isolated from middle commercial fractions of Vojvodina oil „Velebit”. In the isolated mixture of natural naphthenic acids by the analysis of IR-, ^1H - and ^{13}C NMR- and ESI-MS low resolution spectrums, as well as on the basis of the results of the elementary microanalysis, six classes of carboxylic acids of the general molecular formula $\text{C}_n\text{H}_{2n-z}\text{O}_2$ were determined qualitatively and quantitatively. These are carboxylic acids with mass range of 240-466 with 15-31 C atoms in molecule which are grouped in five cycloalkyl Z-series: monocyclic- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}_2$, 14.72%), bicyclic- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-4}\text{O}_2$, 34.63%), tricyclic- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-6}\text{O}_2$, 25.03%), tetracyclic- ($\text{C}_n\text{H}_{2n-8}\text{O}_2$, 10.04%), pentacyclic class of carboxylic acids ($\text{C}_n\text{H}_{2n-10}\text{O}_2$, 4.99%) and one alyphatic class of acids with open chain alkyl groups ($\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_2$, 10.57%).

By fractioning on the basis of different levels of acidity and their solubility in water with pH values ranging from pH 2-10 nine subfractions of acids were obtained. By extraction with ether in water undissolved acids in the range of one pH unit the following distribution of mass was performed: 9.57% (pH 10), 12.69% (pH 9), 5.91% (pH 8), 4.85% (pH 7), 2.44% (pH 6), 11.71% (pH 5), 23.94% (pH 4), 16.76% (pH 3) and 10.12% (pH 2). By fractioning acids on the basis of their acidity about 50% of acid mass was extracted at pH 2-4, i.e., in the group of stronger acids. Low resolution mass spectrometry ESI-MS shows that in the extraction of insoluble acids at pH 4 acids with more rings in the alkyl section were concentrated in the mixture with maximum at tricyclic acids (36.50%), while individually tetracyclic acid structures $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (4.43%) and $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (4.56%) were most prominent. At pH 8 bicyclic- and tricyclic structures are represented together by 65.02% with acids with 20-26 C atoms in molecule being represented the most, and $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_2$ (5.26%) bicyclic- and $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_2$ (7.01%) tricyclic structures stand out, while with tertacyclic acid structures $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_2$ (4.77%) stands out. At pH 10 most represented isolated acids are acyclic, i.e., fatty acids which are represented by 25.28%, with the most dominant $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_2$ structures (4.83%), while the other classes of acids are well balanced in their mass share in relation to the composition of the overall initial acid mixture. Since a large part of this work is directed towards biological activity of acids, a sound knowledge of the structure of all classes of acids and their acidity is a significant basis for further research in this area. In this work a division of acids into narrow fractions is performed for the first time by establishing a correlation between the structure and the acidity of acids. Using ESI MS analysis it was determined that the relative ratios of acid classes in the mixtures of acids extracted at pH 4, 8 and 10 are different in comparison to the initial mixture of all acids, which suggests that this can lead us to expect a structural association of acids of prominent biological activity.

The second part of this work deals with derivatization of the isolated natural naphthenic acids. Functional oxygen methyl-, ethyl-, *n*-butyl-, *tert*-butyl and benzyl-derivatives of naphthenic acids as well as functional nitrogen derivatives: amides and anilides of naphthenic acids were synthesized.

The syntheses of the above mentioned esters were performed by conventional methods and by a modified method of esterification in acid-catalyzed conditions using microwaves as a co-catalyst with the aim of shortening the reaction time and improving the ecological synthetic conditions.

Methyl naphthenates, esters which are most easily obtained are synthesized by:

- methylation of naphthenic acids with diazomethane (95.47%)
- esterification of naphthenic acids with methanol in the presence of sulfuric acid as a catalyst with conventional heating (97.04%), reaction time 4 hours.
- esterification of naphthenic acids with methanol in the presence of sulfuric acid and with co-catalytic action of 150 W microwave irradiation (63.46%), reaction time 5 minutes, reaction time is reduced 48 times
- esterification of naphthenic acids with methanol in the presence of *p*-toluenesulfonic acid with co-catalytic action of 150 W microwave irradiation (52.64%), reaction time 5 minutes, reaction time is reduced 48 times

By modification of methyl naphthenates synthesis using MT-heating the time period for synthesis is reduced 48 times and the yield does not significantly change even after the reaction parameters (time, MT power) have been altered. Using structural analysis of ESI-MS spectrum of methyl naphthenates obtained through methylation of naphthenic acids it was established that the composition of methyl esters and the comparison of Z-classes of acids i.e., the structures of initial carboxylic acids and methyl esters the class ratio show great compatibility. The greatest deviation is shown with class Z= 2, that is monocyclic acid structure and the corresponding esters. The esters yield in this synthesis is 95.47% which leads to the conclusion that in the process of esterification selectively the least esterified were monocyclic acids.

The esterification of naphthenic acids with ethyl alcohol done under the conditions of acid catalysis with conventional heating lasted 8 hours (91.76%), while with the modified method MT-heating (150 W) the yield was 92.19% and the duration of the reaction was 5 min., reaction time is reduced 96 times.

The esterification of naphthenic acids with *n*-butyl alcohol was performed using sulphuric acid as a catalyst and with conventional heating in the duration of 6 hours (94.24%), while under MT-heating conditions (150 W) the duration was 5 min., which is 72 times shorter reaction time with the satisfactory yield of *n*-butyl naphthenates (61.15%).

The synthesis of *tert*-butyl naphthenates was performed by conversion of naphthenic acids into chlorides, followed by the reaction with *tert*-butyl alcohol which resulted in *tert*-butyl naphthenates (80.17%). By the modified method of conventional reaction of esterification of naphthenic acids using *tert*-butyl alcohol catalysed with sulphuric acid in MT-heating conditions (150 W) the yield was 85.49% and reaction time was 5 minutes.

The synthesis of benzyl naphthenates was performed by conversion of naphthenic acids into chlorides, followed by a reaction with benzyl alcohol which produces benzyl naphthenates (84.43%), whereas the modified method of conventional acid-catalysed esterification of naphthenic acids using benzyl alcohol under MT-heating (150 W) conditions the yield was 85.49% with the reaction time of 5 minutes.

With the reaction of esterification of naphthenic acids with *tert*-butyl- and benzyl alcohol under MT-heating conditions it was not possible to calculate the reduction of reaction

time since conventional esterification with these two alcohols lasts very long and with low yields.

The structural analysis of ESI-MS spectrum of ethyl naphthenates obtained by esterification of naphthenic acids with acid catalysis with sulphuric acid establishes the group-structural composition of ethyl naphthenates. By comparing Z-class of acids, i.e., the structure of initial carboxylic acids and the structure of ethyl esters it can be perceived that the relative ratio of Z-class of acids and esters is approximately the same for all classes except for pentacyclic acids which are represented in the acid mixture by 4.99% and in the mixture of esters are present in traces. The yield of esters in this synthesis is 91.76%, which leads to the conclusion that in the esterification selectively the least esterified were pentacyclic acids.

The synthesis of naphthenic acid amides was done from chlorides by reaction with ammonia. The yield of pure amides was 65.74%, and the reaction of amidation with ammonia lasted for 15 minutes. The structural analysis of ESI-MS spectrum of naphthenic acid amides determined the group-structural composition of amides. The comparison of Z-class of acids, that is the structure of initial carboxylic acids and the structure of amides indicates that the relative ratio of Z-classes has changed only in the case of fatty and pentacyclic structures of acids. With the structures of amides of naphthenic acids bicyclic- and tricyclic structures are also dominant, as in the mixture of free acids.

The synthesis of naphthenic acid anilides were performed from chloride by reacting with aniline. The yield of pure anilides was 96.48%, and the reaction of amidation lasted for 30 minutes.

The structural analysis of ESI-MS spectrum of naphthenic acid anilides determined the group-structural composition of anilide products. The comparison of Z-class of acids in the mixture of reactants and anilids shows that the relative ratio of Z-classes has changed only in the case of monocyclic structures of acids. With the structures of anilides of naphthenic acids bicyclic- and tricyclic structures are also dominant, as in the mixture of free acids.

The third part of this work tests the biological activity of naphthenic acids of auxine and gibberellinic type, their influence on the rooting of cuttings, lateral branches and microshoots of plants, on the activity of plant hormones as well as on the metal ions uptake by plants.

The activity of naphthenic acids was determined using three *in vitro* biological tests. „Koleoptil test”, was done on two substrates, namely the seed of winter wheat of the *Partizanka* sort and the spring wheat of the *Venera* sort. The referential activity in the test was performed with α -naphthylacetic- and 3-indolacetic acid. Potassium salts of the naphthenic acids in concentration 10^{-7} mol/L (0.05 mg/L) in auxinic test with the winter wheat of *Partizanka* sort substrate cause the greatest elongation of coleoptile, as much as 20.01%. It was determined that naphthenic acids in concentration of 1.0 mg/L show the activity of IAA in concentration 0.10 mg/L. Affirmative activity was obtained in both cases, although the absolute values were different. Both tests showed approximately the same ratio of activity of naphthenic acid solutions and standard plant hormones. That kind of relative ratio of naphthenic acids and auxinic plant hormones classifies

naphthenic acids as active hormone substances, that is they can be classified as middle active auxine type growth hormone analogues.

„Germination Inhibition Test” of the seed was performed using *Brassica nigra* seed and the results are compared with the inhibition values achieved with 3-indolacetic acid. The greatest influence of naphthenic acids to germination inhibition was achieved in the acid concentration ranging from 10^{-7} - 10^{-8} mol/L (0.05-0.01 mg/L). The tests for six narrow fractions obtained from the overall mixture of acids through fractioning on the basis of different solubility at different pH values show the same activity as 3-indolacetic acid (0.5 mg/L), with the fraction isolated from the aqueous solution at pH 7 also active but in comparison to 3-indolacetic acid this activity was 10 times lower. As it was determined from the low resolution mass spectrum of these narrow fractions that these acid fractions have structural differences, it was therefore logical that there are differences in their biological activities. It is also important to stress that the afore mentioned fractions showed a higher percentage of inhibition in relation to the overall petroleum acids in higher concentrations.

Hormone auxine test which is used to determine the activity of petroleum acids is „Hypocotyl Test”. This test was performed on the seed of cucumber of *Tajfun* sort measuring the hypocotyl mass increase in the cucumber exposed to various concentrations of naphthenic acids. The results were compared to the influence of 3-indolacetic acid on the cucumber seed hypocotyl mass increase. In this test naphthenic acids did not show an increased activity, which means that their action is at the control level, i.e., for the concentration of 0.5 mg/L (10^{-6} mol/L) naphthenic acids a slight reduction of hypocotyl mass was noticed after the treatment. This test did not indicate affirmative results for the auxinic activity of naphthenic acids as did the previous two tests, but served as a useful indicator of the fact that naphthenic acids cannot be used as germination stimulators with all plant types.

Hormone activity of gibberellinic type of the potassium salts of naphthenic acids was determined using “Endosperm Test” where amylase activity was determined by spectrophotometric measuring of the increase of the concentration of reducing sugars in endosperm in the treated barley seed which was then compared to the activity of the gibberellic acid solution (GA_3). The results of these tests indicate that the activity of aqueous solutions of narrow fractions of naphthenic acids in the concentration of 1.0 mg/L (3.5×10^{-6} mol/L) the fraction isolated at pH 8 has the activity which is approximately within the range of activities of gibberellin of the concentration of 10^{-2} - 10^{-3} mg/L. ESI-MS analysis of fraction 8 shows the domination of tricyclic acids with 20-25 C atom in the molecule and especially C 24 as a dominant tetracyclic acid (4.77%), while the fractions isolated at pH 4 and 2 are in its activity equivalent to GA_3 of the concentration 10^{-4} mg/L, which suggests that fractionation has led to the concentration of active structures into narrow fractions and the differences in activity can be explained by structural differences of the petroleum acids being tested.

Tests which were carried out on sunflower cuttings suggest that the solution of sodium naphthenates stimulated the formation of adventitious roots and the numbers of roots per plant were 40 times higher with those plants compared with plants which were immersed in water. The largest number of adventitious roots per plants was formed at lower concentrations of sodium naphthenates, i.e., from 10^{-6} - 10^{-8} mol/L, the differences in the number of roots per plant in this concentration range being nonsignificant. At the highest concentration of sodium naphthenates (10^{-3} mol/L), the numbers of adventitious

roots was significantly lower compared with those formed at lower concentrations, on the average by 60%.

Rooting of hardwood plants was investigated on the cuttings of white poplar (*Populus alba*) and black poplar (*Populus deltoides*). The solution of sodium naphthenates in the concentration 10^{-7} mol/L significantly stimulated the formation of adventitious roots in the cuttings of black poplar. The application of the solution of sodium naphthenates in the concentration of 10^{-4} mol/L showed negative effect, while positive effect was detected with lower concentration of sodium naphthenates. Sodium naphthenates increased the lengths of white poplar roots by 23%, and the lengths of black poplar by 80%, as well as the total number of roots for 40% and almost 100%, respectively. From all the applied treatments the most successful was one-day soaking of cuttings in the solution of preparation with subsequent holding in water. At the same time, the distinct inhibitory effect on the root and shoot growth in water culture was detected in the concentration of naphthenic acids of 10^{-4} mol/L, while at the concentration of 10^{-7} mol/L the significant difference from the control was not detected. The one hour treatment with 10^{-4} mol/L did not significantly influence the rooting parameters, while the 24 hours treatment raised the number of roots on undermost 5 cm of the cutting, as well as the total number of roots comparing to the control. Water solution of naphthenic acids in the concentration 10^{-4} mol/L, achieved a stimulatory effect on the number of black poplar roots, but an inhibitory effect with white poplar. Because the problems in rooting disrupt profitability of nursery production, as well as attaining the optimal density of planted, these results could be used in regular practice.

The effects of different concentrations of total naphthenic acids (in the form of sodium salt) as well as fractions of these complex mixture of acids obtained by fractionation based on different solubility at different pH values on rooting of *in vitro* grown chrysanthemum shoots were examined. The results of test were compared with effect 3-indolbutyric acid (10 μ mol/L and higher). The highest number of roots was achieved after the treatment with solution containing 10 μ mol/L of total naphthenates, as well as after the treatment with fraction of naphthenic acids which was isolated at pH 7 in concentration of 50 μ mol/L. Both results are on the level of activity of 3-indolbutyric acid in concentration of 10 μ mol/L which suggests that in this case fractionation is not necessary.

The effects of sodium naphthenates on rooting were investigated by measuring the level of total peroxidases and amylase, along with the contents of reducing sugars and total proteins in basal parts of cuttings of black locust (*Rozaszin-AC*). After 1; 3 and 6 days cuttings were taken for biochemical analysis. In all cases, the activities of IAA-oxidase and amylase increased to the third day and showed a decrease afterwards. The effect was more pronounced after the three-hour treatment with sodium naphthenates, compared to the six-hour treatment and control. The content of soluble proteins increased one day after the treatment and decreased to the third and again increased to the sixth day, an exception being the six-hour treatment with sodium naphthenate, when the effect was completely opposite.

The test of naphthenic acids influence on the level of cadmium in plants showed physiological activity of naphthenic acids on the decrease of the level of heavy metals, in this case cadmium, in the plant. The contents of Cd were determined in the intercellular space and inside the cells of soybean root, stem and leaves. Naphthenic acids (10^{-7} mol/L) reduced in average by 40 % the content of total and intracellular Cd in

root, stem and leaves. The content of intracellular Cd in the root and leaves in the presence of naphthenate was lowered on average by about the same percent as the total Cd (44% in root and 34% in leaves) compared with Cd content treated only with Cd, whereas Cd content in stem remained practically unchanged. Also, content of intercellular Cd in root remained practically unchanged; whereas in stem and leaves its content was significantly lower (by 77% in stem and by 59% in leaves) in the treatment with sodium naphthenate compared with the contents in plants treated with Cd in the absence of naphthenate. The results showed that presence of Cd in the nutrient medium had a negative effect on the activity of nitrate reductase as it led to its decrease by 36% compared to control. However, the presence of sodium naphthenates in the medium alleviated this adverse effect, so that the activity of nitrate reductase in the presence of sodium naphthenate and Cd was 93.5% of the activity measured in control plants. It is also evident that the presence of Cd in the nutrient solution had a negative effect on contents of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids-their contents decreased by 32%, 36% and 24.6%, respectively, compared to the values measured for control. However, the presence of sodium naphthenate in the nutrient medium alleviated the adverse effect of Cd, so that the content of chlorophyll *a* and carotenoids in plants subjected to the combined treatment with Cd and sodium naphthenates amounted to 91.5 % and 96.9 % of their respective contents in control plants. As for chlorophyll *b* the presence of sodium naphthenate in the nutrient medium also lowered the effect of Cd but to a much smaller extent than in the case of chlorophyll *a*-the content of chlorophyll *b* was 74.5 % of that measured for control plants. This means that treatment with sodium naphthenate produced only a weak alleviation effect as the content of chlorophyll *b* was only by 10 % higher than in the absence of naphthenate. It can be supposed that naphthenic acids applied in smaller concentrations can lower the content of Cd in plants grown in the presence of its elevated concentrations and thus reduce its toxicity.

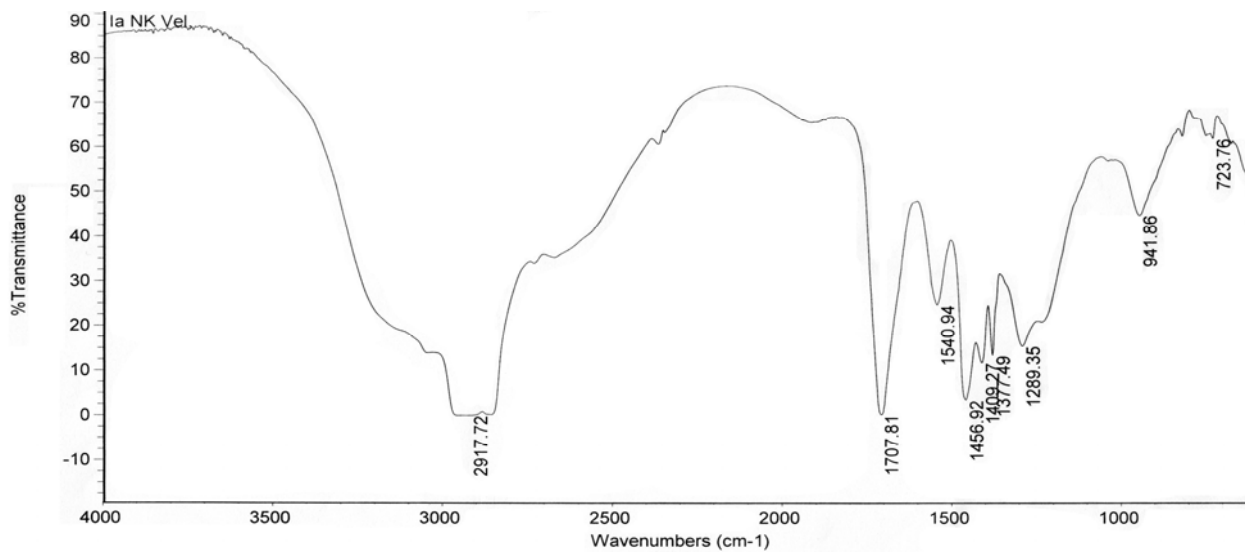
Treatment of soybean plants with low concentrations of sodium naphthenate influenced the accumulation of some essential elements by the young plants. In the presence of sodium naphthenates (10^{-7} mol/L), which in the higher concentrations belong to the group of significant organic contaminants, significantly increased contents of Mn, Fe, Zn and Ni, were established, while the contents of K and Na contents in roots of young soybean plants decreased. On the other hand, only the increases of Fe and Mn in the stems and leaves were observed. In the roots, the content of Mn increased four times, whereas the contents of Fe, Zn and Ni increased by 17%, 60% and 68%, respectively. The concentrations of K and Na in the roots decreased by 41% and 66%, all compared to the control. Apart from influencing uptake of the investigated elements, the treatment with sodium naphthenate may also stimulate their translocation, which is evident from the increased Mn content in soybean leaves.

Investigations on celery and carrot confirmed that the influence of naphthenates on mineral nutrition depends on the applied element and that the way of uptake of certain ions is different, which results in either increase or decrease of the contents of some ions in certain parts of plants. Young plants of celery and carrot, were grown in the nutrient medium and treated with sodium salts of naphthenic acids (10^{-7} mol/L) over the leaves or with its presence in the nutrient medium. Only the treatment based on the presence of naphthenates in the nutrient medium resulted in the decrease of the fresh mass of root and aboveground part by about 20% for both plants. Both treatments had influence on the content of Fe, Cu, Mn, Mg and Ca in the plants of celery and Fe, Mn, Zn and Na in the plants of carrots. In the plants of celery the content of the mentioned

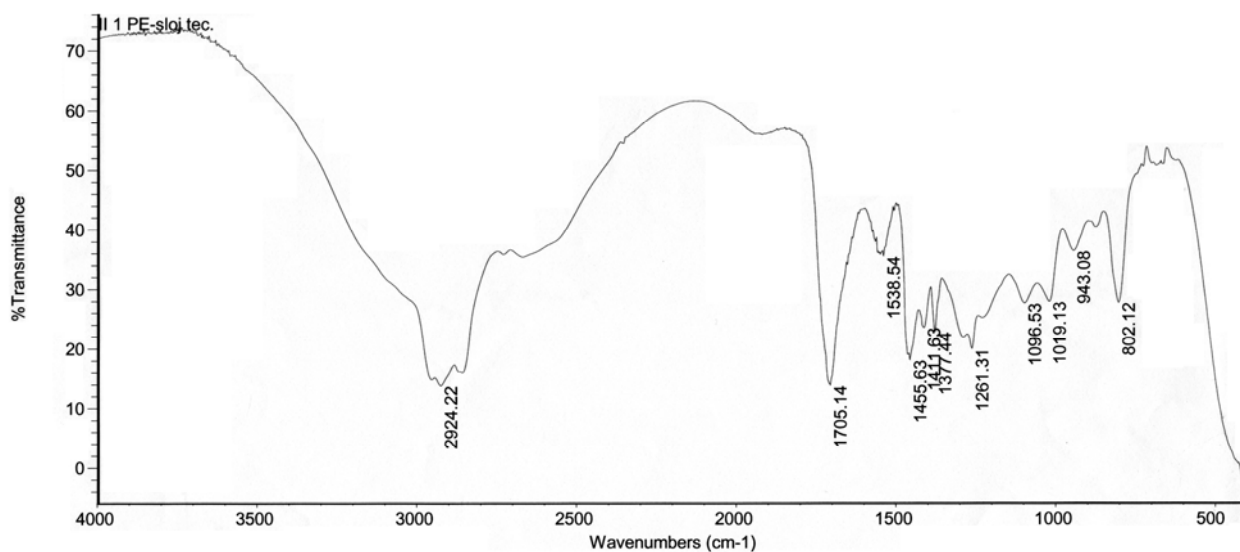
nutrients was decreased, while in the root of plants of carrot the content was increased, Fe by 45%, Mn by 70% and Zn by 37%. With these plants the presence of naphthenates in the nutrient medium caused the reducing roots and aboveground parts, which is completely opposite from the results obtained with soybean plants. The treatment by leaves significantly increased the mass of aboveground part only with celery.

7. PRILOG

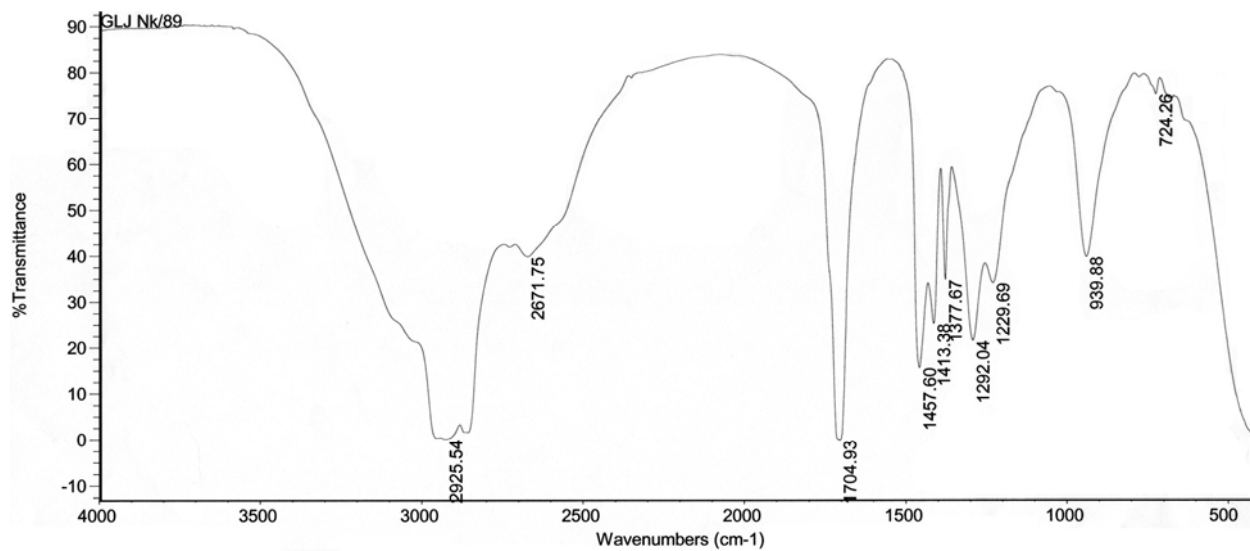
IR, ¹H NMR, ¹³C NMR i ESI HPLC-MS Spektri



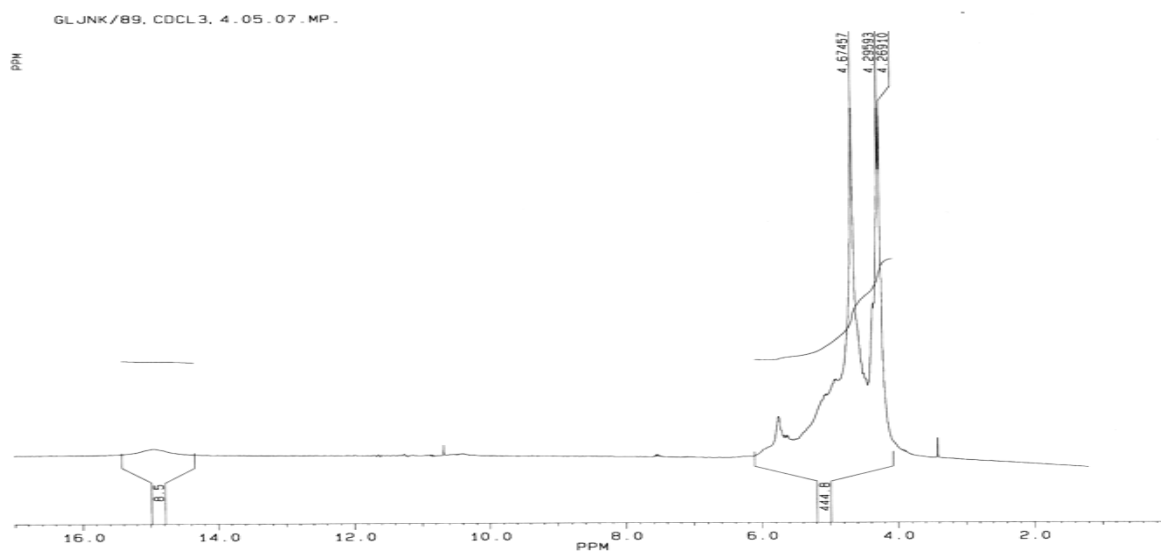
Slika 7.1. IR Spektar sirovih naftenskih kiselina, izolovanih adsorpcijom na aluminijumoksidu

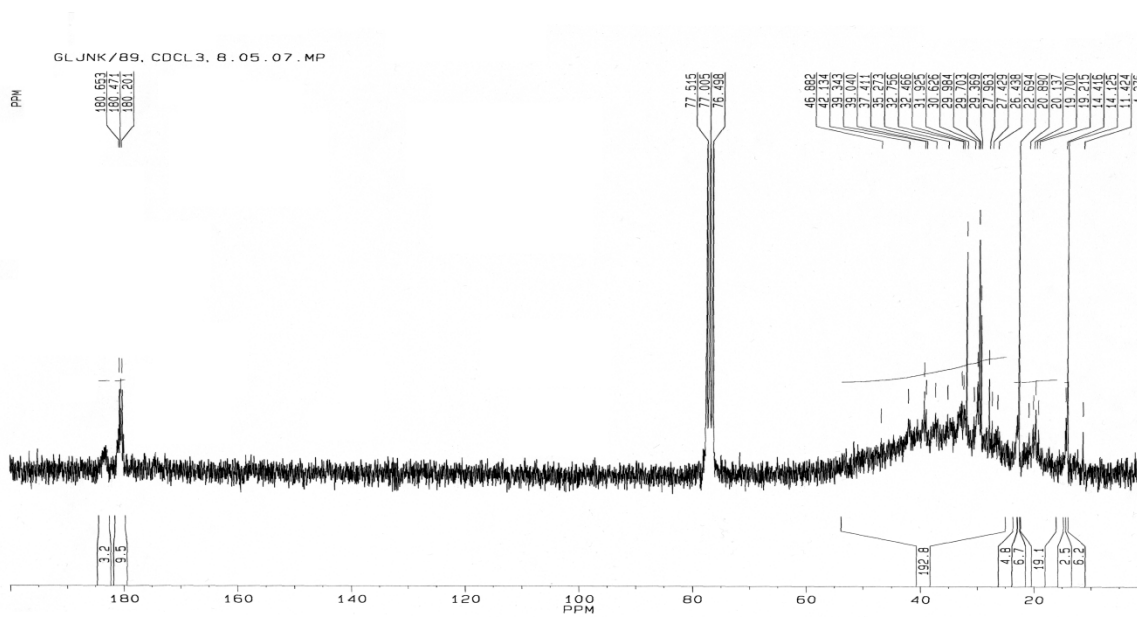
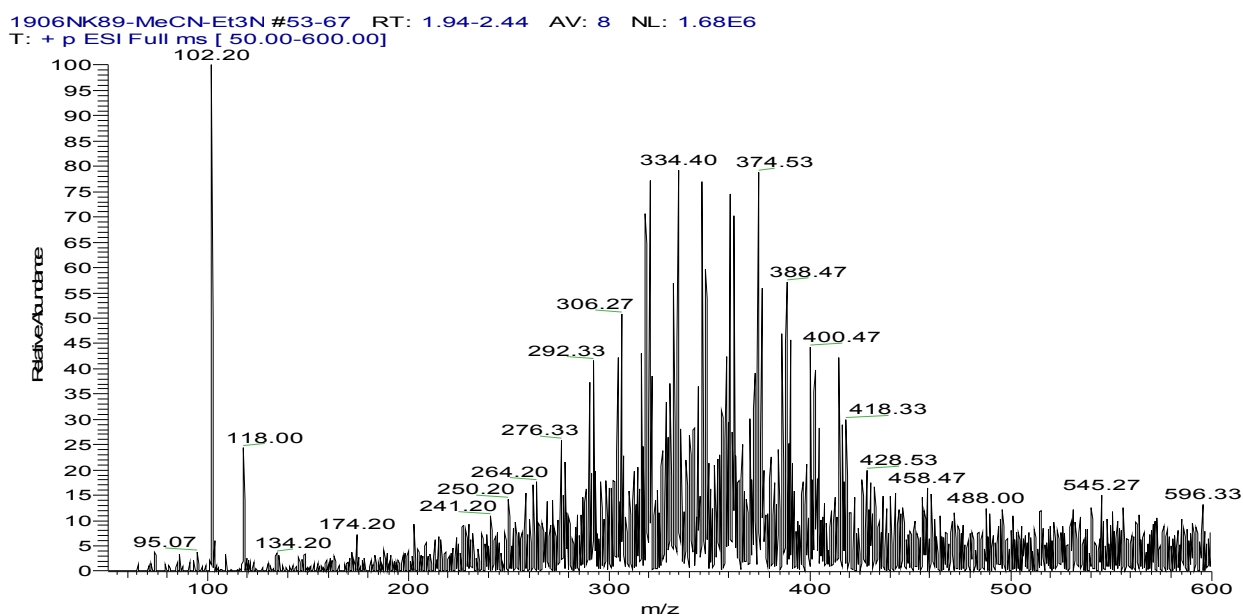


Slika 7.2. IR Spektar sirovih naftenskih kiselina, izolovanih alkalnom ekstrakcijom sa amonijakom

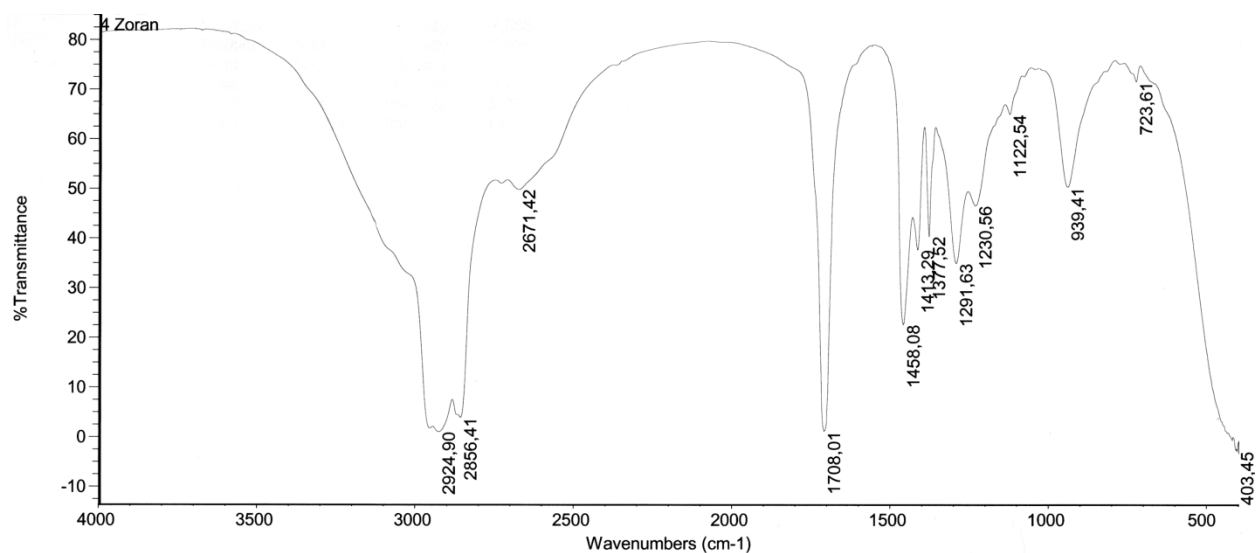


Slika 7.3. IR Spektar naftenskih kiselina

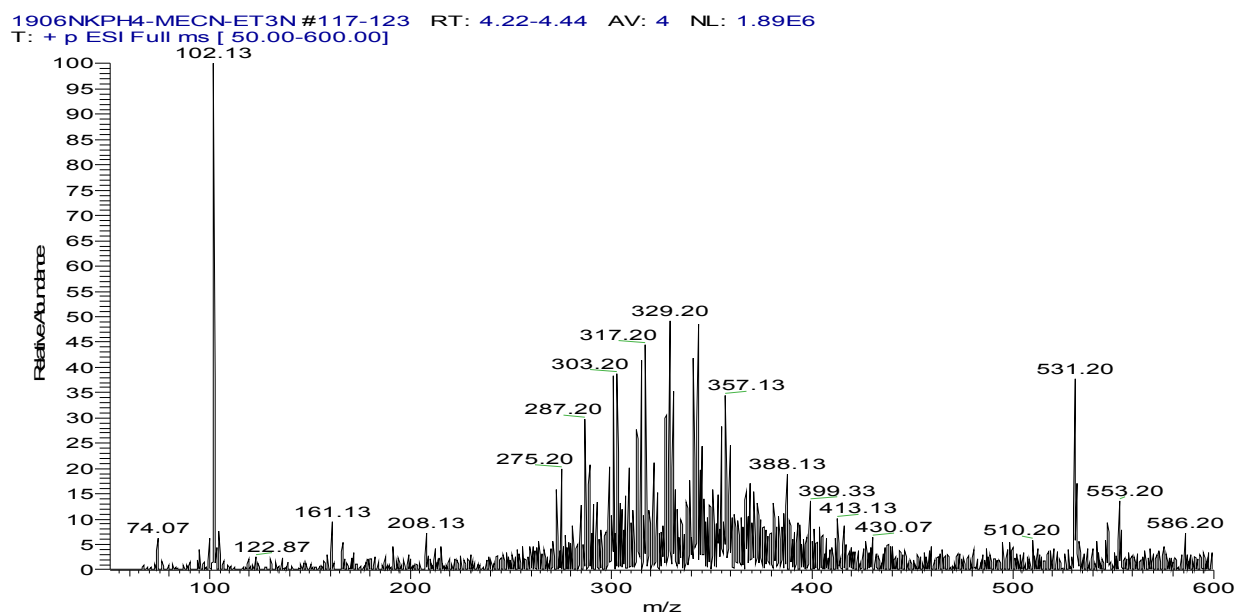
Slika 7.4. ¹H NMR Spektar naftenskih kiselina

Slika 7.5. ^{13}C NMR Spektar naftenskih kiselina

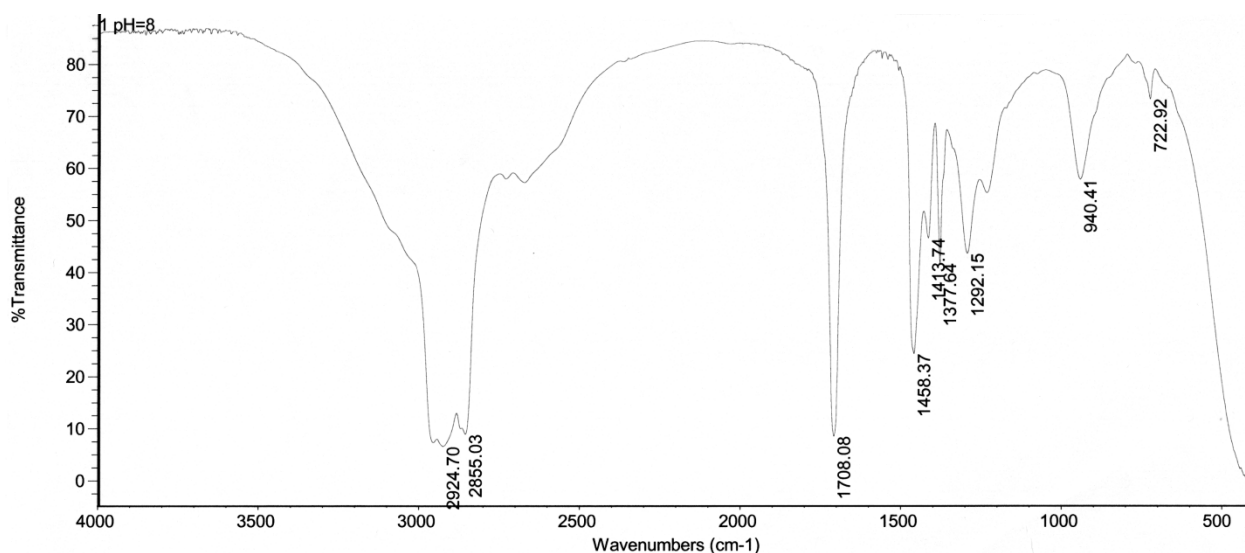
Slika 7.6. ESI HPLC-MS Spektar naftenskih kiselina



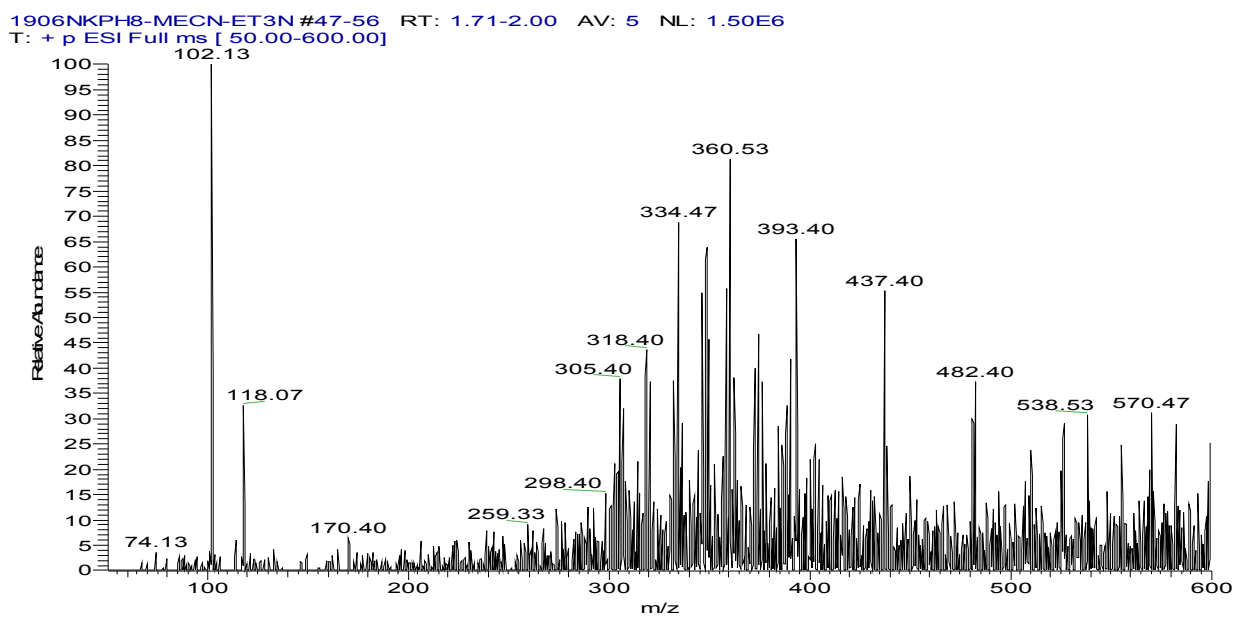
Slika 7.7. IR Spektar naftenskih kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora na pH 4



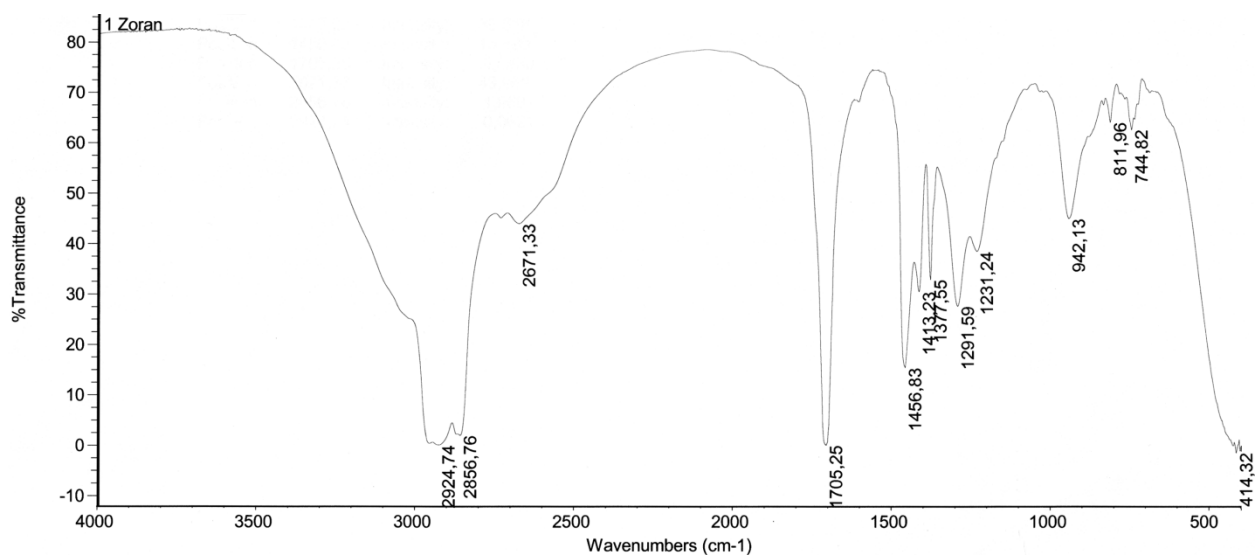
Slika 7.8. ESI HPLC-MS Spektar naftenskih kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora na pH 4



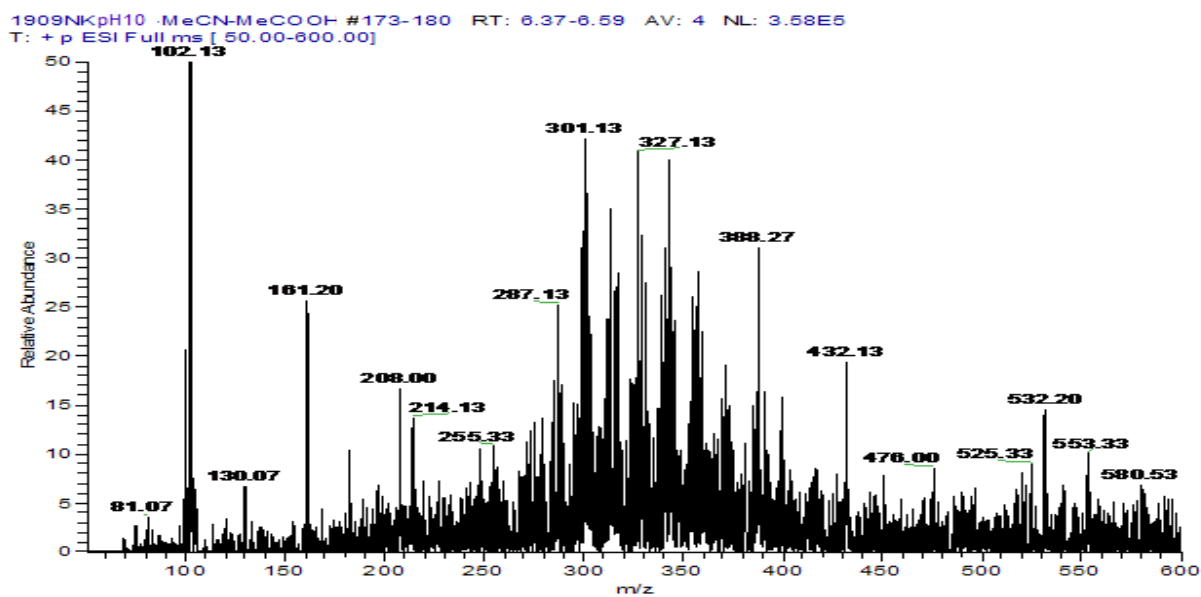
Slika 7.9. IR Spektar naftenskih kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora na pH 8



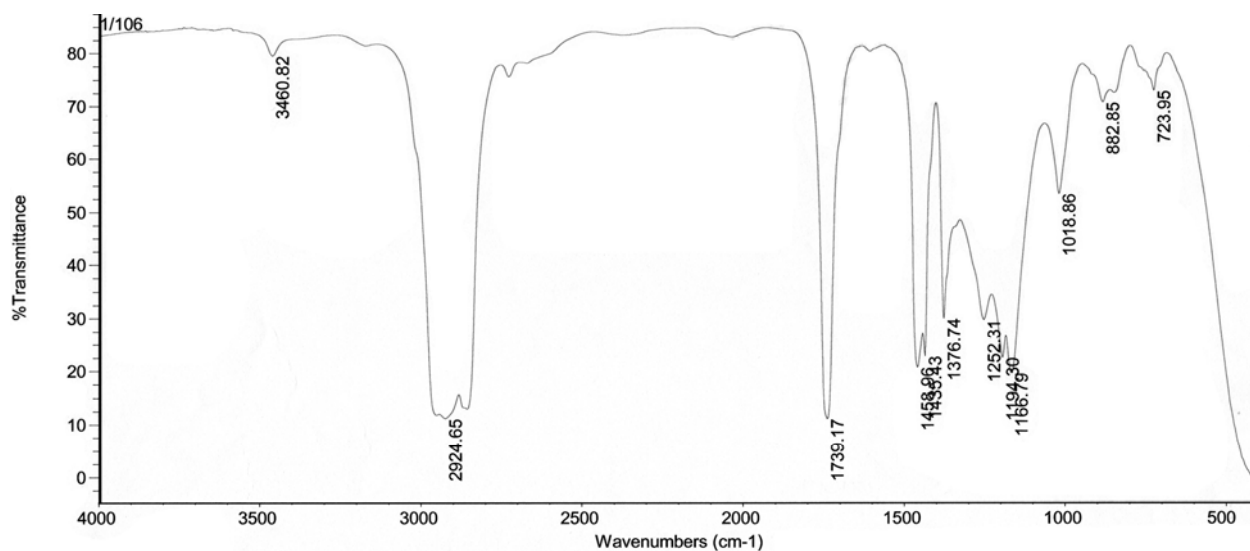
Slika 7.10. ESI HPLC-MS Spektar naftenskih kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora na pH 8



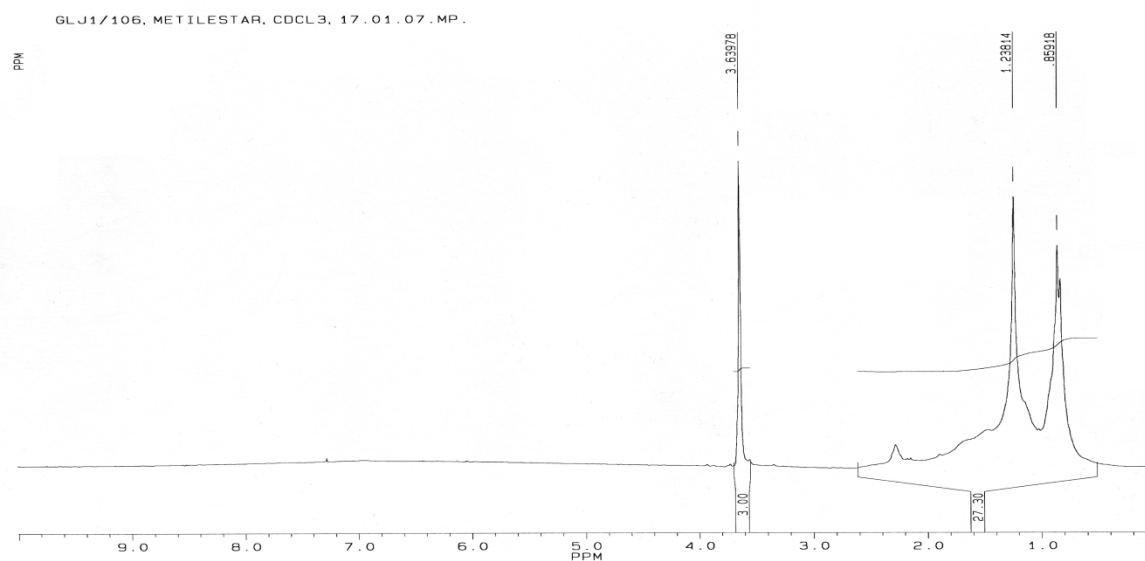
Slika 7.11. IR Spektar naftenskih kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora na pH 10



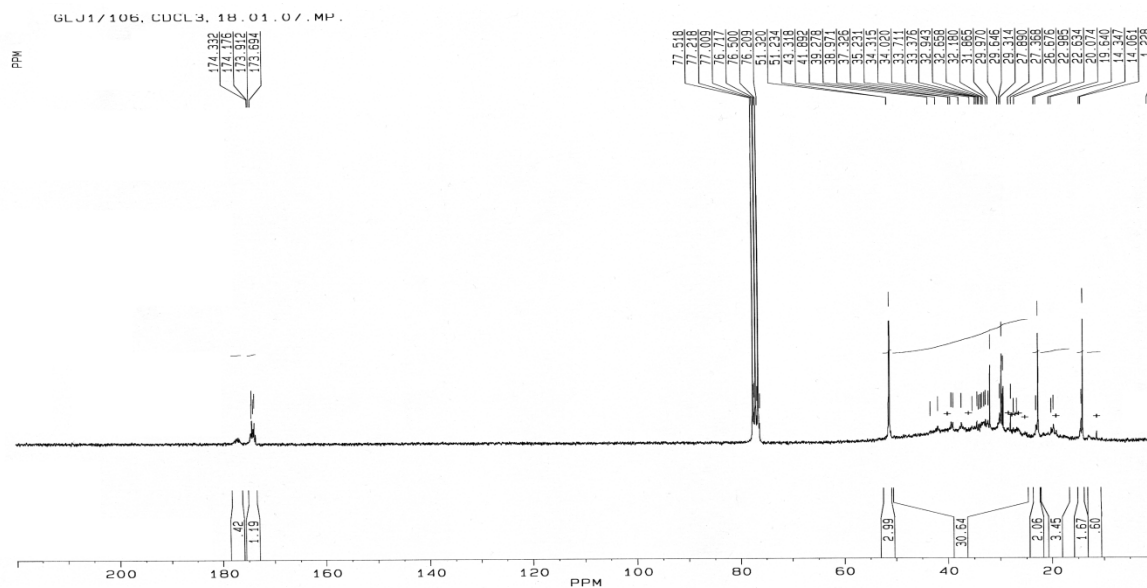
Slika 7.12. ESI HPLC-MS Spektar naftenskih kiselina ekstrahovanih iz vodenog rastvora na pH 10

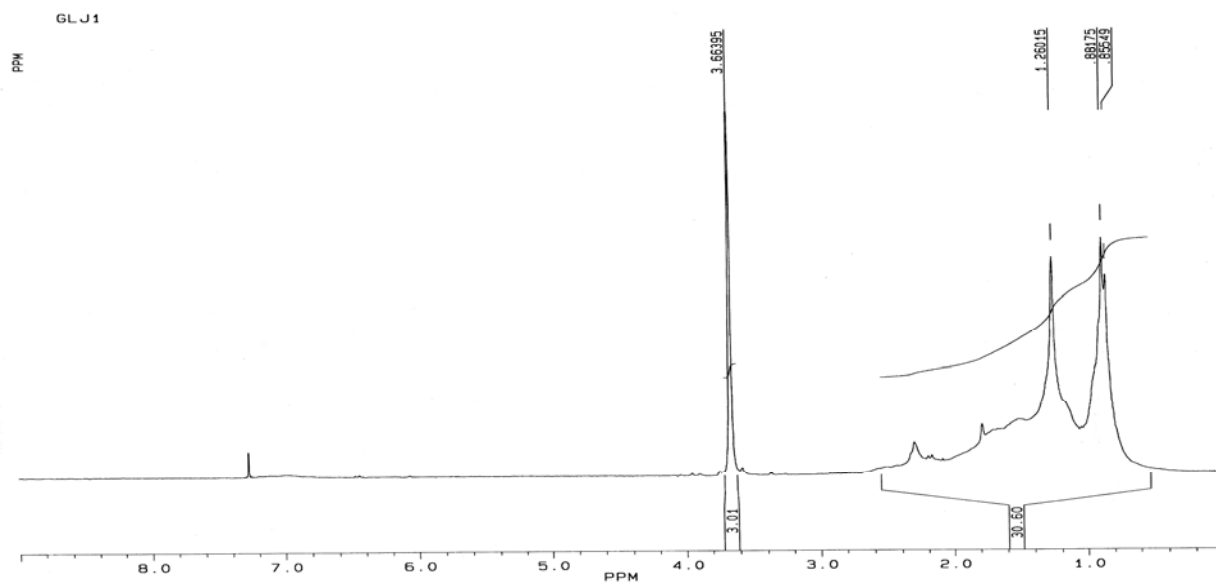


Slika 7.13. IR Spektar metilnaftenata sintetizovanih metilovanjem sa diazometanom

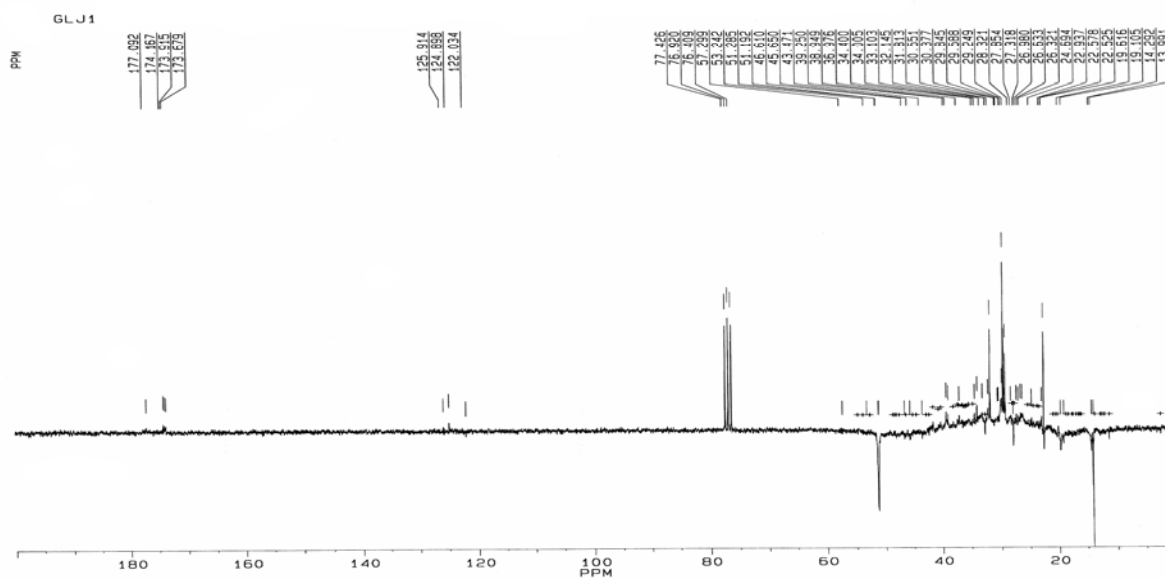


Slika 7.14. ¹H NMR Spektar metilnaftenata sintetizovanih metilovanjem sa diazometanom

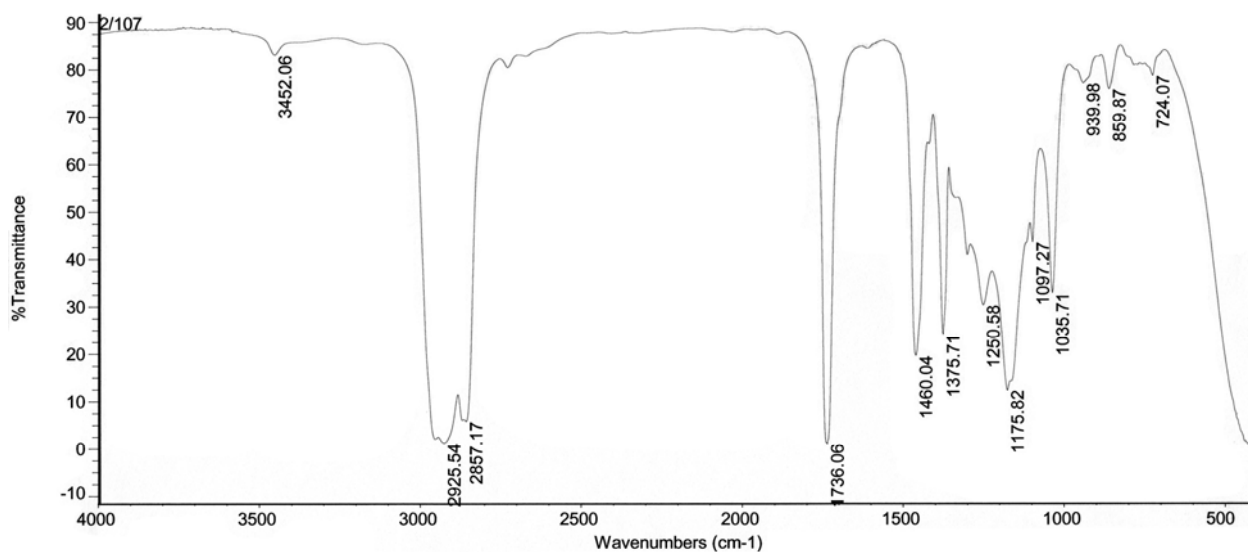




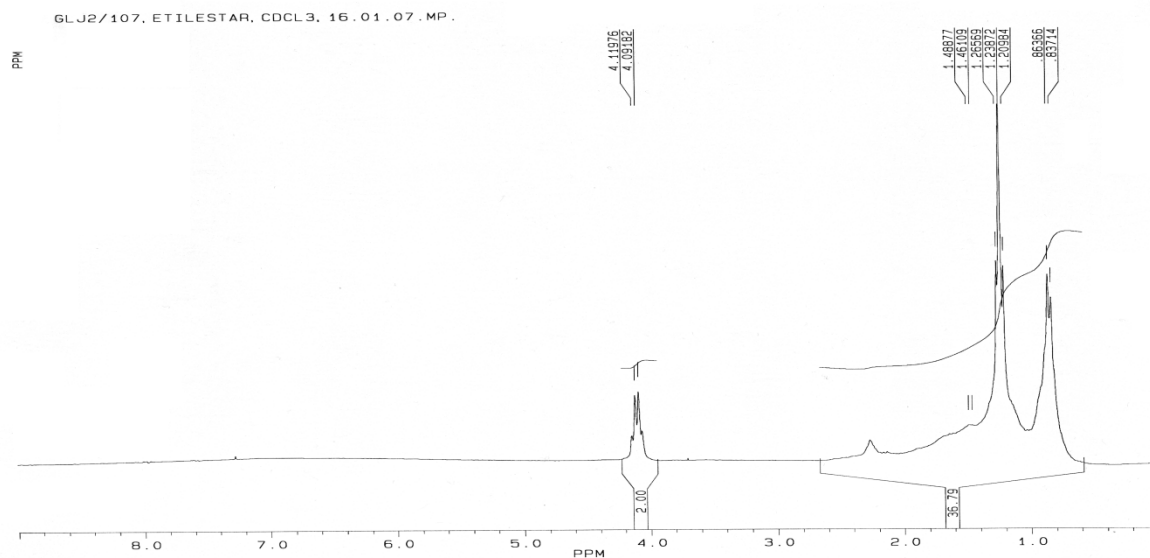
Slika 7.17. ^1H NMR Spektar metilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)



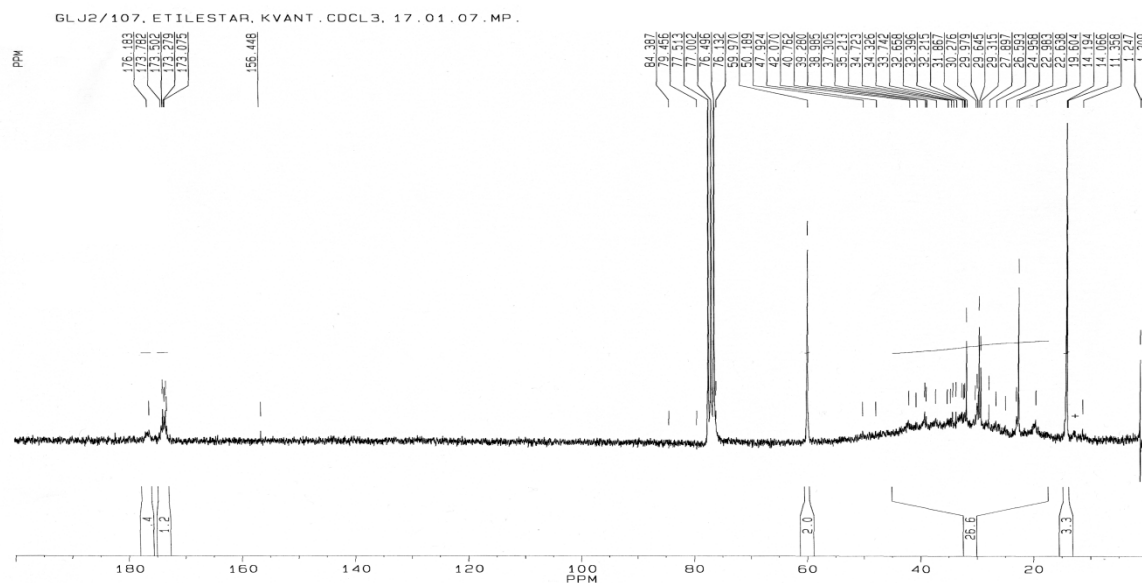
Slika 7.18. ^{13}C NMR Spektar metilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)



Slika 7.21. IR Spektar etilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)

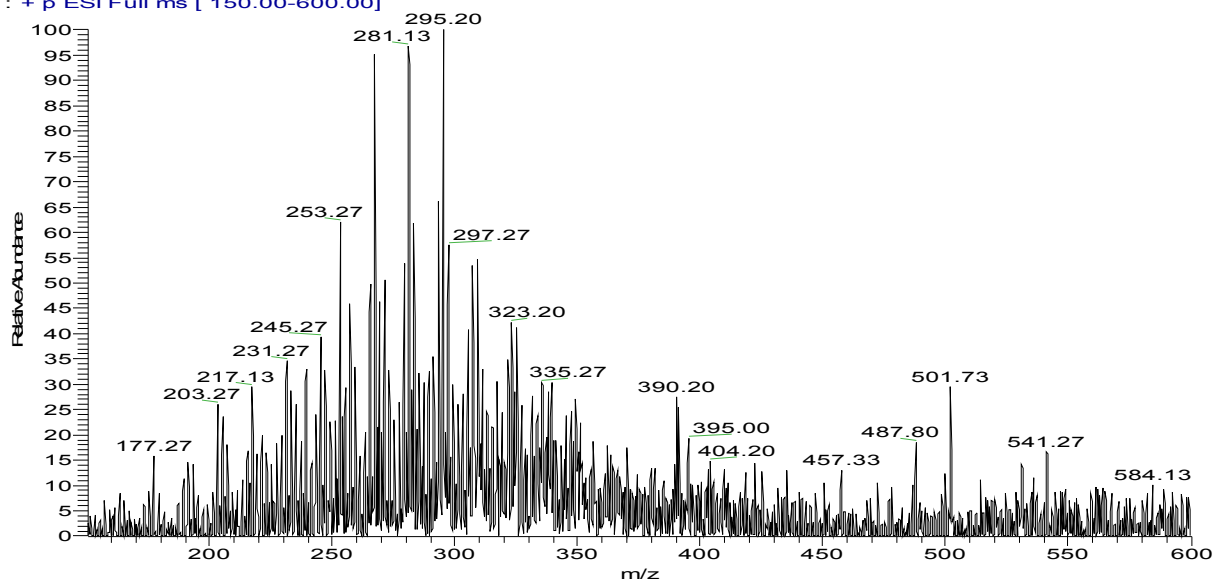


Slika 7.22. ¹H NMR Spektar etilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)

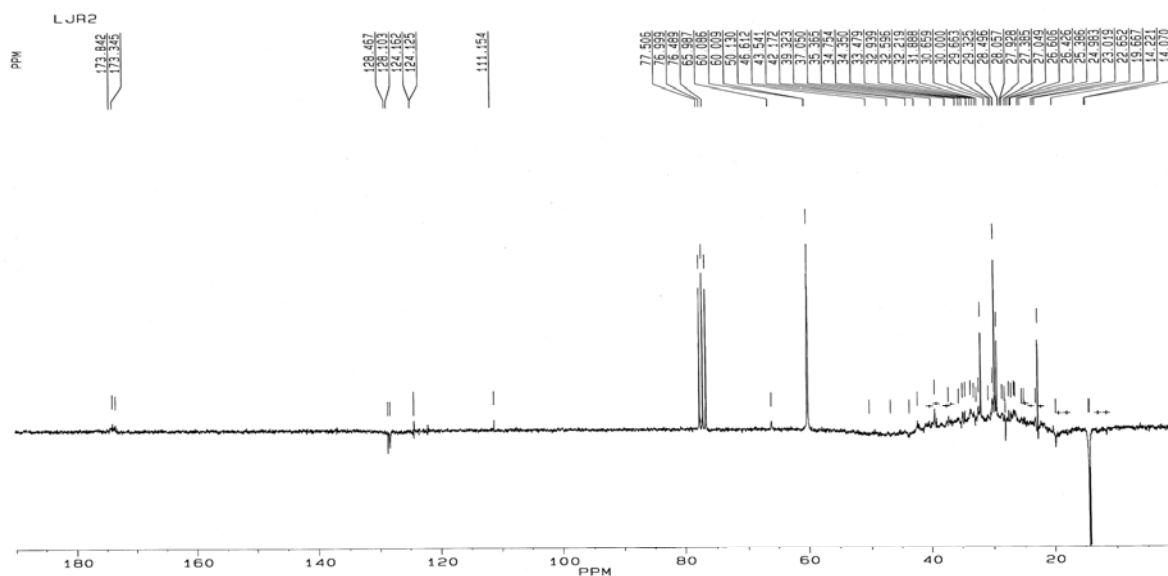


Slika 7.23. ^{13}C NMR Spektar etilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)

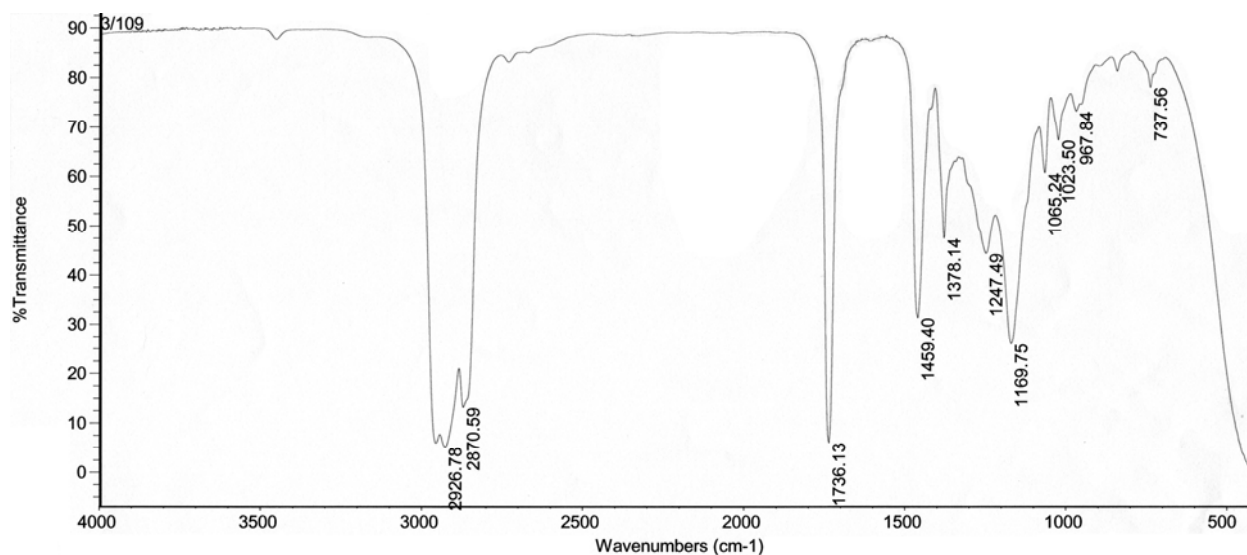
1101NKEt-TFA #98-105 RT: 2.73-2.93 AV: 8 NL: 1.03E5
T: + p ESI Full ms [150.00-600.00]



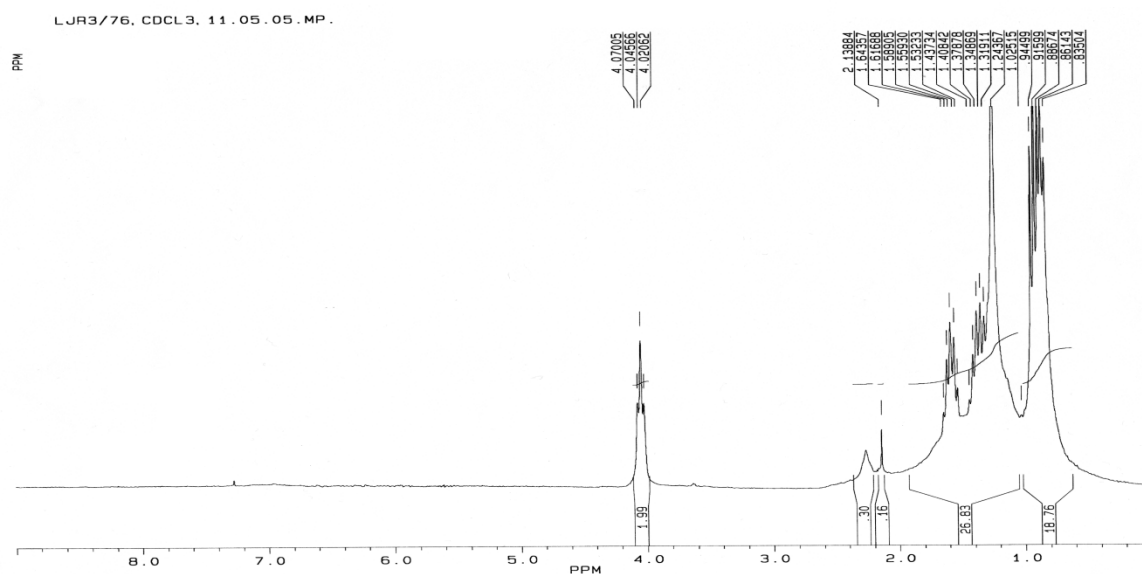
Slika 7.24. ESI HPLC-MS Spektar etilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)

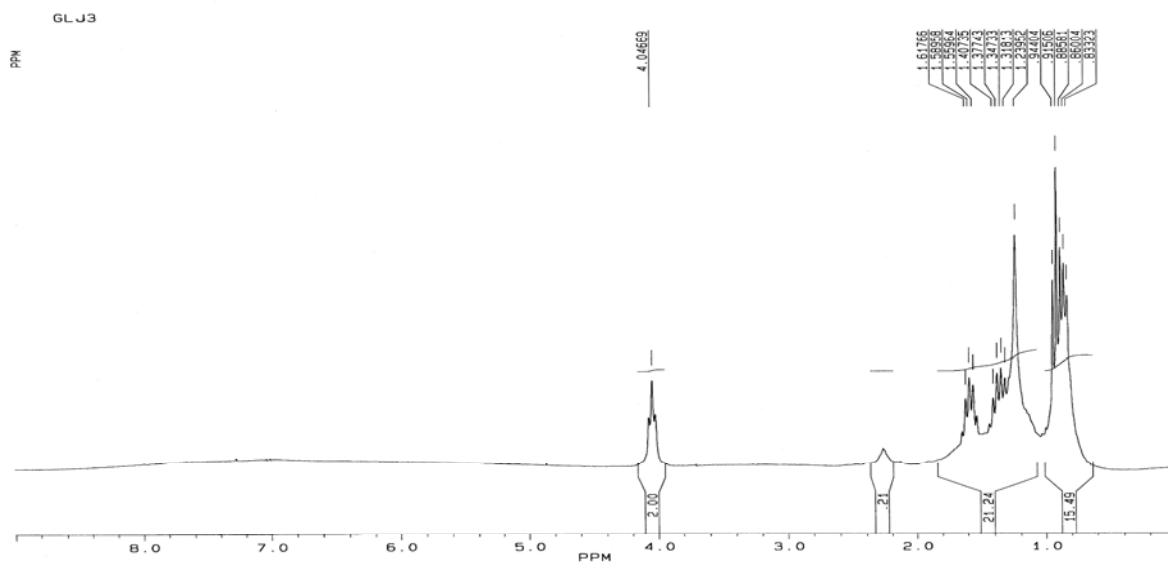


Slika 7.25. ^{13}C NMR Spektar etilnaftenata dobijenih esterifikacijom (mikrotalasi, sumporna kiselina)

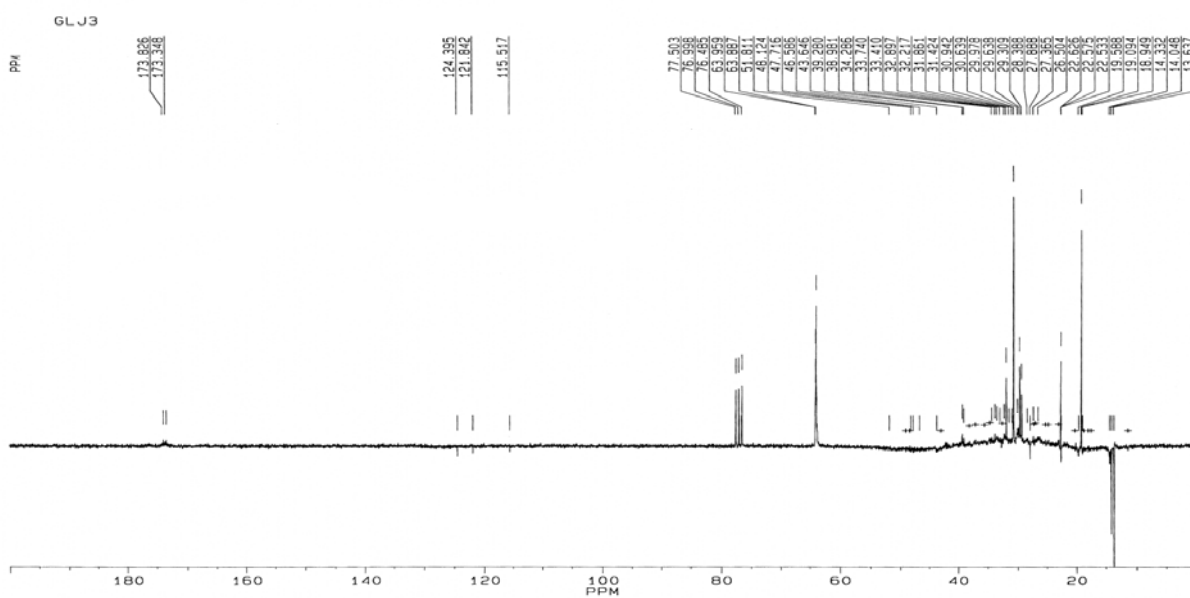


Slika 7.26. IR Spektar *n*-butilnaftenata dobijenih esterifikacijom (konvencionalno zagrevanje, sumporna kiselina)

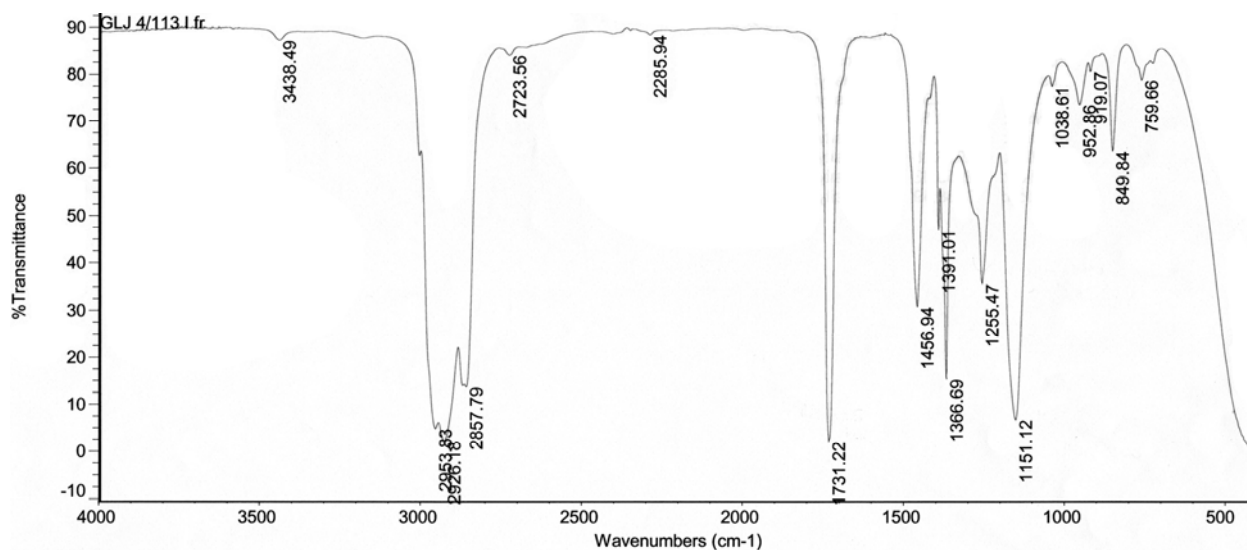




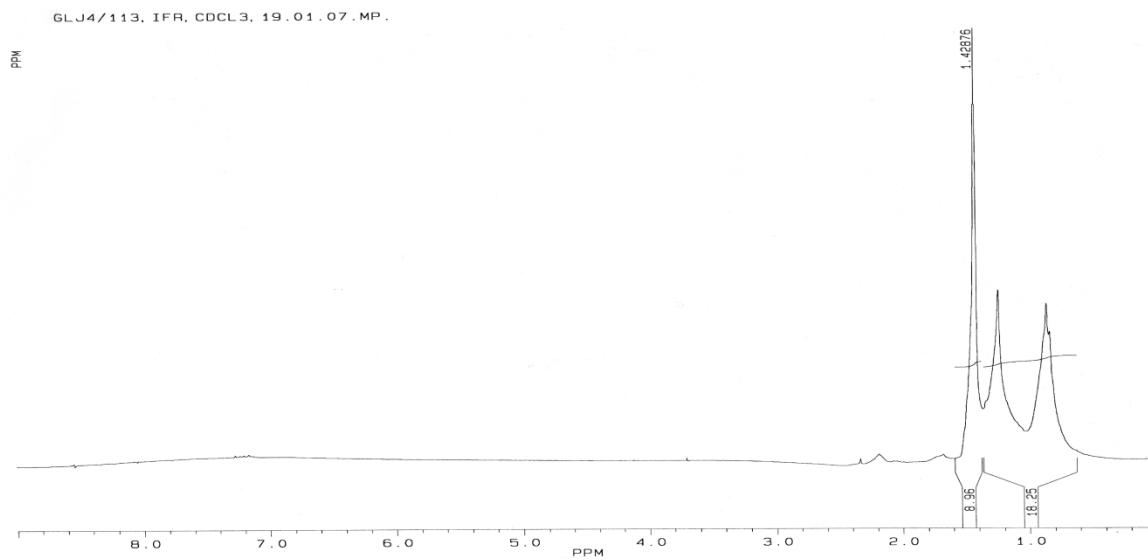
Slika 7.29. ^1H NMR Spektar *n*-butilnaftenata dobijenih esterifikacijom (mikrotalasi, sumporna kiselina)



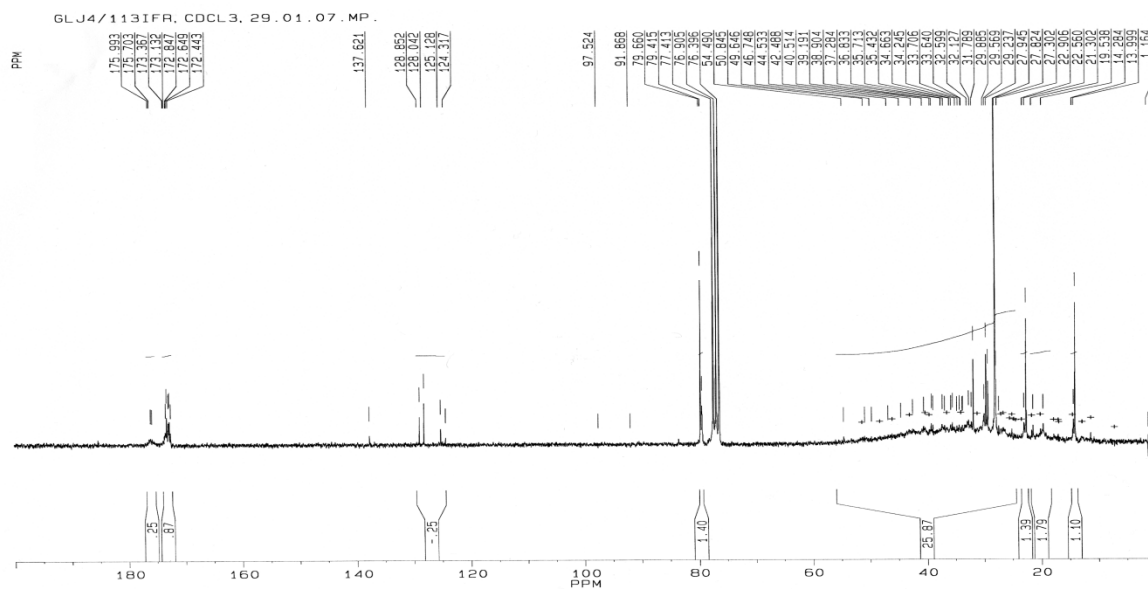
Slika 7.30. ^{13}C NMR Spektar *n*-butilnaftenata dobijenih esterifikacijom (mikrotalasi, sumporna kiselina)



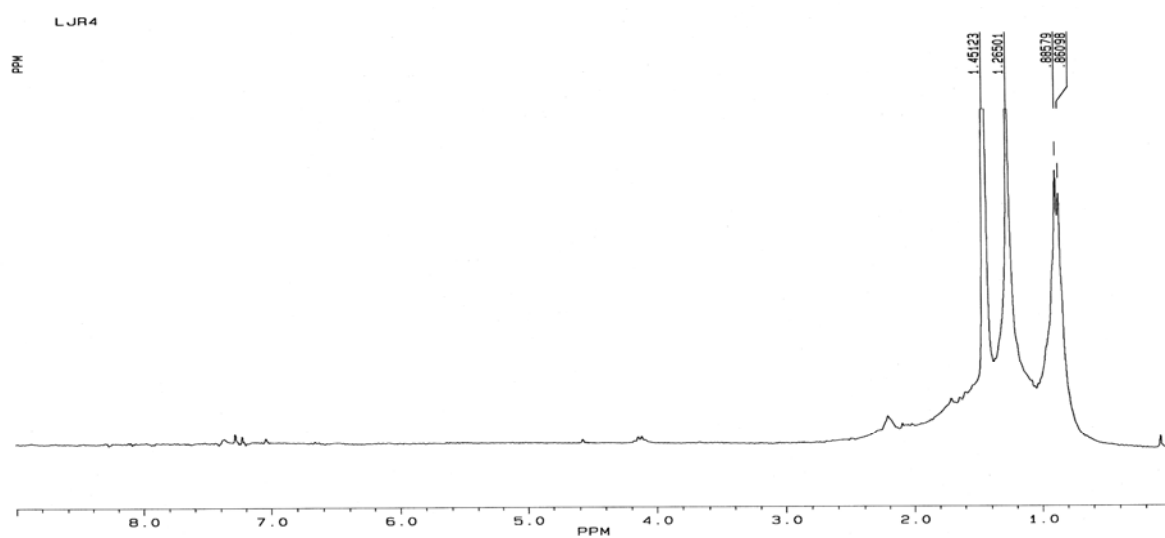
Slika 7.31. IR Spektar *tert*-butilnaftenata dobijenih iz hlorda kiseline



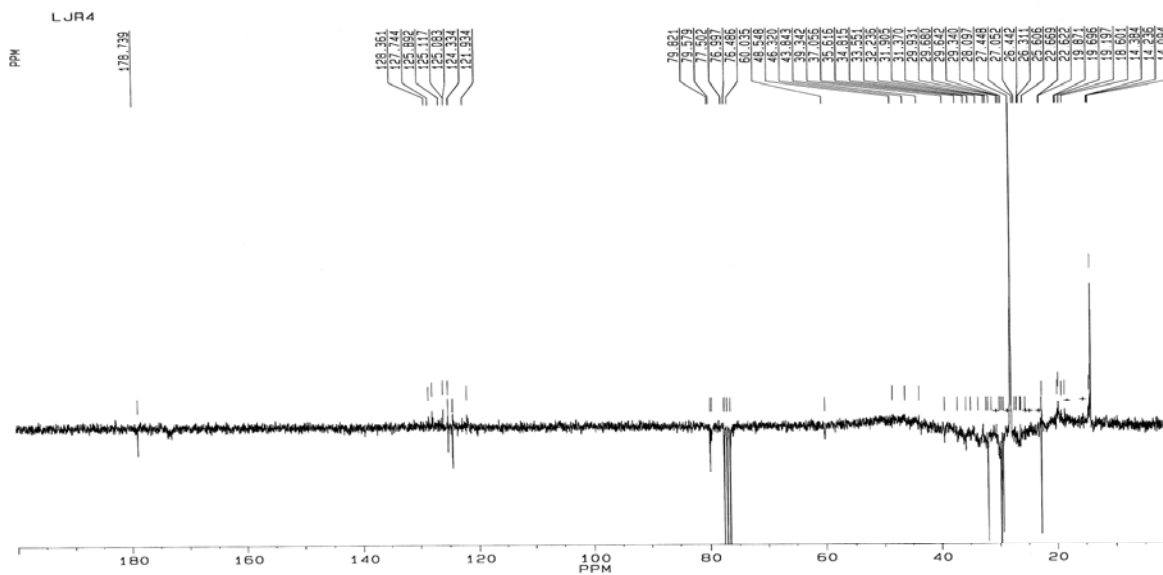
Slika 7.32. ¹H NMR Spektar *tert*-butilnaftenata dobijenih iz hlorda kiseline



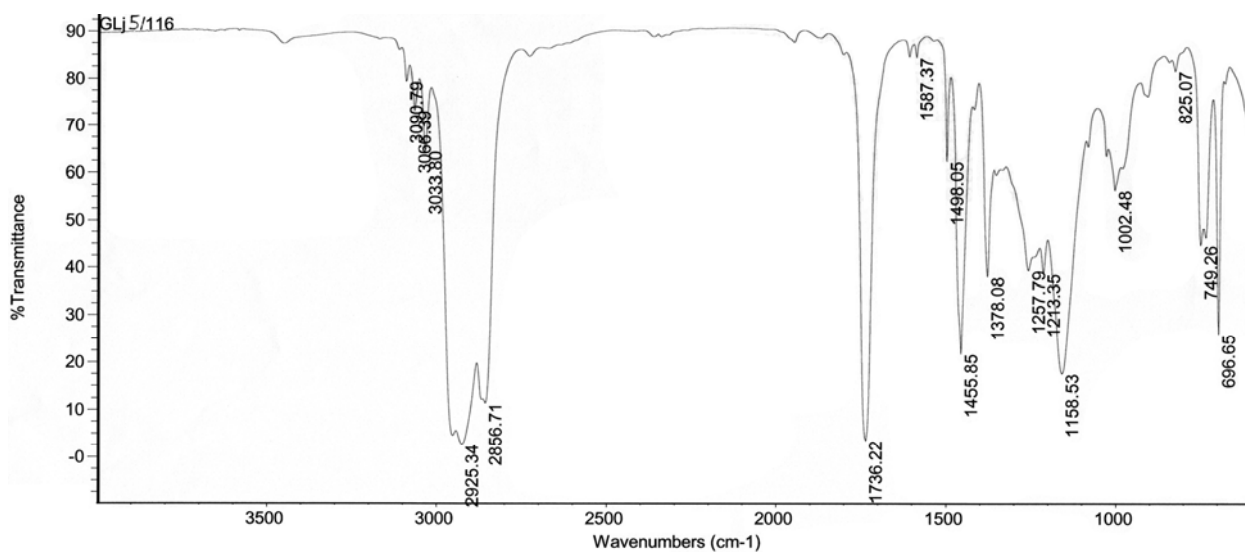
Slika 7.33. ^{13}C NMR Spektar *tert*-butilnaftenata dobijenih iz hlorda kiseline



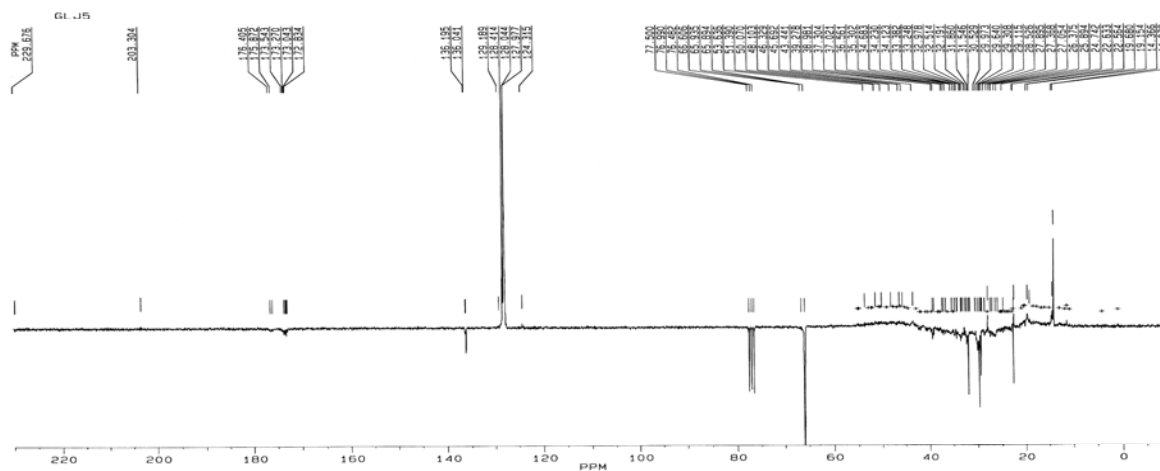
Slika 7.34. ^1H NMR Spektar *tert*-butilnaftenata dobijenih esterifikacijom (mikrotalasi, sumporna kiseline)



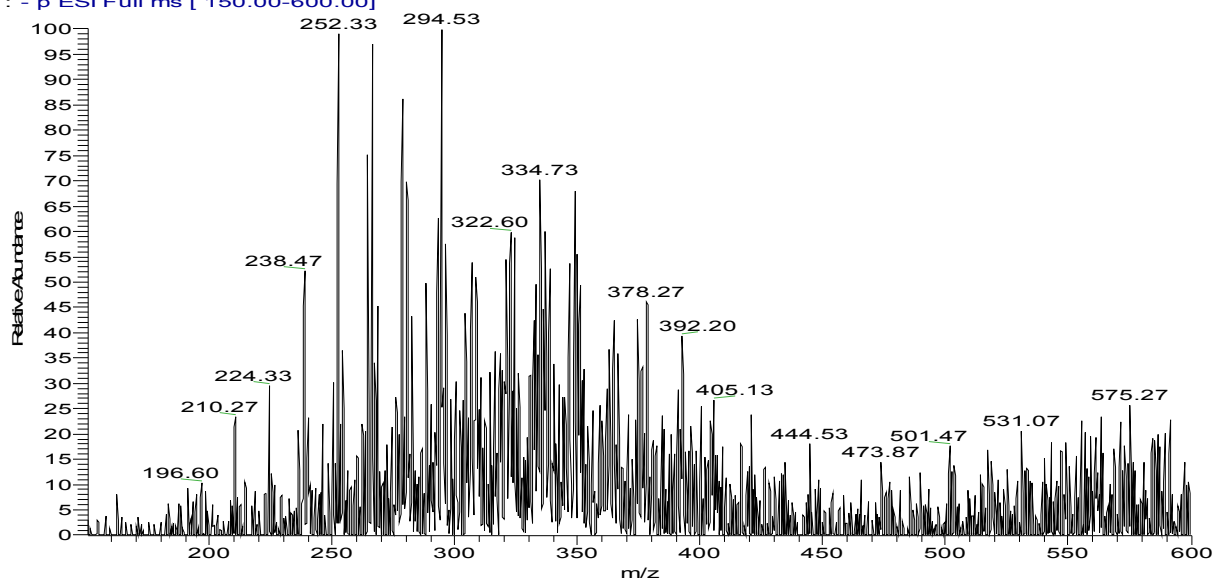
Slika 7.35. ^{13}C NMR Spektar *terc*-butilnaftenata dobijenih esterifikacijom (mikrotalasi, sumporna kiselina)



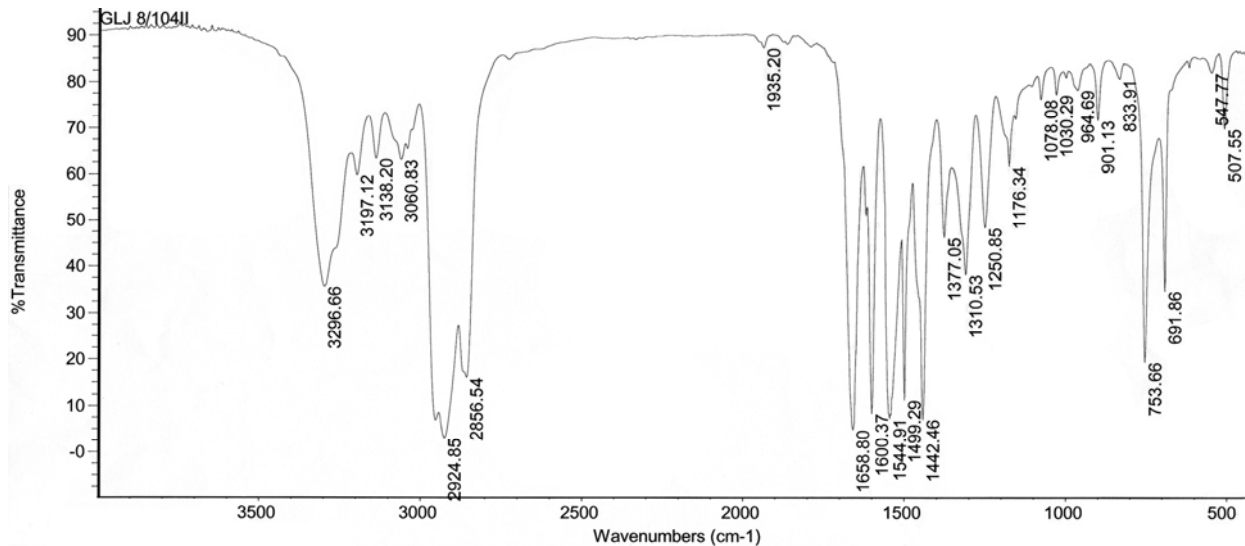
Slika 7.36. IR Spektar benzilnaftenata dobijenih iz hlorida kiselina



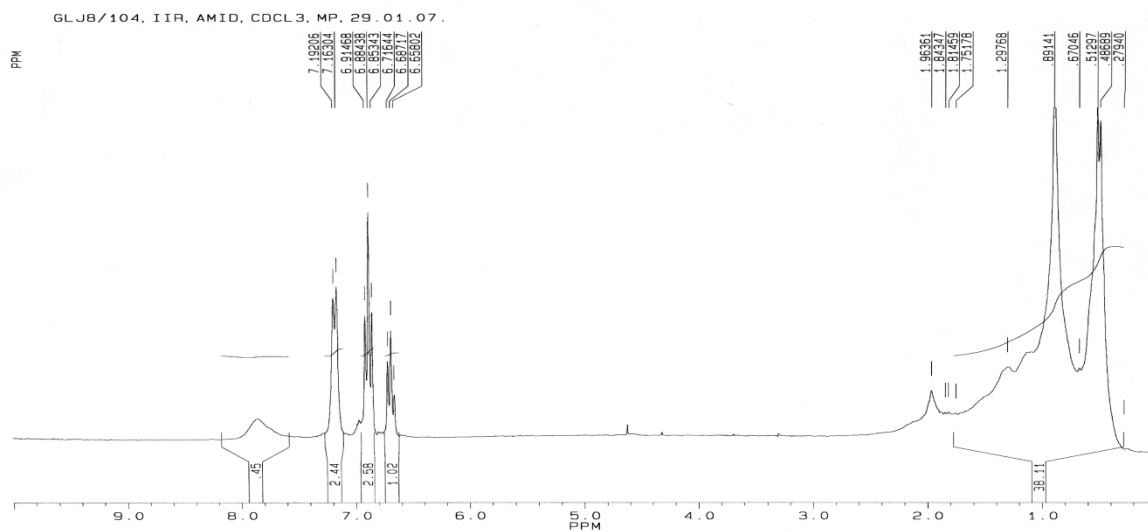
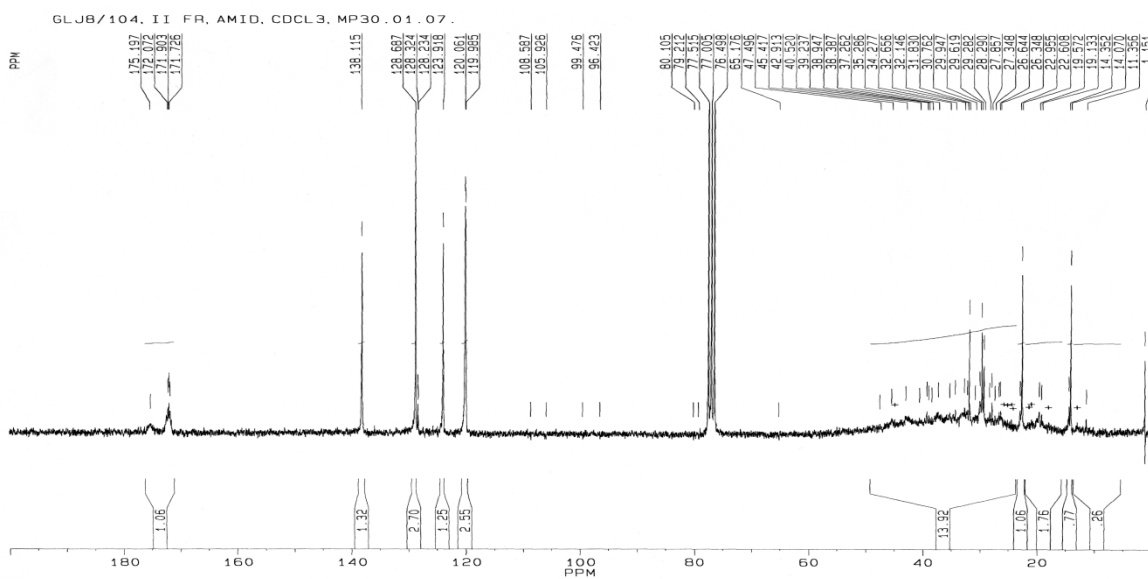
0809Amid-TFA #110-116 RT: 3.03-3.20 AV: 7 NL: 3.87E5
T: - p ESI Full ms [150.00-600.00]



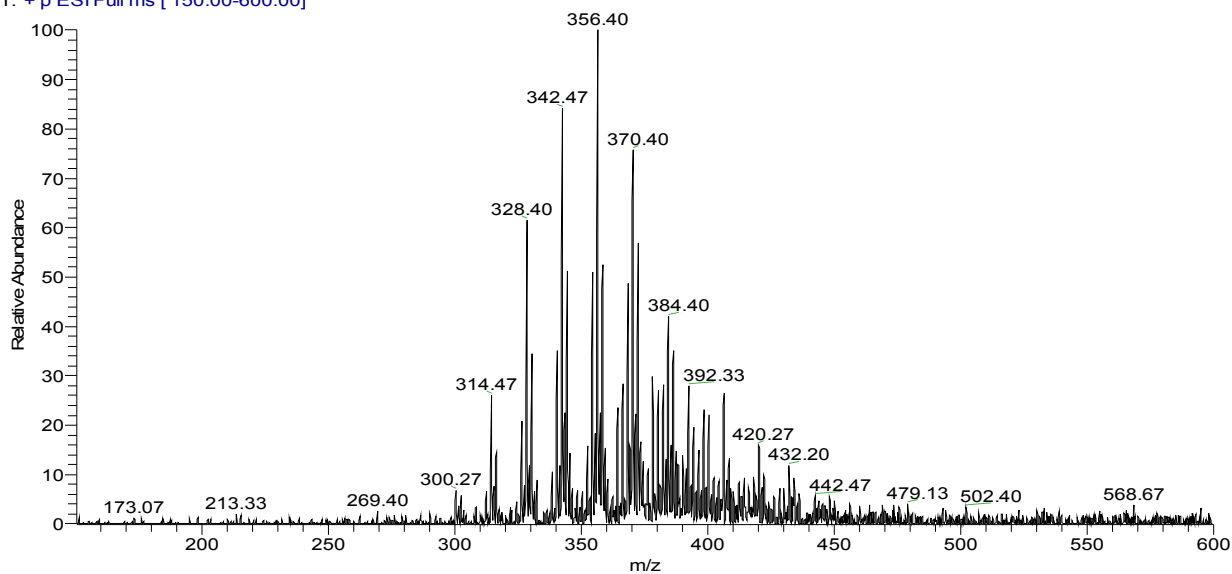
Slika 7.43. ESI HPLC-MS Spektar amida naftenskih kiselina



Slika 7.44. IR Spektar anilida naftenskih kiselina

Slika 7.45. ¹H NMR Spektar anilida naftenskih kiselinaSlika 7.46. ¹³C NMR Spektar anilida naftenskih kiselina

0809PhA-TFA #137-157 RT: 3.73-4.29 AV: 21 NL: 2.89E6
T: + p ESI Full ms [150.00-600.00]



Slika 7.47. ESI HPLC-MS Spektar anilida naftenskih kiselina

8. LITERATURA

1. D. Fleš: *Nafta*, **1970**, 6, 253.
2. A. Treibs: *Angew. Chem.*, **1936**, 49, 682.
3. J. E. Cooper, E. E. Bray: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1963**, 27, 1113.
4. K. A. Kvenvolden, D. Weiser: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1967**, 31, 1281.
5. J. Cason, D. W. Graham: *Tetrahedron*, **1965**, 21, 471.
6. J. Cason, I. A. Khodair: *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 3430.
7. P. Haug, N. K. Schnoes, H. L. Burlingame: *Science*, **1967**, 158, 772.
8. M. M. Rhead, G. Eglinton, G. H. Draffan, P. J. England: *Nature*, **1971**, 232, 327.
9. J. R. Maxwell, C. T. Pillinger, G. Eglinton: *Organic Geochemistry, Quart. Rev.*, Chem. Soc., London, **1971**, 25, 593.
10. A. M. Kuliev, P. Sh. Kuliev, K. U. Antonova: *Naftenovye kisloty*, Khimija, Moskva, **1965**.
11. J. S. Clemente, P. M. Fedorak: *Chemosphere*, **2005**, 60, 585-600.
12. J. Braun: *Ann.*, **1931**, 490, 100.
13. H. L. Lochte, E. R. Littmann: *The petroleum Acids and Bases*, Chemical Publishing Company, **1955**.
14. K. A. Kvenvolden: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1967**, 44, 628.
15. W. K. Seifert, R. M. Teeter: *Analyt. Chem.*, **1969**, 41, 786.
16. E. J. Gallegos, J. W. Green, L. P. Lindeman, R. L. LeTourneau, R. M. Teeter: *Analyt. Chem.*, **1967**, 39, 1838.
17. W. K. Seifert, E. J. Gallegos, R. M. Teeter: *Angew. Chem., Internat. Ed.*, **1971**, 10, 747.
18. J. Konterus: *J. Inst. Petroleum*, **1957**, 43, 307.
19. P. Haug, N. K. Schnoes, H. L. Burlingame: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1968**, 32, 358.
20. W. K. Seifert, R. M. Teeter: *Chem. Ind.*, London, **1969**, 1464.
21. W. K. Seifert, R. M. Teeter: *Analyt. Chem.*, **1970**, 42, 180.
22. W. K. Seifert, R. M. Teeter: *Analyt. Chem.*, **1970**, 42, 750.
23. S. A. Alekperova, A. E. Kalushin, J. G. Haboeva: „Uchenye zapiski” azerbajdzanskogo gosudarstvennogo universiteta, Serija himicheskikh nauk, **1970**, 1, 35.
24. M. A. Mardanov, S. M. Marhaseva, S. A. Sultanov, S. A. Samedova, N. P. Bizjaeva: *Azerb. neft. hoz.*, **1974**, 6, 32.
25. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: *Science*, **1989**, 246, 64-71.
26. F. Schulz, S. Franzka, G. Schmid: *Advanced Functional Materials*, **2002**, 12, 532-536.
27. L. Perreux, A. Loupy: *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9199-9223.
28. P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman: *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9225-9283.
29. A. Loupy: *Microwaves in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2002**.
30. B. Desai, D. Dallinger, O. Kappe: *Tetrahedron*, **2006**, 62, 4651-4664.
31. A. Loupy, P. Pigeon, M. Ramdani: *Tetrahedron*, **1996**, 52, (19), 6705-6712.

32. A. Loupy, A. Petit, M. Ramdani, C. Yvanaeff, M. Majdoub, B. Labiad, D. Villemin: *Can. J. Chem.*, **1993**, *71*, (1), 90-95.
33. D. Donati, C. Morelli, M. Taddei: *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 2817-2819.
34. B. Dayal, K. Rao, G. Salen: *Steroids*, **1995**, *60*, 453-457.
35. E. S. H. El Ashry, L. F. Awad, H. Abdel Hamid, A. I. Atta: *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2007**, *26*, 329-338.
36. V. Polshettiwar, M. P. Kaushik: *Catalysis Communications*, **2005**, *6*, 191-194.
37. C. Mazzocchia, G. Modica, A. Kaddouri, R. Nannicini: *C. R. Chimie*, **2004**, *7*, 601-605.
38. I. Roy, M. N. Gupta: *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 5431-5436.
39. A. Loupy, L. Perreux, M. Liagre, K. Burle, M. Moneuse: *Pure Appl. Chem.*, **2001**, *73*, (1), 161-166.
40. R. S. Varma, K. P. Naicker: *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 6177-6180.
41. L. Perreux, A. Loupy, M. Delmotte: *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 2185-2189.
42. A. Khalafi-Nezhad, B. Mokhtari, M. Navid, S. Rad: *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 7325-7328.
43. C. S. Reddy, A. Nagaraj, P. Jalapathi: *Chinese Chemical Letters*, **2007**, *18*, 1213-1217.
44. A. Borriello, L. Nicolais, X. Fang, S. J. Huang, D. A. Scola: *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**, *103*, 1952-1958.
45. C. Ferroud, M. Godart, S. Ung, H. Borderies, A. Guy: *Tetrahedron Letters*, **2008**, *49*, 3004-3008.
46. F. W. Went: *Wuchstoff und Wachstum. Recl. Trav. Bot. Neerl.*, **1928**, *1*, 25.
47. E. Kurosawa: *Trans. Natl. Hist. Soc. Formosa*, **1926**, *16*, 213.
48. C. Neuberg, M. Sandberg: *Biochem. Zeit.*, **1921**, *126*, 153.
49. D. J. Wort, K. M. Patel: *Agron. J.*, **1970**, *62*, 644-646.
50. B. K. Dokholyan, A. K. Magomedov: *J. Ichthyol.*, **1984**, *23*, 125-132.
51. T. Yamano, M. Shimizu, T. Noda: *Contact Dermatitis*, **2006**, *54*, 25-28.
52. D. J. Wort: *Plant Physiol.*, **1976**, *58*, 82-86.
53. J. G. Severson: *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 71-76.
54. J. W. C. Loh, J. G. Severson: *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 1265-1267.
55. Q. A. Fattah, D. J. Wort: *Can. J. Bot.*, **1970**, *48*, 189-194.
56. D. J. Wort, J. G. Severson, D. R. Peirson: *Plant Physiol.*, **1973**, *52*, 162-165.
57. Went et al.: *Phytohormones*, Mac Millan Co., N.Y., **1937**, 294.
58. A. U. Crowe, B. Han, A. R. Kermode, L. I. Bendell-Young, A. L. Plant: *Environmental Pollution*, **2001**, *113*, 311-322.
59. S. S. Leung, M. D. MacKinnon, R. E. H. Smith: *Aquatic Toxicology*, **2003**, *62*, 11-26.
60. V. Nero, A. Farwell, A. Lister, G. Van Der Kraak, L. E. J. Lee, T. Van Meer, M. D. MacKinnone, D. G. Dixon: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2006**, *63*, 365-377.
61. N. M. Greev: *Izv. Akad. Nauk Az. SSR, Ser. Biol. Nauk*, **1982**, 110-114.
62. M. N. Nabiev, L. N. Semenova, L. F. Gulianova, M. M. Sadykov, A. M. Amirova: Pat. USSR, 679, 157 (CLCO5D1/02); 1979; CA 91, 192191, **1979**.
63. V. Nero, A. Farwell, L. E. J. Lee, T. Van Meer, M. D. MacKinnon, D. G. Dixon: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2006**, *65*, 252-264.
64. A. Farwell, V. Nero, M. Croft, P. Bal, D. G. Dixon: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2006**, *51*, 600-607.
65. A. Lister, V. Nero, A. Farwell, D. G. Dixon, G. Van Der Kraak: *Aquatic Toxicology*, **2008**, *87*, 170-177.

66. V. V. Rogers, M. Wickstrom, K. Liber, M. D. MacKinnon: *Toxicological Sciences*, **2002**, 66, 347-355.
67. L. E. Peters, M. MacKinnon, T. Van Meer, M. R. Van den Heuvel, D. G. Dixon: *Chemosphere*, **2007**, 67, 2177-2183.
68. M. Gentes: *Health Assessment of Tree Swallows (Tachycineta bicolor) Nesting on the Athabasca Oil Sands, Alberta*, A Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science at the University of Saskatchewan, **2006**.
69. M. Gentes, C. Waldner, Z. Papp, J. E. G. Smits: *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **2007**, 70, 1182-1190.
70. V. L. Shishkin, E. R. Uzhavina, R. M. Gubaidullin. In: *Toksikologiya i gigiena produktov neftekhimnii i neftekhimicheskikh proizvodstv*. Yaroslavl, 217-219, **1972**.
71. V. Ćirin-Novta: *Ispitivanje naftenskih kiselina u vojvođanskim naftama "Velebit" i "Kelebija"*, Magistarska teza, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, **1980**.
72. V. Ćirin-Novta: *Dobijanje, struktura i biološka aktivnost naftnih kiselina*, Doktorska disertacija, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, **1991**.
73. D. Miljković, V. Ćirin-Novta, S. Repić: *Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke*, 83, 33- 39, **1992**.
74. V. Ćirin-Novta, D. Miljković, K. Kuhajda, S. Repić: *Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke*, 86, 51- 55, **1994**.
75. S. Repić, V. Ćirin-Novta, D. Miljković, N. Vukadinović, B. Miroslavljev: *Nauka tehnika bezbednost*, 2, 91- 96, **1994**.
76. S. Repić, B. Milosavljević, V. Ćirin-Novta: *Hemijska industrija*, 52, 47- 50, **1998**.
77. V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, S. Kevrešan, J. Kandrač, Lj. Radić: *Acta Periodica Technol.*, 33, 135- 141, **2002**.
78. V. S. Ćirin-Novta, K. N. Kuhajda, S. E. Kevrešan, J. E. Kandrač, Lj. M. Grbović, P. A. Rodić: *Acta Period. Technol.*, 35, 87- 93, **2004**.
79. V. Ćirin-Novta, D. Miljković, N. Kobilarov: *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska*, 84, 57- 61, **1993**.
80. Ch. Ch. Lo, B. G. Brownlee, N. J. Bunce: *Anal. Chem.*, 75, 6394-6400, **2003**.
81. Ch. S. Hsu, G. J. Dechert, W. K. Robbins, E. K. Fukuda: *Energy & Fuels*, 14, 217-223, **2000**.
82. J. W. Martin, X. Han, K. M. Peru, J. V. Headley: *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 22, 1919-1924, **2008**.
83. A. C. Scott, M. D. MacKinnon, P. M. Fedorak: *Environ. Sci. Technol.*, 39, 8388-8394, **2005**.
84. V. S. Ćirin-Novta, D. A. Miljković, S. Repić: *Petrol.Chem.*, 32, 490- 495, **1992**.
85. V. V. Rogers, K. Liber, M. D. MacKinnon: *Chemosphere*, 48, 519-527, **2002**.
86. W. P. St. John, J. Rughani, S. Green, G. D. McGinnis: *Journal of Chromatography A*, 807, 241-251, **1998**.
87. D. M. Jones, J. S. Watson, W. Meredith, M. Chen, B. Bennett: *Anal. Chem.*, 73, 703-707, **2001**.
88. M. P. Barrow, J. V. Headley, K. M. Peru, P. J. Derrick: *Journal of Chromatography A*, 1058, 51-59, **2004**.
89. V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, D. Miljković, S. Velimirović, S. Sušić: *I. Regional Symposium "Chemistry and the Environment"*, Vrnjačka Banja, 29, 215-218, **1995**.
90. S. Repić, D. Čomić, V. Ćirin-Novta: *Hemijska industrija*, 51, 335- 337, **1997**.
91. A. Melera: *Advan. Mass Spectrom.*, 8B, 1597, **1980**.
92. K. Pavlović: *Mikrotalasna sinteza derivata naftenskih kiselina i njihova biološka aktivnost*, Magistarski rad, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, **2009**.

93. S. Repić: *Prilog proučavanju struktura nativnih naftnih kiselina*, Doktorska disertacija, PMF Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, **1988**.
94. R. Kastori, N. Petrović, T. Savkov, D. Miljković: *Acta Biol. Med. Exp.*, **13**, 83, **1988**.
95. N. S. Nametkin, G. M. Egorova, R. K. Khamaev: *Naftenovye kisloty i produkty ikh khimicheskoi prerabotki*, Khimija, Moskva, **1982**.
96. V. S. Ćirin-Novta, K. N. Kuhajda, S. E. Kevrešan, J. E. Kandrač, Lj. M. Radić: *Acta Periodica Technologica*, **2002**, **33**, 135-141.
97. B. L. Epel, M. Erlanger, A. Yahalom: *Plant Growth Regulation*, **1987**, **5**, 3-14.
98. S. Kevrešan, V. Ćirin-Novta, D. Vasić, K. Kuhajda, J. Kandrač, N. Petrović, Lj. Radić: *Helia*, **2003**, **26**, 75-82.
99. S. Kevrešan, V. Ćirin-Novta, B. Kovačević, K. Kuhajda, J. Kandrač, N. Petrović, Lj. Radić: *Topola*, **2003**, **171/172**, 63-72.
100. A. Halmagyi, S. Kevrešan, B. Kovačević, V. Ćirin-Novta, K. Pavlović, Lj. Grbović, K. Kuhajda: *Propagation of Ornamental Plants*, **2008**, **8**, 148-150.
101. S. Kevrešan, B. Kovačević, V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, J. Kandrač, K. Pavlović, Lj. Grbović: *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2007**, **72**, 953-959.
102. N. C. Bhattacharya, In: *Adventitious root formation in cuttings*, T. D. Davis, B. E. Haissig, N. Sanklila, Eds., Dioscorides Press, Portland, **88**, **1989**.
103. T. Güneş: *Turk. J. Bot.*: **2000**, **24**, 97.
104. A. N. Molassiotis, K. Dimassi, G. Diamantidis, I. Therios: *Biol. Plant.*, **2004**, **48**, 1.
105. C. Saxena, S. Samantaray, G. R. Rout, P. Das: *Biol. Plant.*, **2000**, **43**, 121.
106. I. S. Sheoran, R. H. Singal, R. Singh: *Photosynth. Res.*, **1990**, **73**, 345-351.
107. X. Yang, V. C. Baligar, D. C. Martens, R. B. Clark: *J. Plant Nutr.*, **1996**, **19**, 643-656.
108. F. Van Assche, H. Clijsters: *Plant Cell Environ.*, **1990**, **13**, 195-206.
109. O. Ouariti, N. Boussama, M. Zarrouk, A. Cherif, M. H. Ghorbal: *Phytochemistry*, **1997**, **45**, 1343-1350.
110. R. Kastori, M. Petrović, N. Petrović: *J. Plant Nutr.*, **1992**, **15**, 2427-2439.
111. I. R. Mor, S. J. Gokani, S. V. Chanda: *J. Plant Nutr.*, **2002**, **25**, 843-860.
112. M. Ghorbanli, S. H. Kaveh, M. F. Sepehr: *Photosynthetica*, **1999**, **37**, 627-631.
113. M. Popović, S. Kevrešan, J. Kandrač, J. Nikolić, N. Petrović, R. Kastori: *Biol. Plant.*, **38**, **1996**, 281-287.
114. K. S. Sajwan, S. Paramasivam, J. P. Richardson, A. K. Alva: *J. Plant Nutr.*, **2002**, **25**, 2027-2034.
115. D. Panković, M. Plesničar, I. Arsenijević-Maksimović, N. Petrović, Z. Sakač, R. Kastori: *Ann. Bot.*, **2000**, **86**, 841-847.
116. L. Lunáčková, A. Šottníková, E. Masarovičová, A. Lux, V. Streško: *Biol. Plant.*, **2003/4**, **47**, 403-411.
117. M. Emmerling, E. K. Ong, T. I. Sawbridge, G. Spangenberg: Modification of metal-handling in plants. Patent WO 02020491.
118. H. H. Witt: Die Beurteilung des Molybden-Ernährugszustandes von Pflanzen mit Hilfe der Nitratreduktase-Aktivität, Universität Hannover, Hannover 1975.
119. D. Von Wettstein: *Exp. Cell Res.*, **12**, **1957**, 427-506.
120. S. Kevrešan, V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, J. Kandrač, N. Petrović, Lj. Grbović, Ž. Kevrešan: *Biologia Plantarum*, **2004**, **48**, 453-455.
121. M. Kamaluddin, J. J. Zwiazek: *Tree Physiology*, **2002**, **22**, 1265-1270.

9. SKRAĆENICE

Bn.....	benzil
DEAD.....	dietilazodikarboksilat
DIAD.....	diizopropilazodikarboksilat
DIAZALD.....	<i>N</i> -nitrozo- <i>N</i> -metil- <i>p</i> -toluensulfonamid
DMF.....	<i>N,N</i> -dimetilforamid
DMSO.....	dimetil-sulfoksid
Et.....	etil
EtOAc.....	etil-acetat
GA ₃	giberelinska kiselina-3
GA ₉	giberelinska kiselina-9
GA ₁₂	giberelinska kiselina-12
IAA.....	3-indolsirćetna kiselina
IBA.....	3-indolbuterna kiselina
K _b	kiselinski broj
LD ₅₀	srednja smrtna doza
Me.....	metil
Mr.....	relativna molekulska masa
MT.....	mikrotalasi
NAA.....	α -naftilsirćetna kiselina
NK.....	naftne kiseline naftenskog tipa, naftenske kiseline
Nu ⁻	nukleofil
<i>n</i> -Oct.....	<i>n</i> -oktil
PET.....	polietilentereftalat
Ph.....	fenil
PTC.....	fazni transfer katalizator
<i>p</i> -TsOH.....	<i>p</i> -toluensulfonska kiselina
R.....	alkil
RX.....	alkil-halogenid
<i>t</i> -Bu.....	<i>terc</i> -butil
THF.....	tetrahidrofuran
TLC.....	tankoslojna hromatografija
TPP.....	trifenilfosfin

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	mr Ljubica M. Grbović
Mentor: MN	dr Vera Ćirin-Novta, red. prof. Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Izolovanje, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost naftnih kiselina iz Vojvođanske nafte
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	R Srbija
Uže geog. područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2009.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad; Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3
Fizički opis rada: (broj poglavlja/strana/lit. citata/tabela/slika/shema/priloga) FO	9/170/121/38/100/13/1
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Organska hemija
Predmetna odrednica/ Ključne reči: PO	Naftne kiseline, derivati naftnih kiselina, sinteza uz konvencionalno zagrevanje, mikrotalasno katalizovana sinteza, strukturna analiza, biološka aktivnost
UDK:	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Grupno-strukturna analiza naftnih kiselina izolovanih iz srednjih uljnih komercijalnih frakcija vojvođanske nafte „ <i>Velebit</i> “ rađena je analizom IR-, ¹ H- i ¹³ C NMR- i ESI-MS spektara niske rezolucije. Određeno je šest klasa karboksilnih kiselina opšte molekulske formule C _n H _{2n-2} O ₂ . To su karboksilne kiseline u opsegu masa 240-466 sa 15-31 C atoma u molekulu koje su grupisane u pet cikloalkil Z-serija: monociklična- (C _n H _{2n-2} O ₂ , 14.72%),

biciklična- ($C_nH_{2n-4}O_2$, 34.63%), triciklična- ($C_nH_{2n-6}O_2$, 25.03%), tetraciklična- ($C_nH_{2n-8}O_2$, 10.04%), pentaciklična klasa karboksilnih kiselina ($C_nH_{2n-10}O_2$, 4.99%) i jedna alkanska klasa kiselina sa alkil grupama otvorenog niza ($C_nH_{2n}O_2$, 10.57%).

Razdvajanjem na bazi različite kiselosti i njihove rastvorljivosti u vodi na određenim pH vrednostima u rasponu od pH 2-10 dobijeno je devet užih frakcija kiselina. Ekstrakcijom sa etrom u vodi nerastvornih kiselina u rasponu od po jedne pH jedinice dobijena je sledeća distribucija masa: 9.57% (pH 10), 12.69% (pH 9), 5.91% (pH 8), 4.85% (pH 7), 2.44% (pH 6), 11.71% (pH 5), 23.94% (pH 4), 16.76% (pH 3) i 10.12% (pH 2). Razdvajanjem kiselina na bazi njihove kiselosti oko 50% mase kiselina ekstrahovano je od pH 2-4, znači u grupi jačih kiselina. Masenom spektrometrijom niske rezolucije ESI-MS na pH 4 vidi se da su u smeši kiselina skoncentrisane kiselina sa više prstenova u alkilnom delu sa maksimumom na tricikličnim kiselinama (36.50%), dok su pojedinačno najzastupljenije tetraciklične strukture kiselina $C_{20}H_{32}O_2$ (4.43%) i $C_{21}H_{34}O_2$ (4.56%). Na pH 8 biciklične- i triciklične strukture su zastupljene ukupno sa 65.02% sa maksimalno zastupljenim kiselinama sa 20-26 C atoma u molekulu, a izdvajaju se $C_{22}H_{38}O_2$ (5.26%) biciklične- i $C_{24}H_{42}O_2$ (7.01%) triciklične strukture, a od tetracikličnih struktura kiselina izdvaja se $C_{24}H_{40}O_2$ (4.77%). Na pH 10 najzastupljenije izolovane kiseline su aciklične, odnosno masne kiseline zastupljene sa 25.28%, a najdominantnije su strukture $C_{21}H_{42}O_2$ (4.83%), dok su ostale klase kiselina ujednačene po svom masenom udelu u odnosu na sastav u ukupnoj polaznoj smeši kiselina.

Drugi deo rada obuvata derivatizaciju izolovanih prirodnih naftnih kiselina. Sintetizovani su funkcionalni kiseonični metil-, etil-, *n*-butil-, *terc*-butil- i benzil-derivati naftnih kiselina kao i funkcionalni azotni derivati: amidi i anilidi naftnih kiselina. Sinteze navedenih estara rađene su klasičnim postupcima i modifikovanom metodom esterifikacije u kiselo-katalizovanim uslovima upotrebom mikrotalasa kao ko-katalizatora, što je imalo za cilj skraćenje reakcionog vremena i poboljšanje ekoloških sintetskih uslova.

Modifikacijom sinteze metilnaftenata MT-zagrevanjem 48 puta je skraćeno vreme trajanja sinteze, prinosi ni promenom reakcionih parametara (vreme, snaga MT) nisu bitno promenjeni. Strukturnom analizom ESI-MS spektra polaznih kiselina i metilnaftenata dobijenih metilovanjem naftnih kiselina utvrđeno je da je odnos klasa u dobroj podudarnosti. Prinos estara u ovoj sintezi je 95.47%. Esterifikacija naftnih kiselina etil alkoholom rađena je u uslovima kisele katalize uz konvencionalno zagrevanje (91.76%), a modifikacijom metode MT-zagrevanjem (150 W) reakciono vreme je skraćeno 96 puta (92.19%). Esterifikacija naftnih kiselina *n*-butil alkoholom rađena je uz sumpornu kiselinu kao katalizator i uz konvencionalno zagrevanje (94.24%), a u uslovima MT-zagrevanja (150 W) 72 puta je skraćeno reakciono vreme (61.15%). Sinteza *terc*-butilnaftenata rađena je prevođenjem naftnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa *terc*-butil alkoholom nastaju *terc*-butilnaftenati (80.17%). Modifikovanom metodom klasične reakcije esterifikacije naftnih kiselina *terc*-butil alkoholom katalizovanom sumpornom kiselinom u uslovima MT-zagrevanja (150 W) ostvaren je prinos od 85.49% a vreme trajanja reakcije je 5 minuta. Sinteza benzilnaftenata rađena je prevođenjem naftnih kiselina u hloride a zatim reakcijom sa benzil alkoholom nastaju benzilnaftenati (84.43%), a modifikovanom metodom klasične kiselo-katalizovane esterifikacije naftnih kiselina benzil alkoholom u uslovima MT-zagrevanja (150 W) ostvaren je prinos od 85.49% uz reakciono vreme od 5 minuta.

Sinteza amida naftnih kiselina rađena je iz hlorida reakcijom sa amonijakom. Prinos čistih amida je 65.74%, a reakcija amidacije sa amonijakom trajala je 15 minuta. Strukturnom analizom ESI-MS spektra amida naftnih kiselina utvrđen je grupno-strukturni sastav amida. Među strukturama amida naftenskih kiselina takođe su dominantne biciklične- i triciklične strukture, kao i u smeši slobodnih kiselina. Sinteza anilida naftnih kiselina rađena je iz hlorida

reakcijom sa anilinom. Prinos čistih anilida je 96.48%, a reakcija amidacije anilinom trajala je 30 minuta. Strukturnom analizom ESI-MS spektra anilida naftnih kiselina utvrđen je grupno-strukturni sastav proizvoda, anilida. Među strukturama anilida naftenskih kiselina takođe su dominantne biciklične- i triciklične strukture kao i u smeši slobodnih kiselina.

U trećem delu ovog rada ispitivana je biološka aktivnost naftnih kiselina auksinskog i giberelinskog tipa, njihov uticaj na ožiljavanje reznica, ukorenjivanje bočnih grana i mikroizdanaka biljaka, na aktivnost biljnih hormona, kao i na usvajanje metalnih jona kod biljaka.

Aktivnost naftenskih kiselina utvrđena je pomoću tri *in vitro* biološka testa. „*Koleoptil test*“, rađen je na dva supstrata, odnosno na semenu ozime pšenice novosadske sorte *Partizanka* i jare pšenice takođe novosadske sorte *Venera*. Referentna aktivnost u testu rađena je sa α -naftilsirćetnom 3-indolsirćetnom kiselinom. U oba testa ustanovljen je približno isti odnos aktivnosti rastvora naftenskih kiselina i aktivnosti standardnih biljnih hormona. „*Test inhibicije klijanja*“ semena rađen je sa semenom crne slačice, *Brassica nigra*. Najveći uticaj naftenskih kiselina na inhibiciju klijanja postignut je u rasponu koncentracija kiselina od 10^{-7} - 10^{-8} mol/L (0.05-0.01 mg/L). Testovi za šest užih frakcija dobijenih iz smeše ukupnih kiselina razdvajanjem na bazi različite rastvorljivosti pri različitim pH vrednostima pokazuju istu aktivnost kao 3-indolsirćetna kiselina (0.5 mg/L), a da je frakcija izdvojena iz vodenog rastvora na pH 7 takođe aktivna ali u poređenju sa 3-indolsirćetnom kiselinom to je 10 puta niža aktivnost. Hormonska aktivnost giberelinskog tipa ispitivanih kalijumovih soli naftenskih kiselina utvrđena je „*Endosperm testom*“, u kojem je određivana aktivnost amilaze spektrofotometrijskim praćenjem povećanja koncentracije redukujućih šećera u endospermu semena tretiranog ječma i poređena sa aktivnošću rastvora giberelinske kiseline (GA_3). Rezultati ovih testova pokazuju da delovanjem vodenih rastvora užih frakcija naftenskih kiselina u koncentraciji 1.0 mg/L (3.5×10^{-6} mol/L) frakcija izolovana pri pH 8 ima aktivnost koja je približno u opsegu aktivnosti giberelina koncentracije 10^{-2} - 10^{-3} mg/L.

Natrijum-naftenati u koncentraciji od 10^{-6} do 10^{-8} mol/L stimulišu formiranje adventivnih korenova kod reznica suncokreta pa je broj korenova po biljci 40 puta veći kod biljaka koje su bile potopljene u rastvor natrijum-naftenata u odnosu na one koje su bile potopljene u vodu, a sličan efekat utvrđen je i pri tretiranju bočnih grana suncokreta.

Ožiljavanje drvenastih biljaka rađeno je na reznicama bele topole (*Populus alba*) i reznicama američke crne topole (*Populus deltoides*). Uočen je jasan inhibitorni efekat na rast korenčića i izbojka u vodenom medijumu sa 10^{-4} mol/L naftenskih kiselina, dok je tretman od 24 časa doprineo većem broju korenčića na donjih 5 cm reznice, kao i ukupnog broja korenčića nego kod kontrole.

U testu ukorenjivanja mikroizdanaka kod hrizantema najveći broj korenova dobijen je nakon tretmana sa rastvorom koji sadrži 10 μ mol/L ukupnih naftenata i tretmanom sa 50 μ mol/L frakcijom kiselina izolovanom pri pH 7. Oba rezultata su na nivou aktivnosti 3-indolbuterne kiseline koncentracije 10 μ mol/L što znači da u ovom slučaju frakcionacija nije neophodna.

Efekti natrijum-naftenata na ukorenjivanje praćeni su merenjem nivoa totalnih peroksidaza i amilaze, kao i sadržaja redukujućih šećera i ukupnih proteina u bazalnim delovima reznica bagrema (*Rozaszin-AC*). Nakon 1; 3 i 6 dana reznice su uzete za biohemijske analize. U svakom slučaju, aktivnosti IAA-oksidade i amilaze su se povećavale do trećeg dana, a zatim smanjuju. Efekat je bio jače izražen posle tročasovnog tretmana sa natrijum-naftenatima u poređenju sa šestočasovnim tretmanom i kontrolom. Sadržaj rastvornih proteina je bio povećan jedan dan posle tretmana, smanjen trećeg i ponovo

	<p>povećan šestog dana, osim za šestočasovni tretman natrijum-naftenatima, kada je efekat bio sasvim suprotan.</p> <p>Test uticaja naftnih kiselina na nivo kadmijuma u biljkama pokazuje fiziološko delovanje naftnih kiselina na snižavanje nivoa teških metala u biljci, u ovom slučaju kadmijuma. Ispitivan je efekat niske koncentracije natrijum-naftenata (10^{-7} mol/L) na ukupan sadržaj Cd u pojedinim frakcijama interćelijskog prostora kao i unutar ćelija, kao i na neke fiziološke i biohemijske parametre kod mladih biljaka soje koje su uzgajane u prisustvu kadmijum-hlorida koncentracije 1 mmol/L. Prisustvo naftenata smanjuje sadržaj ukupnog kadmijuma kako u korenu tako i u stablu i listovima u proseku za oko 40% i ublažava štetne efekte kadmijuma na aktivnost nitrat-reduktaze kao i na sadržaje fotosintetskih pigmenata.</p> <p>Tretman biljaka niskim koncentracijama natrijum-naftenata utiče na akumulaciju nekih esencijalnih elemenata kod mladih biljaka soje. Prisustvo naftenata (10^{-7} mol/L) značajno povećava sadržaj Mn, Fe, Zn i Ni u korenu, ali u stabljici i listovima samo sadržaj Fe i Mn. U korenu, sadržaj Mn je četiri puta veći a sadržaji Fe, Zn i Ni su povećani 17%, 60% i 68%, respektivno.</p> <p>Ispitivanja na celeru i mrkvi su potvrdila da uticaj naftenata na mineralnu ishranu zavisi od primenjenog elementa i da je način preuzimanja određenih jona različit, što ima za posledicu ili povećanje ili smanjenje sadržaja pojedinih jona u nekim delovima biljaka. Mlade biljke celera i mrkve, gajene u hranljivom medijumu, tretirane su natrijumovim solima naftenskih kiselina (10^{-7} mol/L) folijarno ili prisustvom u hranljivom medijumu. Jedino je tretman putem prisustva naftenata u hranljivom medijumu smanjio svežu masu korena i nadzemnog dela oko 20% kod obe biljke. Oba tretmana uticala su na sadržaj Fe, Cu, Mn, Mg i Ca kod biljaka celera i Fe, Mn, Zn i Na kod biljaka mrkve. Kod biljaka celera došlo je do smanjenja sadržaja navedenih nutrienata dok je u korenu biljaka mrkve došlo do povećanja sadržaja Fe za 45%, Mn za 70% i Zn za 37%. Kod ovih biljaka prisustvo naftenata u hranljivom medijumu dovelo do smanjenja mase korenova i nadzemnih delova, što je potpuno suprotno od rezultata dobijenih kod biljaka soje. Folijarnim tretmanom je značajno povećana masa nadzemnog samo kod celera.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	20.11.2003.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet) KO	
Predsednik: Član: Član: Član:	dr Ksenija Kuhajda, red. prof. Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu dr Vera Ćirin-Novta, red. prof. Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu dr Slavko Kevrešan, red. prof. Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu dr Katarina Penov-Gaši, red. prof. Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monography document
Type of record: TR	Printed text
Contents Code: CC	Phd Thesis
Author: AU	mr Ljubica M. Grbović
Mentor: MN	dr Vera Ćirin-Novta, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Title: XI	Isolatin, structural characterization and biological activity of naphthenic acids from Vojvodina oil
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian (latin)/English
Country of publication: CP	R Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2009.
Publisher: PU	Author's reprint
Publ. place: PP	Novi Sad; Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Physical description: (chapters/pages/literature/ tables/pictures/schemes/ additional lists) PD	9/170/121/38/100/13/1
Scientific field: SF	Chemistry
Scientific discipline: SD	Organic Chemistry
Subject/Key words: S/KW	Naphthenic acids, derivatives of naphthenic acids, synthesis by conventional heating, microwave catalysed synthesis, structural analysis, biological activity
Holding data: HD	Department of Chemistry (library), Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Note: N	
Abstract: A	Group-structural analysis of naphthenic acids isolated from middle commercial fractions of Vojvodina oil „Velebit” was performed with the analysis of IR-, ¹ H- and ¹³ C NMR- and ESI-MS low resolution spectrums. Six classes of carboxylic acids of the general molecular formula C _n H _{2n-Z} O ₂ were determined. These are carboxylic acids with mass range of 240-466 with 15-31 C atoms in molecule which are grouped in five cycloalkyl

Z-series: monocyclic- ($C_nH_{2n-2}O_2$, 14.72%), bicyclic- ($C_nH_{2n-4}O_2$, 34.63%), tricyclic- ($C_nH_{2n-6}O_2$, 25.03%), tetracyclic- ($C_nH_{2n-8}O_2$, 10.04%), pentacyclic class of carboxylic acids ($C_nH_{2n-10}O_2$, 4.99%) and one alyphatic class of acids with open chain alkyl groups ($C_nH_{2n}O_2$, 10.57%).

By fractioning on the basis of different levels of acidity and their solubility in water with pH values ranging from pH 2-10 nine subfractions of acids were obtained. By extraction with ether in water undissolved acids in the range of one pH unit the following distribution of mass was performed: 9.57% (pH 10), 12.69% (pH 9), 5.91% (pH 8), 4.85% (pH 7), 2.44% (pH 6), 11.71% (pH 5), 23.94% (pH 4), 16.76% (pH 3) and 10.12% (pH 2). By fractioning acids on the basis of their acidity about 50% of acid mass was extracted at pH 2-4, i.e., in the group of stronger acids. Low resolution mass spectrometry ESI-MS shows that at pH 4 acids with more rings in the alkyl section were concentrated in the mixture with maximum at tricyclic acids (36.50%), while individually tetracyclic acid structures $C_{20}H_{32}O_2$ (4.43%) and $C_{21}H_{34}O_2$ (4.56%) were most prominent. At pH 8 bicyclic- and tricyclic structures are represented together by 65.02% with acids with 20-26 C atoms in molecule being represented the most, and $C_{22}H_{38}O_2$ (5.26%) bicyclic- and $C_{24}H_{42}O_2$ (7.01%) tricyclic structures stand out, while with tertacyclic acid structures $C_{24}H_{40}O_2$ (4.77%) stands out. At pH 10 most represented isolated acids are acyclic, i.e., fatty acids which are represented by 25.28%, with the most dominant $C_{21}H_{42}O_2$ structures (4.83%), while the other classes of acids are well balanced in their mass share in relation to the composition of the overall initial acid mixture.

The second part of this work deals with derivatization of the isolated natural naphthenic acids. Functional oxygen methyl-, ethyl-, *n*-butyl-, *tert*-butyl and benzyl-derivatives of naphthenic acids as well as functional nitrogen derivatives: amides and anilides of naphthenic acids were synthesized. The syntheses of the above mentioned esters were performed by conventional methods and by a modified method of esterification in acid-catalyzed conditions using microwaves as a co-catalyst with the aim of shortening the reaction time and improving the ecological synthetic conditions.

By modification of methyl naphthenates synthesis using MT-heating the time period for synthesis is reduced 48 times and the yield does not significantly change even after the reaction parameters (time, MT power) have been altered. Using structural analysis of ESI-MS spectrum of initial carboxylic acids and the methyl naphthenates obtained through methylation of naphthenic acids it was established that the class ratio shows great compatibility. The esters yield in this synthesis is 95.47%. The esterification of naphthenic acids with ethyl alcohol done under the conditions of acid catalysis with conventional heating (91.76%), and with the modified method MT-heating (150 W) the reaction time is reduced 96 times (92.19%). The esterification of naphthenic acids with *n*-butyl alcohol was performed using sulphuric acid as a catalyst with conventional heating (94.24%), and under MT-heating conditions (150 W) reaction time was 72 times shorter (61.15%). The synthesis of *tert*-butyl naphthenates was performed by conversion of naphthenic acids into chlorides, followed by the reaction with *tert*-butyl alcohol which resulted in *tert*-butyl naphthenates (80.17%). By the modified method of conventional reaction of esterification of naphthenic acids using *tert*-butyl alcohol catalysed with sulphuric acid in MT-heating conditions (150 W) the yield was 85.49% and reaction time was 5 minutes. The synthesis of benzyl naphthenates was performed by conversion of naphthenic acids into chlorides, followed by a reaction with benzyl alcohol which produces benzyl naphthenates (84.43%), whereas the modified method of conventional acid-catalysed esterification of naphthenic acids using benzyl alcohol under MT-heating (150 W) conditions the yield was 85.49% with the reaction time of 5 minutes.

The synthesis of naphthenic acid amides was done from chlorides by reaction with ammonia. The yield of pure amides was 65.74%, and the reaction of amidation with ammonia lasted for 15 minutes. The structural analysis of ESI-MS spectrum of naphthenic acid amides determined the group-structural composition of amides. With the structures of amides of naphthenic acids bicyclic- and tricyclic structures are also dominant, as in the mixture of free acids. The synthesis of naphthenic acid anilides were performed from chloride by reacting with aniline. The yield of pure anilides was 96.48%, and the reaction of amidation lasted for 30 minutes. The structural analysis of ESI-MS spectrum of naphthenic acid anilides determined the group-structural composition of anilide products. With the structures of anilides of naphthenic acids bicyclic- and tricyclic structures are also dominant, as in the mixture of free acids.

The third part of this work tests the biological activity of naphthenic acids of auxine and gibberellinic type, their influence on the rooting of cuttings, lateral branches and microshoots of plants, on the activity of plant hormones as well as on the metal ions uptake by plants.

The activity of naphthenic acids was determined using three *in vitro* biological tests. „*Koleoptil test*“, was done on two substrates, namely the seed of winter wheat of the *Partizanka* sort and the spring wheat of the *Venera* sort. The referential activity in the test was performed with α -naphthylacetic- and 3-indolacetic acid. Both tests showed approximately the same ratio of activity of naphthenic acid solutions and standard plant hormones. „*Germination Inhibition Test*“ of the seed was performed using *Brassica nigra* seed. The greatest influence of naphthenic acids to germination inhibition was achieved in the acid concentration ranging from 10^{-7} - 10^{-8} mol/L (0.05-0.01 mg/L). The tests for six narrow fractions obtained from the overall mixture of acids through fractioning on the basis of different solubility at different pH values show the same activity as 3-indolacetic acid (0.5 mg/L), with the fraction isolated from the aqueous solution at pH 7 also active but in comparison to 3-indolacetic acid this activity was 10 times lower. Hormone activity of gibberellinic type of the potassium salts of naphthenic acids was determined using „*Endosperm Test*“ where amylase activity was determined by spectrophotometric measuring of the increase of the concentration of reducing sugars in endosperm in the treated barley seed which was then compared to the activity of the gibberellic acid solution (GA₃). The results of these tests indicate that the activity of aqueous solutions of narrow fractions of naphthenic acids in the concentration of 1.0 mg/L (3.5×10^{-6} mol/L) the fraction isolated at pH 8 has the activity which is approximately within the range of activities of gibberellin of the concentration of 10^{-2} - 10^{-3} mg/L.

Sodium salts of naphthenic acids in concentrations of 10^{-6} do 10^{-8} mol/L stimulated formation of adventitious roots in sunflower cuttings even by a factor of 40 compared with control, the effect being also observed lateral branches of interspecies sunflower hybrids. The obtained results suggest the possibility of using naphthenic acids as a means for rooting of plant cuttings.

Rooting of hardwood plants was investigated on the cuttings of white poplar (*Populus alba*) and black poplar (*Populus deltoides*). The distinct inhibitory effect on the root and shoot growth in water culture was detected in the concentration of naphthenic acids 10^{-4} mol/L, but 24-hour treatment raised the number roots on undermost 5 cm of the cutting, as well as the total number of roots, comparing to the control.

In the test of rooting microshoots of chrysanthemum the highest number of

	<p>roots was achieved after the treatment with solution containing 10 µmol/L of total naphthenates, as well as after the treatment with fraction of naphthenic acids which was isolated at pH 7 in concentration of 50 µmol/L. Both results are on the level of activity of 3-indolbutyric acid in concentration of 10 µmol/L which suggests that in this case fractionation is not necessary.</p> <p>The effects of sodium naphthenates on rooting were investigated by measuring the level of total peroxidases and amylase, along with the contents of reducing sugars and total proteins in basal parts of cuttings of black locust (<i>Rozaszin-AC</i>). After 1; 3 and 6 days cuttings were taken for biochemical analysis. In all cases, the activities of IAA-oxidase and amylase increased to the third day and showed a decrease afterwards. The effect was more pronounced after the three-hour treatment with sodium naphthenates, compared to the six-hour treatment and control. The content of soluble proteins increased one day after the treatment and decreased to the third and again increased to the sixth day, an exception being the six-hour treatment with sodium naphthenate, when the effect was completely opposite.</p> <p>The test of naphthenic acids influence on the level of cadmium in plants showed physiological activity of naphthenic acids on the decrease of the level of heavy metals, in this case cadmium, in the plant. The effect of low concentrations (10^{-7} mol/L) of sodium naphthenate on total content of Cd in the intercellular space and inside cells, as well as on some physiological and biochemical parameters of young soybean plants grown in the presence of 1 mmol/L solution of cadmium chloride was investigated. Presence of naphthenate reduced in average by 40 % content of total and intracellular Cd in root, stem and leaves and alleviated the harmful effect of Cd on activity of nitrate reductase and content of photosynthetic pigments.</p> <p>Treatment of soybean plants with low concentrations of sodium naphthenate influenced the accumulation of some essential elements by the young plants. The presence of naphthenates (10^{-7} mol/L) significantly increased content of Mn, Fe, Zn and Ni in root, but in stem and leaves increased only contents of Fe and Mn. In root, the content of Mn increased four times while contents of Fe, Zn and Ni increased by 17%, 60% and 68% respectively compared to the control.</p> <p>Investigations on celery and carrot confirmed that the influence of naphthenates on mineral nutrition depends on the applied element and that the way of uptake of certain ions is different, which results in either increase or decrease of the contents of some ions in certain parts of plants. Young plants of celery and carrot, were grown in the nutrient medium and treated with sodium salts of naphthenic acids (10^{-7} mol/L) over the leaves or with its presence in the nutrient medium. Only the treatment based on the presence of naphthenates in the nutrient medium resulted in the decrease of the fresh mass of root and aboveground part by about 20% for both plants. Both treatments had influence on the content of Fe, Cu, Mn, Mg and Ca in the plants of celery and Fe, Mn, Zn and Na in the plants of carrots. In the plants of celery the content of the mentioned nutrients was decreased, while in the root of plants of carrot the content was increased, Fe by 45%, Mn by 70% and Zn by 37%. With these plants the presence of naphthenates in the nutrient medium caused the reducing roots and aboveground parts, which is completely opposite from the results obtained with soybean plants. The treatment by leaves significantly increased the mass of aboveground part only with celery.</p>
<p>Accepted by the Scientific Board on: ASB</p>	<p>20.11.2003.</p>

Defended: DE	
Thesis defends board: (Degree/name/ surname/title/faculty) DB	
President:	dr Ksenija Kuhajda, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member:	dr Vera Ćirin-Novta, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member:	dr Slavko Kevrešan, Full Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad
Member:	dr Katarina Penov-Gaši, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

BIOGRAFIJA



Ljubica (Radić) Grbović je rođena 19.03.1969. godine u Osijeku, od majke Emilije i oca Milomira. Osnovnu školu je završila u Kneževim Vinogradima, prva dva razreda srednje škole završila je u Osijeku a treći i četvrti razred srednje medicinske škole (smer farmaceutski tehničar) u Somboru.

Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, grupa hemija, je upisala 1987. godine, a diplomski rad pod nazivom „Sinteza 6-hidroksi-ekvilena” odbranila je 1992. godine.

U zvanje stručnog saradnika na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu izabrana je 1994. godine a u zvanje asistenta-pripravnika izabrana je 1995. godine. Magistarske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, grupa hemija, upisala je 1994. godine, a magistarsku tezu pod nazivom „2,5-Anhidro-šećeri kao intermedijeri u sintezi (+)-muskarina i analoga” odbranila je 1999. godine. Iste godine stiče zvanje asistenta.

Od 1996. do 2000. godine angažovana je na projektu Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije „Sinteza i fizičko-hemijska ispitivanja biološki aktivnih jedinjenja i njihovih analoga”, a od 2001. do 2005. godine angažovana je na projektu „Sinteza potencijalnih citotoksičnih agenasa, antihormona, enzimskih inhibitora i stimulatora rasta”, Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije. Trenutno je angažovana na projektu „Sinteza odabranih biološki aktivnih molekula i analoga od potencijalnog interesa za biomedicinu i agronomiju” koji finansira Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Naučno-istraživački rad mr Ljubice Grbović obuhvata dve naučne oblasti i to su hemija monosaharida i hemija nafte. U oblasti hemije monosaharida se bavi sintezom biološki aktivnih jedinjenja tipa (+)-muskarina i njegovih analoga. Iz te oblasti uradila je magistarski rad i objavila pet naučnih radova i sa tri rada učestvovala je na domaćim i internacionalnim naučnim skupovima hemičara. Druga naučno-istraživačka oblast spada u interdisciplinarna istraživanja hemije nafte i bavi se izolovanjem, identifikacijom, derivatizacijom i određivanjem biološke aktivnosti prirodnih naftnih kiselina i njihovih sintetskih derivata. U toj oblasti hemije nafte je prijavila doktorsku disertaciju i do sada je publikovala deset naučnih radova, dve patentne prijave i sa sedamnaest saopštenja je učestvovala na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima.

Osim u naučno-istraživačkom radu, angažovana je i u izvođenju nastave na Katedri za organsku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Od 2004. do 2006. godine angažovana je i na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu na izvođenju vežbi iz predmeta Organska hemija II za studente farmacije.