

CZU: [544.222.3:544.4]:577.334

[https://doi.org/10.59295/PRTEP2023\\_07](https://doi.org/10.59295/PRTEP2023_07)

## 7. CERCETAREA COMPUTAȚIONALĂ A ACIDULUI DIHIDROXIFUMARIC ȘI A DERIVAȚILOR ACESTUIA CU ACTIVITATE ANTIOXIDANTĂ

Natalia BOLOCAN, Gheorghe DUCA

*Institutul de Chimie, Universitatea de Stat din Moldova*

**Rezumat.** Capitolul de față descrie aplicarea metodelor computaționale în cercetarea proceselor de izomerizare/tautomerizare a acidului dihidroxifumaric (DHF), pentru calculul indicilor de reactivitate globală și locală a derivaților noi ai DHF, pentru demonstrarea validității procedurii KID în gaz, apă și metanol. În cadrul cercetării de față, a fost efectuată în premieră analiza predictivă prin metode de calcul a proprietăților de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate a derivaților cercetați, care au demonstrat proprietăți similare medicamentului. Au fost construite radarele de biodisponibilitate a substanțelor cercetate, demonstrând proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor. De asemenea, pentru prima dată, utilizând metoda andocării moleculare, a fost demonstrat potențialul semnificativ de inhibiție a proteazei principale a virusului SARS-CoV-2 de către toți compușii supuși studiului. **Cuvinte cheie:** acid dihidroxifumaric, activitate antioxidantă, DFT, indici de reactivitate, ADMET, andocare moleculară.

### **COMPUTATIONAL RESEARCH OF DIHYDROXYFUMARIC ACID AND ITS DERIVATIVES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY**

**Summary.** *The present chapter describes the application of computational methods in the research of the isomerization/tautomerization processes of dihydroxyfumaric acid (DHF), for the calculation of global and local reactivity indices of new derivatives of DHF, for the demonstration of the validity of the KID procedure in gas, water and methanol. In the present research, the predictive analysis was performed for the first time by calculation methods of the properties of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of the investigated derivatives, which demonstrated *эпыуак ккгндшлутуыы*. Bioavailability radars of researched substances have been constructed, demonstrating significantly drug-like properties. Also, for the first time, using the molecular docking method, the significant inhibition potential of the main protease of the SARS-CoV-2 virus by all the compounds under study was demonstrated.*

**Keywords:** *dihydroxyfumaric acid, antioxidant activity, DFT, reactivity indices, ADMET, molecular docking.*

## 1. ACIDUL DIHIDROXIFUMARIC: *Transformări Chimice, Particularități, Importanța în Organismele Vii și Procese Tehnologice*

Descoperirea posibilităților de prevenire a bolilor, în special a celor corelate direct cu cantitățile sporite de radicali liberi, prezintă un interes deosebit nu doar pentru comunitatea științifică, dar și pentru publicul larg. Acest interes este cauzat, în primul rând, de faptul că stresul oxidativ [1] este corelat cu o incidență mărită a bolilor degenerative, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, cataracta, bolile ficatului, inflamații, insuficiența renală ș.a. [2]. O altă direcție semnificativ influențată de formarea radicalilor liberi, la fel de importantă și strâns legată de sănătatea omului, este industria alimentară, cele mai susceptibile produse fiind carnea, mezelurile, uleiurile vegetal, lactatele și produsele de panificație [3].

În acest context, trebuie subliniată importanța cercetărilor referitor la obținerea și cercetarea derivaților cu caracteristici antioxidante/antiradicalice pe bază de DHF, lărgind astfel baza compușilor cu potențial aplicativ în ramurile industriei ce au impact direct asupra sănătății omului și a calității vieții.

Denumirea conform IUPAC [4] a acidul dihidroxifumaric este acidul (*E*)-2,3-dihidroxi-but-2-enedioic, acesta fiind un *trans*-dihidroxiacid dicarboxilic, care se obține din acid tartric prin dehidrogenare lentă sau procese de oxidare. În soluție, DHF există în două forme tautomerice aflate în echilibru dinamic, iar concentrația formelor tautomerice depinde de pH-ul soluției [5,6].

DHF are un rol important în natura vie, fiind un cunoscut intermediar în ciclurile acizilor di- și tricarboxilici [5], la fel ca și mulți alți hidroxiacizi, precum acizii malic, lactic, glicolic, citric, tartric. Fragmentul enediolic din structura acidului dihidroxifumaric este similar celui din acidul ascorbic și, prin urmare, în oxidarea biologică acesta poate juca un rol similar cu cel al ascorbatului, și anume de transportor intermediar al hidrogenului de la substraturi la oxigen [6].

Interesul față de acidul dihidroxifumaric a sporit în ultimul deceniu, grație faptului că cercetările privind originea vieții pe Pământ efectuate în cardul chimiei prebiotice din ultimii decenii, susțin ideea așa-numitului „scenariului glioxalic” postulat de Eschenmoser [7]. Conform acestei ipoteze, glioxalul și dimerul acestuia, DHF, sunt priviți ca molecule centrale de la care a pornit sinteza moleculelor biogene în „bulionul primordial” din care a apărut viața [8].

În sinteza organică, pe lângă aplicații la sinteza de molecule mici, autorii [9] atestă posibilitatea implementării DHF în sinteza totală. De exemplu, scheletul dimerului liniar al DHF se regăsește în produse naturale complexe, cum ar fi acizii zaragozici (squalostatine) [10].

Pe lângă importanța DHF în metabolismul organismelor vii și sinteza organică, interesul din perspectiva chimiei prebiotice, trebuie menționată și importanța acestui acid în

industria alimentară [11], în special în oenologie, contribuind semnificativ la formarea calității vinurilor [12].

Sub acțiunea DHF are loc micșorarea conținutului agenților de nitrozare, ceea ce duce la reducerea conținutului N-nitrozaminelor, substanțe puternic cancerigene, ce se pot forma în prezența aminelor în timpul fermentării diferitelor alimente și tutunului de țigări, precum și prin reacția *in vivo* a nitriților (utilizați în calitate de conservanți în alimente) cu amine, în condițiile acide din tractul gastro-intestinal [13].

Cercetările expuse în acest capitol sunt axate pe completarea și aprofundarea studiilor legate de acidul dihidroxifumaric și derivații noi ai acestuia cu caracteristici antioxidante. O atenție deosebită îi revine utilizării metodelor computaționale pentru înțelegerea datelor empirice obținute în cadrul cercerărilor experimentale anterioare, precum și pentru prezicerea proprietăților farmaco-cinetice, toxicității și biodisponibilității substanțelor cercetate. Pentru prima dată au fost modelate computațional interacțiunile cu proteaza principală a virusului SARS-CoV-2.

## 2. STUDII COMPUTAȚIONALE ALE PROCESELOR DE IZOMERIZARE ȘI TAUTOMERIZARE A ACIDUL DIHIDROXIFUMARIC

Metodele computaționale ce permit modelarea moleculară prezintă o aplicabilitate extinsă în domeniul sistemelor chimice, fizice, biologice, întrucât acestea sunt capabile să prezică nu numai proprietățile substanțelor în procesul de reacție, dar sunt foarte utile și pentru studiul transportorilor de medicamente, precum și în interacțiunile dintre aceste substanțe și molecule biologice [14].

În pofida interesului de care se bucură recent DHF și a potențialului său de utilitate practică în diverse domenii, până în prezent nu au existat investigații teoretice publicate cu privire la izomeria conformațională a DHF. Grație structurii sale, în cazul DHF, sunt posibile diferite conformații pentru cele două forme tautomerice, datorită rotațiilor intramoleculare de-a lungul legăturilor simple C–C și datorită posibilei orientări *syn*- și *anti*- periplanare a hidroxil hidrogenului față de ceto-oxigen.

Structurile geometrice ale tuturor tautomerilor-rotamerilor posibili ai DHF și stările de tranziție corespunzătoare au fost optimizate fără constrângeri de simetrie la nivelul teoriei B3LYP, separat. Toate calculele au fost efectuate folosind pachetul de chimie cuantică ORCA.

Frecvențele vibraționale armonice calculate au arătat existența a 22 de structuri enediolice și 23 de structuri cetonice ale DHF în punctele staționare în faza gazoasă. Izomerii enediolici au fost notați prin E1–E22 iar formele cetonice prin K1–K23.

Energia electronică (*E*), entalpia (*H*) și energia Gibbs (*G*) ale fiecărui conformer au fost calculate la 298,15 K *in vacuo*, în apă și în metanol. Rezultatele arată că formele enediolice

ale DHF sunt mai stabile decât formele cetonice. Structura enediolului E1 a DHF este cea mai stabilă formă și această stabilitate poate fi atribuită prezenței efectului legăturii de hidrogen intramoleculare, prezentă în structura E1 mai mult decât în altele, precum și stabilizării interacțiunilor orbitalilor datorită orientării *anti*-periplanare a hidroxil hidrogenului față de ceto-oxigen. În apă, cel mai stabil izomer este E2, iar în metanol - E3.

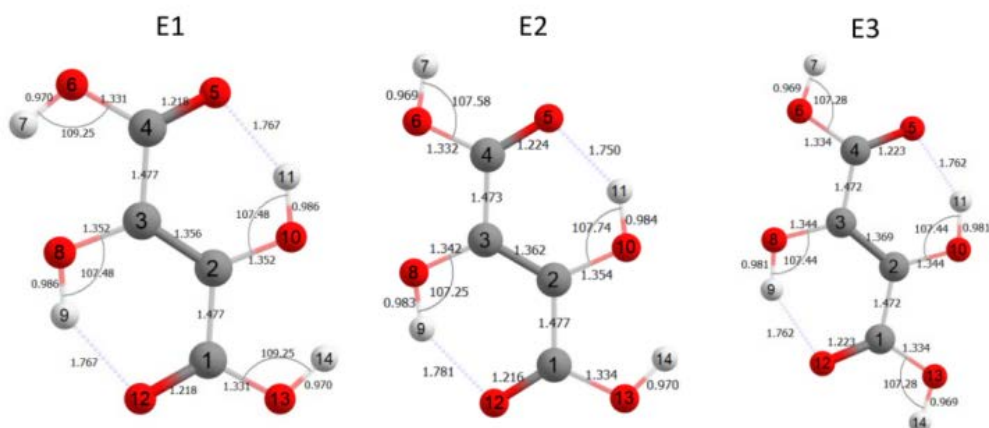
Rezultatele calculelor utilizând ecuația Boltzmann arată că în fază gazoasă, 99,78% din DHF sunt reprezentate de trei structuri enediolice (Figura 1), după următoarea distribuție: izomerul cel mai stabil E1 reprezintă 87,4%, urmat de izomerul E2 cu o abundență relativă de 10,98%, apoi izomerul E3 cu un indice de abundență relativă de 1,4%. În apă, distribuția izomerilor este diferită, și anume: E1 - 31,8%; E2 - 38,4% și E3 - 27%, cu un total de 97,2%. În metanol, distribuția izomerilor este următoare: E1 - 23,7%; E2 - 29,8% și E3 - 43,8%, cu un total de 97,3%.

Atât *in vacuo*, cât și în apă și în metanol, structurile enediolice ale DHF sunt preponderent complet plane, cu excepția structurilor E20 și E22, care suferă de repulsie atom-atom. Această planaritate a structurilor enediolului este probabil o consecință a interacțiunilor intramoleculare dintre grupările -OH enolice și C=O sau -OH ale grupărilor carboxilice care conduc la delocalizarea electronilor în moleculă.

Cercetările ulterioare s-au axat pe procesele de izomerizare și tautomerizare ceto-enolică a celor mai stabile trei structuri enediolice, fiind inițial identificate toate structurile de tranziție caracteristice pentru interconversiile ceto-ceto și enediol-enediol. Interconversiile dintre formele de enediol și dintre formele cetonice au loc atât prin transferul de proton, cât și prin rotație internă (rotație C-C și O-H. În transformările enediol-enediol, energiile de activare ale transferului de proton sunt în intervalul 135-160 kJ·mol<sup>-1</sup> iar pentru calea de rotație sunt în intervalul 5-75 kJ·mol<sup>-1</sup>. Pentru interconversiile dintre formele cetonice, energiile de activare sunt în intervalul 139-153 kJ·mol<sup>-1</sup> pentru calea de transfer al protonului și de 0,15-52 kJ·mol<sup>-1</sup> pentru rotația internă.

În cazul izomerilor enediolici și cetonici care poartă cel puțin o grupare carboxilică cu hidrogen orientat *syn*-periplanar, există o serie de transformări care au loc pe ambele căi, transfer de protoni și rotație internă, iar aceste interconversii pot fi considerate ca fiind reacții competitive. Cu toate acestea, energiile de activare pentru procesele de transfer de H sunt semnificativ mai mari decât pentru calea de rotație internă. Astfel, pe baza ecuației constantei de viteză Arrhenius, dacă se consideră aceeași valoare a lui A pentru ambele căi, valorile obținute pentru rapoartele  $k_p/k_r$  ( $k_p$  și  $k_r$  sunt constantele de viteză ale transferului de protoni și, respectiv, ale căilor de rotație) sunt aproape de zero la 298,15 K.

Prin urmare, putem concluziona că interconversiile menționate mai sus au loc în fază gazoasă prin căile de rotație internă, iar procesele de transfer de proton nu pot avea loc simultan.



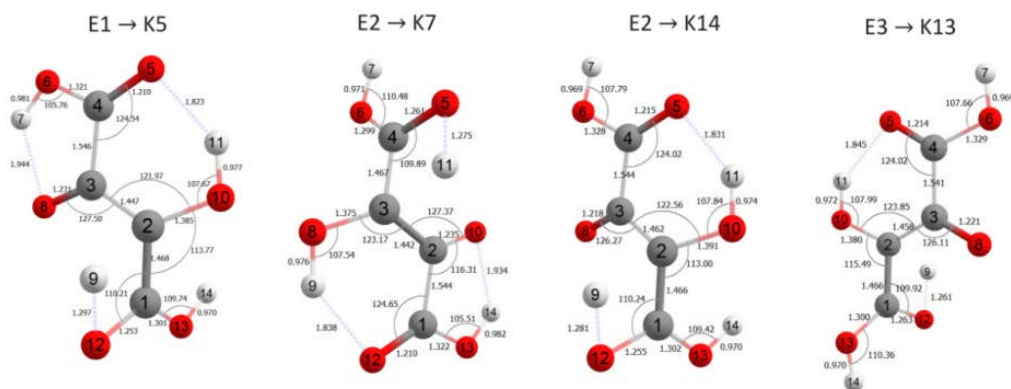
**Fig. 1.** Structurile geometrice optimizate ale celor mai stabile trei structuri enediolice, în vacuo

Conform așteptărilor, rotația internă C–C are frecvența minimă (aproximativ  $-40\text{ cm}^{-1}$ ...  $-100\text{ cm}^{-1}$ ), fiind aproape o vibrație rotațională pură. Frecvența imaginară a reacției de transfer de proton este în jur de  $-1900\text{ cm}^{-1}$ , o frecvență de vibrație de întindere. În cazul rotației O–H, valorile frecvenței imaginare sunt între rotația pură și vibrațiile pure de întindere, de obicei în intervalul  $-200\text{ cm}^{-1}$ ... $-600\text{ cm}^{-1}$ , puțin mai mari în cazul rotațiilor carboxilice O–H. Acest lucru se datorează probabil faptului că există o mulțime de legături/interacțiuni de hidrogen și locuri de delocalizare a electronilor în izomerii DHF, iar rotația unui atom de hidrogen poate rupe o legătură de hidrogen și poate începe formarea unei alte legături de hidrogen.

Prin urmare, rotația O–H are loc în tandem cu o vibrație de întindere, ca rezultat având o frecvență mai mare decât cea pentru vibrația de rotație C–C. Rezultatele calculelor pentru mediul apos arată că frecvențele imaginare pentru rotațiile O–H și C–C sunt mai mici în apă decât în gaz, în timp ce pentru reacțiile de transfer H, frecvențele imaginare sunt mai mari în apă decât în gaz, atât pentru interconversiile enediol-endiol, cât și pentru ceto-ceto izomerizare.

De asemenea, energiile de activare ( $E_a$ ) ale reacțiilor de transfer de hidrogen sunt mai mari în apă, decât în vid, probabil datorită stabilizării structurilor prin legături suplimentare de hidrogen cu moleculele de apă din mediul de solvent implicit.

Tautomerizarea ceto-enolică a fost cercetată pentru cele mai stabile trei structuri enediolice ale DHF care reprezintă 99,78% în faza gazoasă și 97,3% în mediu apos. Structurile de tranziție optimizate în fază gazoasă sunt prezentate în Figura 2.



**Fig. 2.** Structurile geometrice optimizate ale stărilor de tranziție în tautomeria ceto-enolică a celor mai stabili trei izomeri ai DHF, în vid.

Barierile energetice ale procesului de tautomerizare ceto-enolică au fost calculate folosind diferențele de energie dintre structurile minime locale și stările de tranziție. Singura cale prin care poate avea loc tautomerismul ceto-enolic este transferul de proton. Conform așteptărilor, barierele pentru conversiile enediol → cetonă le depășesc pe cele pentru tranziții inverse cetonă → enediol, în gaz și în apă, cu aproximativ  $50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

Energiile de activare pentru tautomeria ceto-enolică sunt de până la 20 de ori mai mari decât cele pentru interconversiile formelor enediol-enediol sau cetonă-cetonă, ceea ce poate fi explicat printr-o mai mare complexitate a mecanismului tautomeriei ceto-enolice, care implică un număr mai mare de atomi, precum și o rearanjare geometrică a moleculei.

De menționat aici că  $E_a$  și  $\Delta G^\ddagger$  (energia liberă de activare Gibbs) sunt mai mici cu 50-80  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  în apă, decât în gaz, ceea ce indică faptul că apa participă în procesul de transfer de H, ușurându-l. Structurile ST arată că oxigenul carboxilic care formează legătura de hidrogen în structura enediolului este implicat în mecanismul transferului de protoni (Figura 2).

Constantele de viteză au fost calculate după teoria canonică a ST, utilizând ecuația Eyring:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (1)$$

unde  $\Delta G^\ddagger$  este energia liberă de activare Gibbs,  $k_B$  este constanta lui Boltzmann, și  $h$  este constanta lui Planck. Astfel, constanta de viteză a reacției directe ( $k_1$ ) a fost calculată utilizând valoarea  $\Delta G^\ddagger_1 = G_{\text{TS}} - G_{\text{reactant}}$ , iar constanta de viteză a reacției inverse ( $k_2$ ) a fost calculată utilizând valoarea  $\Delta G^\ddagger_2 = G_{\text{TS}} - G_{\text{produs}}$ .

Constanta de echilibru  $K_{eq}$  a fost calculată după ecuația:

$$K_{eq} = \exp(-\Delta G / RT) \quad (2)$$

unde  $\Delta G = G_{298}^{produși} - G_{298}^{reactanți}$  și parametrii termodinamici individuali sunt  $G_{298} = H_{298} - TS_{298}$ ,  $H_{298} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} + E_{trans} + ZPE + k_B T$  și  $S_{298} = S_{el} + S_{vib} + S_{rot} + S_{trans}$ . Toate calculele au fost efectuate la 298,15K și 1,0 atm.

Tabelul 1 rezumă datele cinetice și termodinamice pentru stările de tranziție ale reacțiilor de izomerizare și tautomerizare ale celor mai stabile trei forme enediolice, în fază gazoasă și în apă. În faza gazoasă, E1 este specia cea mai stabilă, iar reacțiile de izomerizare E1 ↔ E2 și E2 ↔ E3 sunt caracterizate prin constante de echilibru de 0,13. În apă, izomerul cel mai stabil este E2, iar reacțiile de izomerizare E1 ↔ E2 și E2 ↔ E3 sunt caracterizate prin constante de echilibru de 1,21 și, respectiv 0,61.

**Tabelul 1.**

*Datele cinetice și termodinamice pentru stările de tranziție în procesele de izomerizare și tautomerizare a celor mai stabile trei structuri enediolice, în vid și în apă. Energiile sunt prezentate în kJ·mol<sup>-1</sup> iar constantele de viteză în s<sup>-1</sup>.*

	Izomerie				Tautomerie ceto-enolică							
	E1 ↔ E2		E2 ↔ E3		E1 ↔ K5		E2 ↔ K7		E2 ↔ K14		E3 ↔ K13	
	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă
$\Delta E$	5,18	-0,59	5,24	-0,01	60,67	35,61	57,66	39,97	65,28	35,84	61,54	39,78
$\Delta H$	5,26	-0,53	5,27	0,58	59,55	40,44	56,50	42,57	63,70	35,38	59,77	42,12
$\Delta G$	5,07	-0,48	4,98	1,24	54,84	39,07	51,30	37,42	58,29	35,64	52,99	36,52
$Keq$	0,13	1,21	0,13	0,61	2,46 · 10 <sup>-10</sup>	1,41 · 10 <sup>-7</sup>	10,29 · 10 <sup>-10</sup>	2,73 · 10 <sup>-7</sup>	0,61 · 10 <sup>-10</sup>	5,61 · 10 <sup>-7</sup>	5,21 · 10 <sup>-10</sup>	3,93 · 10 <sup>-7</sup>
$\Delta G^{\#}_1$	47,50	39,9	47,01	40,19	275,13	261,20	272,36	260,72	289,4	270,2	287,50	267,22
$\Delta G^{\#}_2$	42,43	40,4	42,03	38,96	220,29	222,13	220,99	223,29	231,1	234,5	234,51	230,70
$k_1$	2,96 · 10 <sup>4</sup>	6,29 · 10 <sup>5</sup>	3,61 · 10 <sup>4</sup>	55,98 · 10 <sup>4</sup>	3,91 · 10 <sup>-36</sup>	1,01 · 10 <sup>-33</sup>	1,19 · 10 <sup>-35</sup>	1,23 · 10 <sup>-33</sup>	1,22 · 10 <sup>-38</sup>	2,66 · 10 <sup>-35</sup>	2,66 · 10 <sup>-38</sup>	8,96 · 10 <sup>-35</sup>
$k_2$	2,29 · 10 <sup>5</sup>	5,18 · 10 <sup>5</sup>	2,69 · 10 <sup>5</sup>	9,19 · 10 <sup>5</sup>	1,59 · 10 <sup>-26</sup>	71,85 · 10 <sup>-26</sup>	1,19 · 10 <sup>-26</sup>	4,49 · 10 <sup>-27</sup>	1,99 · 10 <sup>-28</sup>	4,70 · 10 <sup>-29</sup>	5,11 · 10 <sup>-29</sup>	2,26 · 10 <sup>-28</sup>

Rezultatele arată că prezența solventului (apa) influențează atât parametrii termodinamici, cât și cinetici. În soluție apoasă,  $\Delta E$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta G^{\#}_1$  și  $\Delta G^{\#}_2$  scad cu aproximativ 2-7 kJ·mol<sup>-1</sup> în reacțiile de izomerizare și cu aproximativ 10-30 kJ·mol<sup>-1</sup> în reacțiile de tautomerism. În faza gazoasă, constantele de echilibru ale transformărilor ceto-enol E1 ↔ K5, E2 ↔ K7, E2 ↔ K14 și E3 ↔ K13 sunt egale cu 2,46·10<sup>-10</sup>, 10,29·10<sup>-10</sup>, 0,61·10<sup>-10</sup> și 5,21·10<sup>-10</sup>, respectiv. În apă, aceste valori sunt de 1,41·10<sup>-7</sup>, 2,73·10<sup>-7</sup>, 5,61·10<sup>-7</sup>, 3,93·10<sup>-7</sup>, respectiv, ceea ce demonstrează o creștere semnificativă a vitezelor reacțiilor directe.

### 3. INDICII DE REACTIVITATE GLOBALĂ ȘI VALIDITATEA TEORIEI KOOPMAN ÎN DFT

Teoria DFT oferă instrumente extraordinare ce permit de a explica calitativ și de a prezice cantitativ reactivitatea chimică globală și locală a moleculelor.

Descriptorii globali măsoară susceptibilitatea totală a unui sistem la diferite tipuri de reacții, de exemplu, atacuri electrofile sau nucleofile, și atribuie o singură valoare întregii molecule.

Cei mai simpli descriptorii de reactivitate globală sunt reprezentați de primul potențial de ionizare  $I$ , definit ca fiind energia necesară pentru a îndepărta un electron dintr-o moleculă, și afinitatea față de electroni,  $A$ , care măsoară capacitatea unei molecule de a accepta electroni și de a forma anioni. Potențialul chimic ( $\mu$ ) reprezintă aciditatea/bazicitatea intrinsecă a lui Lewis a unui sistem și este întotdeauna negativ; electronegativitatea ( $\chi$ ) reprezintă tendința atomilor sau moleculelor de a atrage electroni; electrorigiditatea globală ( $\eta$ ) poate fi definită ca rezistența la transferul de sarcină și este întotdeauna pozitivă; electrofilicitatea ( $\omega$ ) reprezintă energia de stabilizare atunci când sistemul dobândește electroni din mediu, până la saturație. Deși validitatea aproximării „teoremei lui Koopman în cadrul DFT” (KID) este controversată [15], utilizarea energiilor orbitalilor moleculari de frontieră ca aproximare pentru obținerea  $I$  și  $A$  este susținută de teorema lui Janak [16]. În special, s-a constatat că valorile negative ale orbitalului HOMO după Hartree-Fock și Kohn-Sham definesc limita superioară și, respectiv, inferioară pentru valorile experimentale ale primului potențial de ionizare [17]. Folosind o aproximare cu diferențe finite și teorema lui Koopman [18], acești descriptorii pot fi exprimați prin următoarele ecuații:

$$I = E_{N-1} - E_N \approx -\epsilon_H \quad (3)$$

$$A = E_N - E_{N+1} \approx -\epsilon_L \quad (4)$$

$$\mu = -\chi \approx -\frac{1}{2}(I + A) \approx \frac{1}{2}(\epsilon_L + \epsilon_H) \quad (5)$$

$$\eta \approx \frac{1}{2}(I - A) \approx \frac{1}{2}(\epsilon_L - \epsilon_H) \quad (6)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \approx \frac{(I+A)^2}{2(I-A)} \approx \frac{(\epsilon_L + \epsilon_H)^2}{2(\epsilon_H + \epsilon_L)} \quad (7)$$

unde  $\epsilon_H$  și  $\epsilon_L$  sunt energiile orbitalilor moleculari cel mai înalt ocupat și cel mai jos neocupat, HOMO și LUMO, respectiv, și  $E_N$ ,  $E_{N-1}$ , și  $E_{N+1}$  reprezintă energia sistemelor cu  $N$ ,  $N - 1$ , și  $N + 1$  electroni. Acest lucru sugerează că procedura KID poate fi utilizată eficient pentru a calcula descriptorii globali direct din energiile orbitalilor de frontieră, fără a recurge la calculele extrem de îndelungate ale energiilor punctuale ale anionului și cationului.

Pentru a valida utilizarea energiilor orbitalilor moleculari Kohn-Sham de frontieră pentru a calcula descriptorii de reactivitate calculați conform teoriei DFT conceptuale („teorema lui Koopman în cadrul DFT” [19]), descriptorii globali au fost calculați folosind ambele tehnici, potențialele de ionizare  $I$  și afinitățile electronice  $A$  (în eV), precum și energiile



HOMO și LUMO, în fază gazoasă și în solvent (apă și metanol), folosind modelul de solvatare SMD.

Rezultatele sugerează că Procedura KID este valabilă și poate fi utilizată în studii ulterioare ale compușilor înrudiți în solvent (apă, metanol) [20,21,22].

Calcululele demonstrează că acidul DHF **1** posedă cele mai mari valori ale electrofilicității și electronegativității, în toate mediile cercetate. Electrofilicitatea scade în șirul acidul **1** > esterul **2** ≈ anilida **5** > fumaramida **6** > MBD **12** > BBD **13** > fumaramida **9** ≈ fumaramida **10** > MEAD **7** > fumaramida **11** > MPAD **8**. Electronegativitatea scade în șirul acidul **1** > esterul **2** ≈ anilida **5** > fumaramida **6** > fumaramida **9** ≈ fumaramida **10** ≈ MBD **12** > MEAD **7** > MPAD **8** ≈ fumaramida **11** ≈ BBD **13** [20,21,22].

**Tabelul 2.**

*Energiile orbitalilor HOMO și LUMO (în eV), diferența HOMO–LUMO ΔE (eV), potențialele de ionizare I și afinitățile electronice A (în eV), și electronegativitatea globală χ (în eV), electrorigiditatea totală η (în eV), și electrofilicitatea globală ω (în eV) a compușilor studiați, în vid, apă și metanol*

Compusul	Faza	E <sub>HOMO</sub>	E <sub>LUMO</sub>	ΔE	χ	η	ω	I	A	χ	η	ω
DHF <b>1</b>	Gaz	-6,91	-2,56	4,35	4,74	2,18	10,31	9,26	0,41	4,83	4,43	5,28
	Apă	-6,70	-2,56	4,14	4,63	2,07	10,36	6,33	2,45	4,39	1,94	9,93
	Metanol	-6,32	-2,20	4,12	4,26	2,06	8,81	6,25	2,34	4,30	1,95	9,46
Dimetil dihidroxifumar at <b>2</b>	Gaz	-6,05	-2,05	4,00	4,05	2,00	8,20	8,26	0,06	4,16	4,10	4,22
	Apă	-6,28	-2,15	4,13	4,22	2,07	8,60	6,16	2,33	4,24	1,91	9,40
	Metanol	-6,25	-2,12	4,13	4,19	2,07	8,48	6,17	2,26	4,21	1,96	9,07
Anilida <b>5</b>	Gaz	-6,00	-2,04	3,96	4,02	1,98	8,16	7,65	0,35	4,00	3,65	4,37
	Apă	-6,09	-2,10	3,99	4,10	2,00	8,41	5,89	2,31	4,10	1,79	9,38
	Metanol	-6,07	-2,07	4,00	4,07	2,00	8,28	5,99	2,17	4,08	1,91	8,71
Fumaramida <b>6</b>	Gaz	-5,98	-2,03	3,95	4,01	1,98	8,12	7,38	0,54	3,96	3,42	4,58
	Apă	-5,97	-2,05	3,92	4,01	1,96	8,20	5,79	2,26	4,03	1,76	9,19
	Metanol	-5,95	-2,04	3,91	4,00	1,96	8,16	5,80	2,21	4,01	1,79	8,96
MEAD <b>7</b>	Gaz	-5,90	-1,56	4,34	3,73	2,17	6,41	7,95	-0,27	3,84	4,11	3,58
	Apă	-6,04	-1,68	4,36	3,86	2,18	6,83	5,91	1,86	3,88	2,03	7,45
	Metanol	-6,01	-1,65	4,36	3,83	2,18	6,73	5,92	1,80	3,86	2,06	7,25
MPAD <b>8</b>	Gaz	-5,79	-1,43	4,36	3,61	2,18	5,98	7,80	-0,38	3,71	4,09	3,37
	Apă	-6,01	-1,63	4,38	3,82	2,19	6,66	5,88	1,82	3,85	2,03	7,29

	Metanol	-5,97	-1,65	4,32	3,81	2,16	6,72	5,87	1,80	3,84	2,04	7,23
Fumaramida <b>9</b>	Gaz	-6,26	-1,75	4,51	4,01	2,26	7,11	8,08	0,01	4,04	4,03	4,06
	Apă	-6,13	-1,67	4,46	3,90	2,23	6,82	5,99	1,85	3,92	2,07	7,44
	Metanol	-6,10	-1,65	4,45	3,88	2,23	6,75	6,01	1,79	3,90	2,11	7,22
Fumaramida <b>10</b>	Gaz	-6,22	-1,65	4,57	3,94	2,29	6,78	8,08	-0,044	0,2	4,06	3,99
	Apă	-6,17	-1,60	4,57	3,89	2,29	6,61	6,08	1,77	3,93	2,15	7,16
	Metanol	-6,14	-1,25	4,89	3,70	2,45	5,58	6,11	1,38	3,75	2,36	5,94
Fumaramida <b>11</b>	Gaz	-5,96	-1,42	4,54	3,69	2,27	6,00	7,89	-0,333	3,78	4,11	3,48
	Apă	-6,03	-1,52	4,51	3,78	2,26	6,32	5,89	1,71	3,80	2,09	6,90
	Metanol	-6,00	-1,54	4,46	3,77	2,23	6,37	5,90	1,69	3,80	2,10	6,86
MBD <b>12</b>	Gaz	-5,88	-2,09	3,79	3,99	1,90	8,38	7,52	0,42	3,97	3,55	4,44
	Apă	-5,85	-2,00	3,85	3,93	1,93	8,00	5,65	2,19	3,92	1,73	8,90
	Metanol	-5,83	-1,97	3,86	3,90	1,93	7,88	5,67	2,14	3,90	1,76	8,62
BBD <b>13</b>	Gaz	-5,43	-1,83	3,60	3,63	1,80	7,32	6,83	0,45	3,64	3,19	4,16
	Apă	-5,43	-1,83	3,60	3,63	1,80	7,32	5,24	2,05	3,64	1,60	8,31
	Metanol	-5,41	-1,81	3,60	3,61	1,80	7,24	5,25	1,99	3,62	1,63	8,04

#### 4. INDICI DE REACTIVITATE LOCALĂ

Pe lângă descriptorii de reactivitate globală, DFT permite calcularea descriptorilor locali, care atribuie o valoare fiecărui punct din spațiu, oferind o perspectivă asupra reactivității moleculei în punctul  $r$  din spațiu, fiind astfel indicatori de regioselectivitate.

Pentru DHF și toți derivații acestuia au fost calculate funcțiile Fukui, descriptorul dual, funcțiile Parr, descriptorul diferenței de reactivitate locală, potențialul electrostatic. Analiza rezultatelor a arătat că cele mai reactive situsuri sunt atomii de oxigen hidroxilici și atomii de carbon din legătura dublă a fragmentului enediolic, care s-au dovedit a fi în aproape în toate cazurile situsuri cu comportament ambifil (în apă și metanol). Compușii cercetați pentru care atomii de oxigen hidroxilici sunt situsurile cele mai reactive au arătat cea mai puternică activitate antiradicalică în experimentele efectuate, iar compușii pentru care atomii de carbon sunt situsurile cele mai reactive, nu au demonstrat activitate antiradicalică în testul cu DPPH $\cdot$ , cu excepția compușilor MBD **12** și BBD **13** [20,21,22].

#### 5. CEL MAI PROBABIL MECANISM AL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE

Anterior, acidului dihidroxifumaric și esterului său dimetilic au fost modificați prin procedee de sinteză chimică pentru obținerea unui șir de derivați pentru a studia relația „structură-proprietate”. Activitatea antioxidantă/antiradicală a compușilor a fost cercetată anterior utilizând testele cu radicalul DPPH $\cdot$  și cationul radical ABTS $^{+\cdot}$  și s-a constatat că

unele substanțe sintetizate au prezentat o activitate antioxidantă/antiradicală scăzută, deși structura fragmentului ene-diolic a fost păstrată [6,23,24]. În cadrul cercetării de față, s-a recurs la metodele chimiei computaționale pentru o analiză mai detaliată a rezultatelor experimentale.

Cele trei mecanisme de acțiune antioxidantă prin care antioxidanții își pot manifesta rolul protector au fost catalogate anterior în felul următor: mecanismul de transfer al atomului de hidrogen (HAT), mecanismul de transfer al unui electron, urmat de transferul de protoni (SET-PT) și mecanismul de transfer inițial al protonului, urmat de transferul electronului (SPLET) [25-28].

În mecanismul HAT, radicalul liber ( $R^{\bullet}$ ) răpește un atom de hidrogen din antioxidant (AH), dând naștere formei radicalice de antioxidant. În acest caz, reactivitatea antioxidantului poate fi prezisă prin calcularea entalpiei de disociere a legăturii O-H (BDE).



Mecanismul SET-PT are loc în două etape, în care extracția electronilor din compusul antioxidant este urmată de transferul de protoni. Parametrul numeric legat de acest mecanism este potențialul de ionizare (IP) pentru prima etapă și entalpia de disociere a protonului (PDE) din radicalul cationic ( $\text{AH}^{+\bullet}$ ) pentru a doua etapă. Moleculele cu valori scăzute ale IP și PDE vor avea activitate ridicată [25-28]. În acest caz, etapa limitativă este SET - transferul electronului.



Mecanismul SPLET constă, de asemenea, din două etape. În prima etapă are loc disocierea antioxidantului cu formarea formei anionice și a protonului liber, iar apoi ionii creați în prima reacție reacționează cu radicalul liber. Entalpia de reacție a primului pas din acest mecanism corespunde afinității protonilor (PA) a anionului de antioxidant. Entalpia de reacție a celei de-a doua etape, ruperea electronului, corespunde entalpiei de transfer al electronului (ETE). În acest caz, etapa limitativă este PL - pierderea protonului.



În cercetarea de față au fost calculate valorile BDE, IP, PDE, PA și ETE într-un efort de a elucidă cel mai probabil mecanism prin care DHF își manifestă activitatea antioxidantă față de radicalul DPPH $^{\bullet}$ . Cu acest scop, au fost utilizate valorile entalpiilor calculate la 298,15 K la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(d,p), conform ecuațiilor de mai jos [25,26]

$$\text{BDE} = \text{H}(\text{DHF}^{\bullet}) + \text{H}(\text{H}^{\bullet}) - \text{H}(\text{DHF}) \quad (11)$$

$$\text{IP} = \text{H}(\text{DHF}^{+\bullet}) + \text{H}(\text{e}^{-}) - \text{H}(\text{DHF}) \quad (12)$$

$$\text{PA} = \text{H}(\text{DHF}^{-}) + \text{H}(\text{H}^{+}) - \text{H}(\text{DHF}) \quad (13)$$

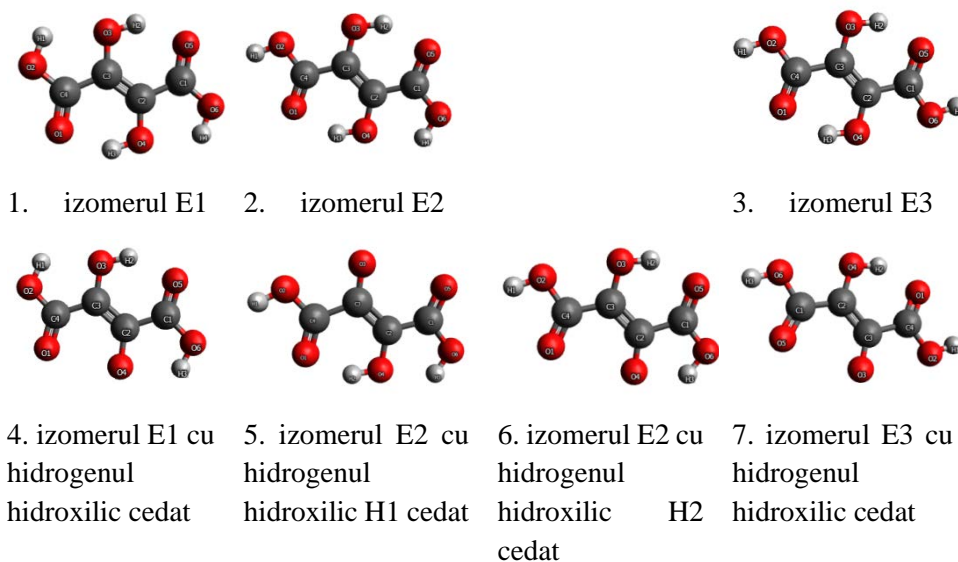
Entalpiile speciilor moleculare  $\text{H}(\text{X})$  la temperatura T sunt calculate utilizând expresia:

$$H(X) = E0 + ZPE + \Delta H_{trans} + \Delta H_{rot} + \Delta H_{vib} + RT \quad (14)$$

unde  $E0$  este energia electronică totală,  $ZPE$  - este energia în punctul zero,  $\Delta H_{trans}$ ,  $\Delta H_{rot}$ ,  $\Delta H_{vib}$  sunt contribuțiile de translație, rotație și vibrație la entalpie, respectiv. Termenul  $RT$  este adăugat pentru a converti energia în entalpie [28].

Pentru a calcula indicii de mai sus, sunt necesare entalpiile atomului de hidrogen, protonului și electronului în faza gazoasă și apă. Entalpia în fază gazoasă a atomului de hidrogen  $H(H^{\bullet})$ , a protonului  $H(H^+)$  și a electronului  $H(e^-)$  au fost calculate anterior și constituie: 1306,58, 6,197 și 3,145  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectiv [25,28]. Entalpiile acestor specii în apă constituie: -1310,0, -1083,8 și -101,86  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectiv [25,28].

Pe lângă aceasta, trebuie ținut cont și de abundența izomerilor diferită în gaz și în apă. Astfel, calculele *in vacuo* au fost efectuate pentru izomerul E1 (abundența relativă de 87%), iar calculele în solvent (apă, după modelul SMD) au fost efectuate pentru toți cei trei cei mai abundenți izomeri, E1, E2 și E3. Un alt moment important constă în faptul că reieșind din structura geometrică a izomerului E2, cei doi atomi de hidrogen din grupările hidroxilice ale fragmentului enediolic nu sunt echivalenți.



**Fig. 3.** Speciile moleculare cu caracter antioxidant, cercetate în apă.

Reieșind din cele expuse mai sus speciile moleculare supuse cercetării în cazul utilizării solventului (apă) sunt prezentate în Figura 3.

Valorile obținute ale BDE, IP, and PA ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) pentru izomerii DHF (Figura 3) *in vacuo* și în apă sunt prezentate în Tabelul 3, unde valoarea minimă demonstrează preferința către un anume mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă.

Analiza rezultatelor obținute demonstrează faptul că *in vacuo* transferul direct de hidrogen (HAT) este cel mai probabil, valoarea BDE a izomerului E1 (347,13  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) fiind mult

mai joasă decât valorile obținute pentru primele etape ale mecanismelor SET-PT (IP = 864,81 kJ·mol<sup>-1</sup>) și SPLET (PA = 1357,21 kJ·mol<sup>-1</sup>).

**Tabelul 3**

*Valorile obținute ale BDE, IP, and PA (kJ·mol<sup>-1</sup>) pentru izomerii DHF in vacuo și în apă (modelul SMD).*

		Mecanismul		
		HAT	SET	PL
Specia		BDE	IP	PA
<i>In vacuo</i>	Isomer E1	<b>347,13</b>	864,81	1357,21
Apă	Isomer E1	329,11	499,99	<b>81,41</b>
	Isomer E2 <sup>a</sup>	327,58	495,91	<b>84,75</b>
	Isomer E2 <sup>b</sup>	332,36	495,91	96,39
	Isomer E3	330,36	485,47	100,66

**Notă:** notația E2<sup>a</sup> este utilizată pentru a însemna faptul că la interacțiunea cu radicalul, izomerul E2 cedează hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare *syn*-, iar notația E2<sup>b</sup> este utilizată pentru a însemna faptul că la interacțiunea cu radicalul, izomerul E2 cedează hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare *anti*-.

În solvent, mecanismul HAT este caracterizat de valori BDE de circa 330 kJ·mol<sup>-1</sup>, în timp ce valorile PA în soluție sunt de 80 - 100 kJ·mol<sup>-1</sup>, iar valorile pentru IP sunt în jur de 500 kJ·mol<sup>-1</sup>. Astfel, cel mai probabil mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă în apă (utilizând modelul SMD al solventului) este mecanismul SPLET, iar cea mai activă specie este izomerul E1 (PA = 81,41 kJ·mol<sup>-1</sup>), urmat îndeaproape de izomerul E2 (PA = 84,75 kJ·mol<sup>-1</sup>). Trebuie menționat aici că datorită faptului că izomerul E2 are două grupări carboxilice orientate diferit (una *syn*- și una *anti*-), hidrogenii grupărilor hidroxilice nu sunt echivalenți. Astfel, în urma interacțiunii cu radicalul DPPH<sup>•</sup> izomerul E2 poate ceda unul din cei doi hidrogeni de la grupările hidroxil, iar calculele arată că anume structura prezentată în Figura 3(5) va fi cea mai probabilă, cu PA = 84,75 kJ·mol<sup>-1</sup>, față de structura din Figura 3(6), cu PA = 96,39 kJ·mol<sup>-1</sup>. Astfel, cel mai ușor este cedat radicalului anume hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare *syn*-.

Pe baza celor enunțate, au fost scrise semi-reacțiile pentru radicalul DPPH<sup>•</sup> (ec. 15-17) pentru mecanismele HAT, SET și PL:





Valorile energiei libere Gibbs ( $\Delta_r G^0$ ) ale reacțiilor au fost calculate după cum urmează:

$$\Delta_r G^0 (\text{HAT}) = [G(\text{DHF}^{\bullet}) + G(\text{DPPH-H}^{\bullet})] - [G(\text{DHF}) + G(\text{DPPH}^{\bullet})] \quad (18)$$

$$\Delta_r G^0 (\text{SET}) = [G(\text{DHF}^{2+}) + G(\text{DPPH}^{\ominus})] - [G(\text{DPPH}^{\bullet}) + G(\text{DHF})] \quad (19)$$

$$\Delta_r G^0 (\text{PL}) = [G(\text{DHF}^{\bullet}) + G(\text{DPPH-H}^{+\bullet})] - [G(\text{DHF}) + G(\text{DPPH}^{\bullet})] \quad (20)$$

Conform Tabelului 4, în faza gazoasă, valorile energiei libere Gibbs ( $\Delta_r G^0$ ) sunt minime pentru mecanismul HAT (29,6 kJ·mol<sup>-1</sup>), indicând asupra faptului că acesta este mecanismul preferat în faza gazoasă. Pe lângă aceasta, valorile energiei libere Gibbs în apă (modelul SMD) sunt, de asemenea, minime pentru mecanismul HAT, în limitele 17,6 - 20,4 kJ·mol<sup>-1</sup>. Pentru mecanismul SET, valorile  $\Delta_r G^0$  în apă sunt în jur de 150 kJ·mol<sup>-1</sup>, indicând asupra faptului că acesta este mecanismul cel mai puțin probabil. Pentru mecanismul PL, valorile  $\Delta_r G^0$  sunt în limitele 58,6-74,4 kJ·mol<sup>-1</sup>, mai mari decât pentru HAT. Totuși, trebuie ținut cont aici de faptul că unele reacții termodinamic nefavorabile, ale căror energii de reacție nu întrec 50 kJ·mol<sup>-1</sup>, trec prin stări de tranziție joase, și în astfel de cazuri anume cinetica reacției poate fi factorul determinant [29,30]. Desigur, și în acest caz, trebuie luate în calcul limitările metodei SMD.

**Tabelul 4**

*Valorile calculate ale  $\Delta_r G^0$  pentru mecanismele HAT, SET și PL (kJ·mol<sup>-1</sup>) pentru izomerii DHF in vacuo și în apă (modelul SMD).*

		HAT	SET	PL
<i>In vacuo</i>	Izomer E1	29,6	539,2	428,9
Apă	Izomer E1	19,9	153,8	58,6
	Izomer E2 <sup>a</sup>	20,4	149,3	71,5
	Izomer E2 <sup>b</sup>	17,6	149,3	60,4
	Izomer E3	17,9	136,5	74,4

**Notă:** notația E2<sup>a</sup> înseamnă faptul că la interacțiunea cu radicalul, izomerul E2 cedează hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare syn-, iar în cazul notației E2<sup>b</sup> - cedează hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare anti-.

Așadar, luând în considerație rezultatele obținute pentru parametrii termochimici intrinseci și cele obținute pentru semi-reacții, putem ajunge la concluzia că anume mecanismul PL este cel mai probabil, iar DHF este în forma izomerului E1. Se cere a menționa aici importanța calculelor ulterioare ale stărilor de tranziție, precum și adaosul de molecule de apă explicite, pentru a releva barierele energetice ale speciilor intermediare, și a obține o mai mare claritate asupra proceselor.

## 6. PROPRIETĂȚILE ADMET ALE COMPUȘILOR CERCETAȚI

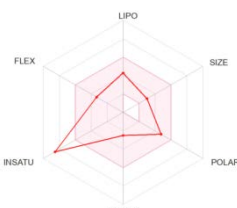
În continuare au fost estimate proprietățile de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate a compușilor cercetați, utilizând serverele SwissADME [31] și pkCSM [32] care oferă modele computerizate ce permit evaluarea proprietăților farmacocinetice fără a recurge la studii experimentale costisitoare și de durată, determinând astfel probabilitatea ca derivații cercetați să devină potențiali candidați pentru dezvoltarea medicamentelor.



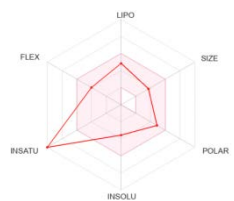
a) **DHF 1**



b) **EMD 2**



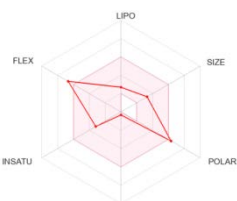
c) **Anilida 5**



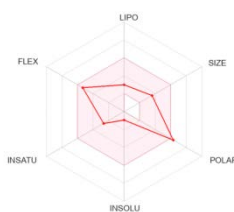
d) **Fumaramida 6**



e) **MEAD 7**



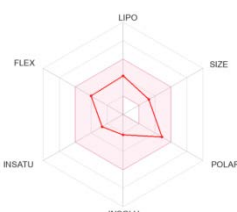
f) **MPAD 8**



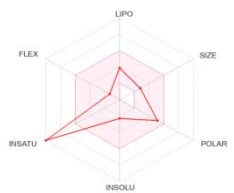
g) **Fumaramida 9**



h) **Fumaramida 10**



i) **Fumaramida 11**



j) **MBD 12**



k) **BBD 13**



l) **Acid ascorbic**

**Fig. 4.** Radarele de biodisponibilitate pentru substanțele cercetate: (a) acidul DHF 1, (b) esterul EDM 2, (c) anilida 5, (d) fumaramida 6, (e) MEAD 7, (f) MPAD 8, (g) fumaramida 9, (h) fumaramida 10, (i) fumaramida 11, (j) MBD 12, (k) BBD 13, (l) acidul ascorbic.

S-a constatat că majoritatea structurilor cercetate îndeplinesc regula de cinci a lui Lipinski, și satisfac filtrele Ghose, Veber și Egan, atingând un scor bun de biodisponibilitate, de 0,56, identic acidului ascorbic. Conform rezultatelor, se poate observa că majoritatea compușilor sunt foarte solubili în apă și au o penetrabilitate bună a pielii. Toți compușii, inclusiv acidul ascorbic, au valori mici de permeabilitate pentru Caco-2 (valori  $\log P_{app} < 0,90$  cm/s), absorbție intestinală bună (în afară de DHF), nu traversează bariera sanguină a creierului, sau sistemul nervos central.

Au fost de asemenea evaluate izoformele citocromului uman P450 (CYP), care participă în metabolismul medicamentelor din interiorul ficatului. Toți compușii cercetați sunt non-inhibitori/substraturi ale izoenzimelor, în afară de compusul BBD 13, care este posibil inhibitor al câtorva izoenzime. De asemenea, majoritatea derivaților nu au fost găsiți ca inhibitor/substrat al P-gp.

Rezultatele au arătat că toți compușii au o valoare pozitivă a clearance-ului total și pot fi pur și simplu excretați din organism. Toxicitatea AMES, hepatotoxicitatea, inhibarea canalului de potasiu hERG și parametrii de sensibilizare a pielii au fost prezise pentru a afla profilul de toxicitate al derivaților. Rezultatele obținute relevă că doar BBD 13 posedă toxicitate AMES, în rest toți compușii cercetați nu posedă toxicitate AMES, hepatotoxicitate, nu inhibă canalul de potasiu hERG și nu sensibilizează pielea.

Pentru a obține informații suplimentare despre biodisponibilitatea și asemănarea cu medicamentele ale substanțelor cercetate, au fost estimate rezultatele radarului de biodisponibilitate (Figura 4), care au demonstrat proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor.

Zona colorată a radarului reprezintă suprafața fizico-chimică potrivită pentru biodisponibilitatea orală. Notațiile pe figuri se descriu după cum urmează: LIPO

(lipofilicitate):  $-0,7 < XLOGP3 < +5,0$ ; SIZE (dimensiune):  $150\text{g/mol} < \text{greutate moleculară} < 500\text{g/mol}$ ; POLAR (polaritate):  $20\text{Å}^2 < TPSA < 130\text{Å}^2$ ; INSOLU (insolubilitate):  $-6 < \log S (\text{ESOL}) < 0$ ; INSATU (nesaturație):  $0,25 < \text{fracțiunea de atomi de C în hibridizarea } sp^3 < 1$ ; FLEX (flexibilitate):  $0 < \text{nr. de legături ce pot fi rotite} < 9$ .

Se observă din Figura 4 că majoritatea substanțelor se înscriu în totalitate în zona colorată a radarului, iar cele care nu se înscriu, o depășesc de regulă într-un singur criteriu, demonstrând proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor.

Luând în considerație materialul expus anterior, în special rezultate legate de utilitatea DHF și a derivaților lui pentru aplicații în vinificație, industria alimentară, de producere a tutunului, precum și rezultatele pozitive ale modelării ADMET, în etapa următoare a fost



efectuată simularea prin metoda molecular docking a interacțiunii dintre compușii menționați și proteaza principală M<sup>pro</sup> a virusului SARS-CoV-2.

În cadrul cercetării de față a fost utilizat programul CB-Dock2, elaborat în cadrul Academiei de Științe Chineze [33]. Procedeele utilizate de acest program constă în identificarea automată a locurilor de legare, calculul centrului și dimensiunii, personalizarea dimensiunii casetei de andocare în funcție de liganzii cercetați și apoi realizarea andocării moleculare cu ajutorul softului AutoDock Vina [34].

Una dintre cele mai interesante ținte ale virusului SARS-CoV-2 este proteaza principală a acestuia (M<sup>pro</sup>), care este esențială în ciclul de viață a virusului, inclusiv în replicarea și asamblarea acestuia [35]. Astfel, inhibarea sau dezactivarea acestei proteaze va duce la moartea virusului. În cercetarea de față a fost utilizată structura cristalină a M<sup>pro</sup> cu codul PDB: 6LU7 [36], iar această structură cristalografică este codificată în genomul viral în combinație cu inhibitorul N3.

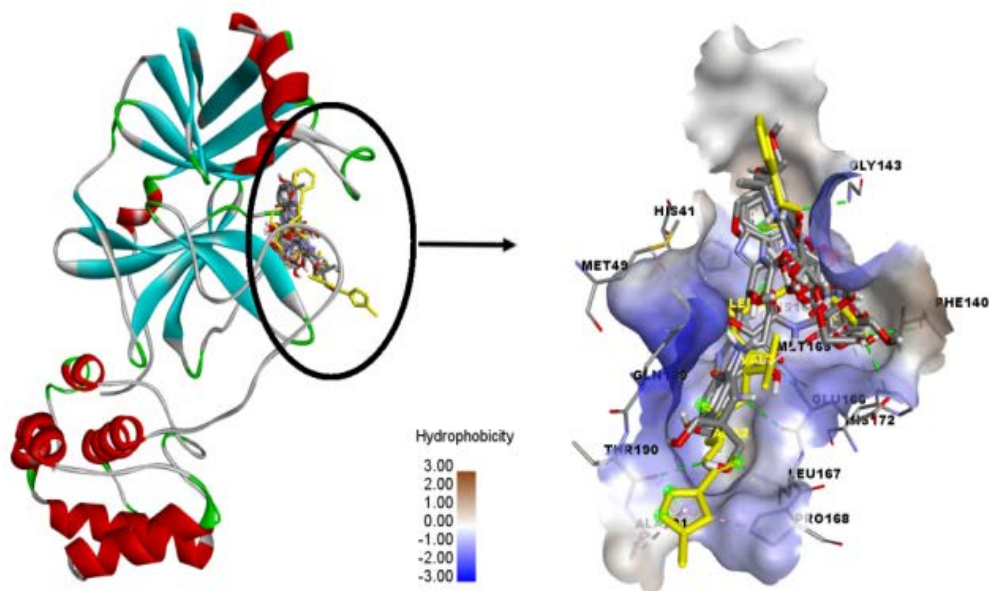
Pe baza valorilor energiei de legare (Tabelul 5), s-a constatat că DHF **1** are aceeași afinitate de legare ca și acidul ascorbic (-22,18 kJ·mol<sup>-1</sup>). Cea mai mică afinitate de legare la proteaza virală o are esterul EDM **2** (-20,92 kJ·mol<sup>-1</sup>), iar cea mai mare afinitate - acidul BBD **13** (-30,12 kJ·mol<sup>-1</sup>), urmat de fumaramida **6** (-29,29 kJ·mol<sup>-1</sup>). Conform rezultatelor simulării computaționale, conformațiile cu cele mai mari afinități de legare pentru toți compușii cercetați se plasează în același buzunar al proteazei M<sup>pro</sup> ca și inhibitorul N3 (Figura 5).

**Tabelul 5.**

*Rezultatele andocării moleculare a compușilor cercetați la proteaza principală a virusului SARS-COV-2*

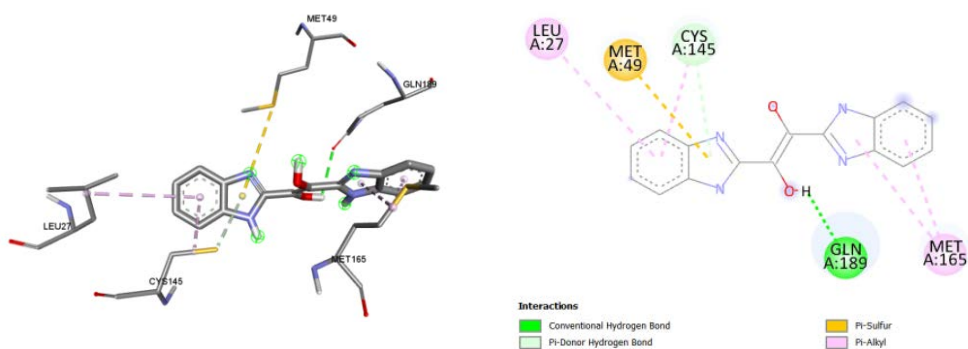
<b>Compușul cercetat</b>	<b>Afinitatea de legare, kJ·mol<sup>-1</sup></b>
DHF <b>1</b>	-22,18
Esterul <b>2</b>	-20,92
Anilida <b>5</b>	-26,36
Fumaramida <b>6</b>	-29,29
MEAD <b>7</b>	-22,59
MPAD <b>8</b>	-23,01
Fumaramida <b>9</b>	-28,03
Fumaramida <b>10</b>	-25,10
Fumaramida <b>11</b>	-27,61
MBD <b>12</b>	-28,03
BBD <b>13</b>	-30,12
Acidul ascorbic	-22,18

Pentru toți compușii cercetați au fost reprezentate structurile tridimensionale și bidimensionale ale acestor interacțiuni, au fost identificate numărul și tipurile legăturilor formate. Figura 6 prezintă interacțiunile dintre compusul BBD **13**, care a prezentat cea mai înaltă valoare a afinității de legare.



**Fig. 5.** Poziția celei mai bune conformații pentru toți compușii studiați în buzunarul de legare al  $M^{pro}$  al SARS-CoV-2 (ligandul co-cristalizat N3 este prezentat cu galben)

Astfel, se observă prezența a unei singure legături de hidrogen convenționale, cu aminoacidul GLN189, a unei legături de hidrogen  $\pi$ -donor cu aminoacidul CYS145, a unei legături de hidrogen  $\pi$ -sulf cu MET49, și trei legături  $\pi$ -alchil, cu aminoacizii LEU27 și MET165.



**Fig. 6.** *Reprezentarea interacțiunii cu cel mai mare scor de andocare între compusul cercetat și proteaza principală a virusului SARS-CoV-2 (imagine 3D - pe stânga și 2D - pe dreapta), pentru BBD 13*

Cercetările computaționale au arătat că atât acidul dihidroxifumaric cât și toți derivații sintetizați se leagă în același buzunar de proteine și interacționează cu diada catalitică Cys-His, formând legături de diferite tipuri cu mulți dintre aminoacizii hidrofobi (LEU27, PHE140, GLY143, MET165, PRO168) și cu majoritatea aminoacizilor polari (THR26, ASN142, HIS163, GLN189) care stabilizează complexul proteină-ligand.

## CONCLUZII

În concluzie, se cere de a menționa faptul că, în premieră pentru Republica Moldova au fost aplicate metodele computaționale pentru calculul indicilor de reactivitate globală a moleculelor studiate, pentru demonstrarea validității procedurii KID în apă și metanol, pentru calculul comparativ al indicilor de reactivitate locală a moleculelor studiate pe baza funcțiilor Fukui, descriptorului dual, funcțiilor Parr și indicelui local al diferenței de reactivitate în vid, în apă și metanol. În cadrul acestui studiu au fost cercetați acidul dihidroxifumaric și zece derivați ai acestuia.

Aplicarea metodelor de calcul a permis identificarea a 45 de izomeri ai DHF, inclusiv 23 de forme cetonice și 22 enediolice, s-a arătat existența a trei cei mai stabili izomeri enediolici, a fost determinată abundența relativă a lor în gaz, apă și metanol. De asemenea, a fost studiat procesul de izomerizare și tautomerizare a celor mai stabili trei izomeri ai DHF, s-au determinat parametrii cinetici și termodinamici.

În cadrul cercetării de față, a fost efectuată în premieră analiza predictivă prin metode de calcul a proprietăților de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate a derivaților cercetați, care au demonstrat proprietăți similare medicamentului. Au fost construite radarele de biodisponibilitate a substanțelor cercetate, demonstrând proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor. De asemenea, pentru prima dată, utilizând metoda andocării moleculare, a fost demonstrat potențialul semnificativ de inhibiție a proteazei principale a virusului SARS-CoV-2 de către toți compușii supuși studiului.

## NOTA DE APRECIERE

Această lucrare a fost realizată în cadrul proiectului național de cercetare **Nr. 20.80009.5007.27** „Mecanisme fizico-chimice ale proceselor redox cu transfer de electroni implicate în sistemele vitale, tehnologice și de mediu”.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. SHIELDS, H.J.; TRAA, A.; VAN RAAMSDONK, J.M. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: A comprehensive review of comparative and experimental studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, 9. DOI: 10.3389/fcell.2021.628157.
2. BHUIYAN, M.A.; HOQUE, M.Z.; HOSSAIN, S.J., Free Radical Scavenging Activities of *Zizyphus mauritiana*. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2009, 5(3), 318-322.
3. GARG, A.; SHARMA, R.; DEY, P.; KUMAR, A. Food auto-oxidation: An overview. *Antioxidants Effects in Health*. 2022, 43–68. DOI: 10.1016/b978-0-12-819096-8.00013-6.
4. FAVRE, H. A.; POWELL, W. H. *Nomenclature of Organic Chemistry. IUPAC Recommendations and Preferred Name 2013*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN 978-0-85404-182-4.
5. SOUCHAY, P.; FLEURY, D.; FLEURY, M. Tautomerie enediol-cetol de l'acide dihydroxyfumarique et son intervention dans la decarboxylation de celui-ci. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences Seice C*. 1967, 264(26), 2130.
6. SECARĂ, N.; DUCA, Gh.; MACAEV, F. Occurrence and chemistry of dihydroxyfumaric acid. *Chemistry Journal of Moldova*. 2011, 6(1), 29-44. [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/12135/datacite](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/12135/datacite).
7. ESCHENMOSER, A. The search for the chemistry of life's origin. *Tetrahedron*. 2007, 63, 12821– 12844. DOI: 10.1016/j.tet.2007.10.012.
8. HAY, R.W.; HARVIE S.J. The uncatalysed and nickel(II) catalysed decarboxylation of dihydroxyfumaric acid. *Australian Journal of Chemistry*. 1965, 18, 1197-1209. DOI: 10.1071/CH9651197.
9. NAIDU SAGI, V.; PUNNA, V.; HU, F.; MEHER, G.; KRISHNAMURTHY, R. *J. American Chemical Society*. 2012, 134(7), 3577–3589. DOI: 10.1021/ja211383c.
10. LANTERNA, C.; MUSUMECI, A.; RACCOSTA, L.; CORNA, G.; MORESCO, M.; MAGGIONI, D.; FONTANA, R.; DOGLIONI, C.; BORDIGNON, C.; TRAVERSARI, C.; AND RUSSO, V. The administration of drugs inhibiting cholesterol/oxysterol synthesis is safe and increases the efficacy of immunotherapeutic regimens in tumor-bearing mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016, 65(11), 1303–1315. DOI: 10.1007/s00262-016-1884-8.
11. DUCA, GH.; GONȚA, M.; IAMBARȚEV, V. Acțiunea reducătorilor în diminuarea concentrației de nitrit în produsele de carne. *Conf. șt. "Succesele în trat. Contemp. al cancerului"*, Instit. Oncol. din Moldova, 1997, 111.

12. GAINA, B.; TARAN, N.; DIACON, I.; DUCA, GH.; GONȚA, M.; VASCAN N. Studiul proceselor de oxidoreducere în vinuri la șampanizare. *Bilanțul activității șt. a USM pe anii 1993–1994. Științe naturale: materialele conf. corpului didactico – șt., 20–27 martie 1995*. Chișinău, 1995, 173.
13. GONȚA, M. *Transformarea nitraților, nitriților, formarea N-nitrozaminelor și utilizarea inhibitorilor în procese redox*: tz. de doct. hab. în chimie. Chisinau, 2009.
14. MARTÍNEZ-ARAYA, J.I.; SALGADO-MORÁN, G.; GLOSSMAN-MITNIK, D., Computational Nutraceutics: Chemical Reactivity Properties of the Flavonoid Naringin by Means of Conceptual DFT. *Journal of Chemistry*. 2013, Article ID 850297. DOI: 10.1155/2013/850297.
15. MARTÍNEZ-ARAYA, J.I.; SALGADO-MORÁN, G.; GLOSSMAN-MITNIK, D., Computational Nutraceutics: Chemical Reactivity Properties of the Flavonoid Naringin by Means of Conceptual DFT. *Journal of Chemistry*. 2013, Article ID 850297. DOI: 10.1155/2013/850297.
16. JANAK, J.F. Proof that  $\delta E_{\text{dnl}} = \epsilon$  in density-functional theory. *Physical Review B*. 1978, 18(12), 7165–7168. DOI: 10.1103/PhysRevB.18.7165.
17. ZEVALLOS, J.; TORO-LABBE, A.A theoretical analysis of the Hohn-Sham and Hartree-Fock orbitals and their use in the determination of electronic properties. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2003, 48(4), 39–47. DOI: 10.1155/2013/850297.
18. CRAMER, C. J. *Essentials of Computational Chemistry—Theories and Models*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, 2004, 2nd edition.
19. CÁRDENAS, C.; RABI, N.; AYERS, P.W.; MORELL, C.; JARAMILLO, P.; FUENTEALBA, P. Chemical Reactivity Descriptors for Ambiphilic Reagents: Dual Descriptor, Local Hypersoftness, and Electrostatic Potential. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2009, 113(30), 8660–8667. DOI: 10.1021/jp902792n.
20. DUCA, Gh.; BOLOCAN, N. Understanding the Chemical Reactivity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives through Conceptual DFT. *Revista de Chimie*. 2021, 72(4), 162-174. DOI: 10.37358/Rev.Chim.1949.
21. BOLOCAN, N.; DUCA, Gh. DFT study of geometric isomerization and keto– enol tautomerization of dihydroxyfumaric acid. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia*. 2021, 4, 341-353. ISSN 1224-7154. DOI: 10.24193/subbchem.2021.4.25.
22. BOLOCAN, N.; DUCA, Gh. *Dihydroxyfumaric Acid. Transformations, Importance and Applications, New Derivatives: Review of Experimental and Theoretical Research*. In.: Duca Gh., Vaseashta A. (Eds.) *Fundamental and Biomedical Aspects of Redox Processes*. IGI Global, USA, 2023, 1, Chapter 9, 198-223.

23. MACAEV, F.; SECARA, N.; DUCA, Gh. Antioxidant Activity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives: an Analysis by the ABTS<sup>+</sup> Decolorization Assay. *Chemistry&Biology Interface*. 2013, 3(4), 253-263. ISSN: 2249-4820.
24. SECARĂ, N.; BETS, L.; DUCA, Gh.; VLAD, L.; MACAEV, F. New derivatives of dihydroxyfumaric acid with potential use in antiradicalic applications. *Новые материалы, химические технологии и реагенты для промышленности, медицины и сельского хозяйства на основе нефтехимического и возобновляемого сырья : Всероссийская науч.-практ. конф. с междунар. Участием. Уфа, Россия, 25-26 февр. 2011*. Ufa, Rusia, 2011, 253-256.
25. SZELĄG, M.; URBANIAK, A.; BLUYSSSEN, H.A.R. A theoretical antioxidant pharmacophore for natural hydroxycinnamic acids. *Open Chemistry*. 2014, 13(1). DOI: 10.1515/chem-2015-0001.
26. KLEIN, E.; RIMARCIK, J.; LUKES, V. DFT/B3LYP study of the O–H bond dissociation enthalpies and proton affinities of para-and metasubstituted phenols in water and benzene. *Acta Chim Slovenica*. 2009, 2, 37–51. [http://fez.schk.sk/eserv/changeme:5011/acs\\_0045.pdf](http://fez.schk.sk/eserv/changeme:5011/acs_0045.pdf).
27. BAJ, A.; CEDROWSKI, J.; OLCHOWIK-GRABAREK, E.; RATKIEWICZ, A.; WITKOWSKI, S. Synthesis, DFT calculations, and in vitro antioxidant study on novel carba-analogs of vitamin E. *Antioxidants*. 2019, 8(12), 589. DOI: 10.3390/antiox8120589.
28. ÇAKMAK, E.; ÖZBAKIR IŞIN, D. A theoretical evaluation on free radical scavenging activity of 3-styrylchromone derivatives: The DFT study. *Journal of Molecular Modeling*. 2020, 26(5). DOI: 10.1007/s00894-020-04368-7.
29. GALANO, A.; MAZZONE, G.; ALVAREZ-DIDUK, R.; MARINO, T.; ALVAREZ-IDABOY, J.R.; RUSSO, N. Food antioxidants: Chemical insights at the molecular level. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2016, 7(1), 335–352. DOI: 10.1146/annurev-food-041715-033206.
30. GALANO, A. & ALVAREZ-IDABOY, J.R. A computational methodology for accurate predictions of rate constants in Solution: Application to the assessment of primary antioxidant activity. *Journal of Computational Chemistry*, 2013, 34(28), 2430–2445. DOI: 10.1002/jcc.23409.
31. DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). DOI: 10.1038/srep42717.
32. KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004, 3(8), 711–716. DOI: 10.1038/nrd1470.
33. LIU, Y.; YANG, X.; GAN, J.; CHEN, S.; XIAO, Z.; CAO, Y. CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous

- template fitting. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(W1), W159–W164. Advance online publication. DOI: 10.1093/nar/gkac394.
34. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*. 2010, 31(2), 455-461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
35. TAHIR, U.L.; QAMAR, M.; ALQAHTANI, S.M.; ALAMRI, M.A.; CHEN, L.L. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J. Pharm. Anal.* 2020, 10, 313–319. DOI: 10.1016/j.jpha.2020.03.009.
36. JIN, Z.; DU, X.; XU, Y.; DENG, Y.; LIU, M.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; LI, X.; ZHANG, L.; PENG, C.; DUAN, Y.; YU, J.; WANG, L.; YANG, K.; LIU, F.; JIANG, R.; YANG, X.; YOU, T.; LIU, X.; YANG, H. Structure of Mpro from SARS-COV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*. 2020, 582(7811), 289–293. DOI: [10.1038/s41586-020-2223-y](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y).

### Lista Abrevierilor

ABTS <sup>•+</sup>	— radical cation de acid 2,2'-Azinobis-(3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonic)
ADMET	— absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate
ASN	— asparagină
B3LYP	— Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr (denumirea funcționalei)
BBD	— (E)-1,2-di(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etene-1,2-diol
BDE	— bond dissociation energy / energia de disociere a legăturii
CYS	— cisteină
DHF	— acidul dihidroxifumaric
DFT	— teoria funcționalei de densitate
DPPH <sup>•</sup>	— radicalul 2,2-difenil-2-picrilhidrazil
ETE	— electron transfer enthalpy / entalpia de transfer a electronului
GLN	— glicină
GLU	— glutamină
GLY	— glicină
HAT	— hydrogen atom transfer - transferul atomului de hidrogen
HIS	— histidină

IP	—	potențialul de ionizare
KID	—	teorema lui Koopman în cadrul DFT (Koopman in DFT)
LEU	—	leucină
MBD	—	acidul ( <i>E</i> )-3-(1H-benzo[ <i>d</i> ]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic
MEAD	—	2,3-dihidroxi-N <sup>1</sup> ,N <sup>4</sup> -bis(2-hidroxietyl)fumaramida
MET	—	metionină
MPAD	—	2,3-dihidroxi-N <sup>1</sup> ,N <sup>4</sup> -bis(2-hidroxiopropil)fumaramida
M <sup>pro</sup>	—	proteaza principală a virusului SARS-CoV-2
PA	—	proton affinity/ afinitatea protonului
PDB	—	baza de structuri proteice Protein Data Bank
PDE	—	proton dissociation energy / entalpia de disociere a protonului
PHE	—	fenilalanină
PRO	—	prolină
SET-PT	—	sequential electron transfer, proton transfer / transferul inițial al electronului urmat de transferul protonului
SMD	—	modelul de solvatare bazat pe densitate
SPLET	—	sequential proton loss, electron transfer/ pierderea inițială a protonului urmată de transferul electronului
THR	—	treonină