

CZU: 543.429.23:542.943`78:581.13:634.8

https://doi.org/10.59295/PRTEP2023_09

9. DATELE SPECTRALE RMN - MĂRTURII NOTABILE ÎN CERCETAREA INTERACȚIUNILOR ANTIOXIDANTE: STUDII DE CAZ PRIVIND UNII METABOLIȚI DIN STRUGURI

Elena GORINCIOL, Alic BARBA, Crina VICOL

Institutul de Chimie, Universitatea de Stat din Moldova

Rezumat. Cercetarea curentă portretizează sistemele antioxidanților naturali din vin: trans-resveratrol- acidul L-ascorbic și acidul dihidroxifumaric- acidul L-ascorbic, în încercarea de a modela și elucida interacțiunile plauzibile dintre antioxidanții care se găsesc în mod natural în struguri și vin, pe baza activității de captare a radicalilor de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH^{*}) de către antioxidanții numiți și bazându-se pe datele spectroscopiei ¹³C și ¹H RMN ca metodă de investigare. Dovezile oferite de experimentele RMN au fost confruntate cu datele spectroscopiei UV-Viz. Pentru sistemul trans-resveratrol- acidul L-ascorbic, pe baza metodei ¹³C RMN, a fost demonstrată formarea oligomerilor trans-resveratrolului (viniferine) ca efect al oxidării, într-un process asistat de DPPH^{*}. Prin compararea rezultatelor spectrale ¹³C RMN cu datele UV-Viz, a fost stabilit că efecte sinergice pronunțate în sistemul menționat sunt prezente tocmai în cazurile experimentale pentru care a fost atestată prezența viniferinelor. Pentru sistemul acidul dihidroxifumaric- acidul L-ascorbic nu a fost atestată oxidarea acidului dihidroxifumaric până la acid dicetosuccinic, descrisă în literatură. În schimb, prin studii spectrale ¹H și ¹³C RMN a fost stabilit, că în rezultatul interacțiunii acidului dihidroxifumaric cu DPPH^{*} are loc degradarea acidului. Identificarea exactă a produselor transformării acidului dihidroxifumaric a fost împiedicată de procesele secundare intervenite, cu implicarea majoră a acidului dihidroxifumaric, și anume polimerizarea acetonei, declanșată de acidul dihidroxifumaric, cu participarea metanolului. Aceste concluzii sunt susținute pe baza experimentelor bidimensionale RMN: ¹H/¹³C HMBC și ¹H/¹³C HSQC și DOSY.

Cuvinte-cheie: spectroscopia RMN, trans-resveratrol, acid L-ascorbic, acid dihidroxifumaric

NMR SPECTRAL DATA - NOTABLE TESTIMONY IN ANTIOXIDANT INTERACTIONS RESEARCH: CASE STUDIES OF SOME GRAPE METABOLITES

Summary. Current research portrays the natural antioxidant systems in wine: trans-resveratrol-L-ascorbic acid and dihydroxyfumaric acid-L-ascorbic acid, in an attempt to model and elucidate plausible interactions between naturally occurring antioxidants in grapes and wine based on of the scavenging activity of 1,1-diphenyl-2-

picrylhydrazyl (DPPH•) radicals by the named antioxidants and relying on ^{13}C and ^1H NMR spectroscopy data as a method of investigation. The evidence provided by the NMR experiments was compared with the UV-VIS spectroscopy data. For the trans-resveratrol-L-ascorbic acid system, based on the ^{13}C NMR method, the formation of trans-resveratrol oligomers (viniferins) was demonstrated as an effect of oxidation, in a process assisted by DPPH•. By comparing the ^{13}C NMR spectral results with the UV-VIS data, it was established that pronounced synergistic effects in the mentioned system are present precisely in the experimental cases for which the presence of viniferins was attested. For the dihydroxyfumaric acid-L-ascorbic acid system, the oxidation of dihydroxyfumaric acid to diketosuccinic acid, described in the literature, was not attested. Instead, through ^1H and ^{13}C NMR spectral studies, it was established that as a result of the interaction of dihydroxyfumaric acid with DPPH•, acid degradation occurs. The exact identification of the products of the transformation of dihydroxyfumaric acid was hindered by the secondary processes involved, with the major involvement of dihydroxyfumaric acid, namely the polymerization of acetone, triggered by dihydroxyfumaric acid, with the participation of methanol. These conclusions are supported on the basis of two-dimensional NMR experiments: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC and DOSY.

Keywords: NMR spectroscopy, trans-resveratrol, L-ascorbic acid, dihydroxyfumaric acid

1. INTRODUCERE

Din clasa compușilor fenolici naturali, *trans*-resveratrolul (tRes) este unul dintre cei mai cunoscuți reprezentanți ai stilbenoidelor care este larg răspândit în fructe, legume și leguminoase, fructele cu cel mai mare conținut de tRes fiind strugurii. Acest compus își datorează faima unei multitudini de proprietăți biologice [1-4]. Cele mai recente date dovedesc că tRes este unul dintre cele mai eminente vehicule anti-îmbătrânire care reglează inflamațiile, inclusiv unele dintre procesele neurodegenerative inflamatorii severe și îmbunătățește stresul oxidativ prin calea de semnalizare Nrf2 [5,6]. Acidul *L*-ascorbic (AA) este unul dintre cei mai studiați antioxidanți naturali hidrosolubili. Posedă activitate antioxidantă foarte puternică împotriva diferitelor tipuri de radicali liberi, fiind un captator primar al speciilor de radicali. Prin urmare, AA este utilizat în mod obișnuit ca compus de referință atunci când se studiază activitatea antioxidantă a altor biomolecule active. În vinuri, AA este prezent, fiind adăugat în timpul procesului de vinificație, deoarece este bine-cunoscută contribuția sa pozitivă asupra calității băuturii și, respectiv, asupra capacității antioxidante totale a vinurilor.

Acidul dihidroxifumaric (DHF) este un compus natural descoperit în anul 1890 ca produs de oxidare al acidului tartric [7]. În cantități mici, se găsește în struguri, fiind implicat în metabolismul fructelor în perioada de coacere [8]. Datorită fragmentului enediolic, DHF

prezintă un caracter deoportivă nucleofil și electrofil, în susținerea „scenariului glioxilat” [9], potrivit căruia DHF servește în calitate de compus inițial pentru formarea unei varietăți de molecule biogene [10]. Pe de altă parte, a fost demonstrat că DHF posedă activitate antioxidantă puternică împotriva DPPH• în solvenți alcoolici și în matricea de vin [11], având putere antiradicalică similară cu cea a AA. În virtutea reactivității ridicate a DHF, în condiții aerobe și în medii acide, acest compus decarboxilează ușor, formând glicolaldehidă [12].

Spectroscopia ^{13}C RMN a fost recent documentată ca un instrument eficient pentru clarificarea mecanismelor moleculare care stau la baza activităților antioxidante și de eliminare a radicalilor polifenolilor în ceai, această abordare servind la baza studiilor prezentate mai jos [13].

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Această investigație prezintă sistemele: tRes – AA și DHF-AA, având ca obiective modelarea și clarificarea interacțiunilor posibile dintre antioxidanții care se găsesc în mod natural în struguri, pe baza activității de captare a DPPH• de către antioxidanții numiți și bazându-se pe datele spectroscopiei ^{13}C și ^1H RMN ca metodă de cercetare. Dovezile oferite de experimentele RMN au fost confruntate cu datele spectroscopiei UV-Viz.

Sistemul tRes-AA

În literatura de specialitate a fost sugerat un singur mecanism, care implică transferul de electroni, explicând rolul tRes în asigurarea protecției împotriva leziunilor oxidative [14], bazat pe utilizarea metodelor chimice cuantice de înaltă precizie. În studiul realizat de M. A. Hussein este atestată capacitatea puternică a tRes de a capta radicalii liberi folosind diferite teste și a fost propus un mecanism de activitate antioxidantă a tRes bazându-se pe delocalizarea electronilor între cele două inele fenolice furnizând o structură tRes-chinonă [15]. Aceste considerații nu contrazic căile biosintetice ipotetice implicate în oligomerizarea tRes [16]. Astfel, s-a presupus că în natură, radicalii fenoxil generați în mod oxidativ mediază oligomerizarea tRes, producând viniferine, așa cum au propus inițial P. Langcake și R. Pryce [16]. În ceea ce privește reacția tRes – DPPH•, sunt cunoscute unele date literare care descriu diverși produși finali de oligomerizare ai tRes, numiți viniferine, ca rezultat al oxidării tRes [17].

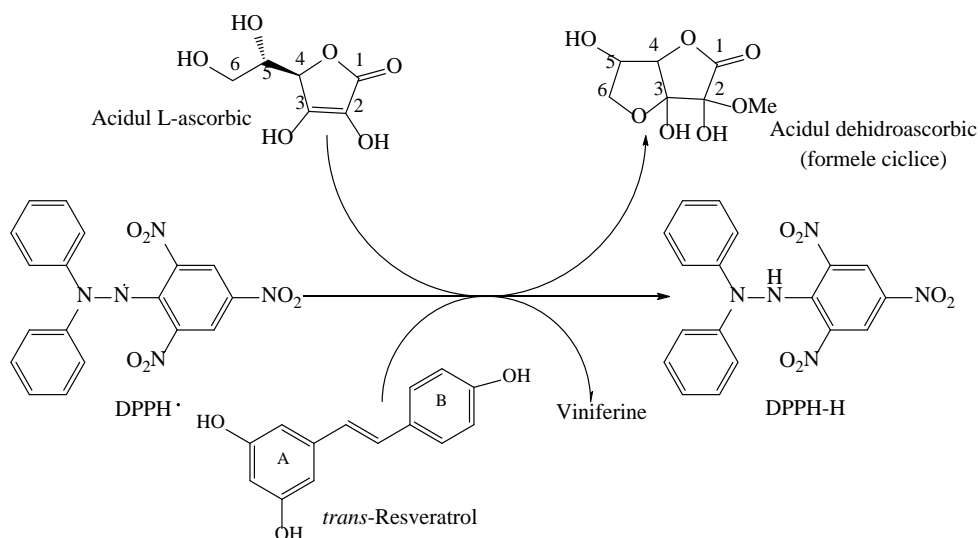
Au fost descrise interacțiunile antioxidante (AI) dintre tRes și AA, dovezile disponibile indicând despre unii factori care influențează semnificativ AI, cum ar fi: metoda utilizată, concentrația, solventul, condițiile de reacție etc [1,2]. Villano și col. au folosit tehnica spectrofotometrică UV-Viz pentru a determina abilitățile de captare a radicalilor de către unii polifenoli din vin, raportând următoarele stoichiometrii totale de reacție: valoarea 2.6 pentru interacțiunea AA cu DPPH• și 1.0 pentru interacțiunea tRes cu DPPH• [18].

Pentru modelarea interacțiunilor în sistemul cercetat, reacția AA și tRes cu radicalul DPPH a fost realizată direct în fiola pentru analiza RMN, în amestecul solvenților acetonă- d_6 -metanol- d_4 (din considerente de solubilitate diferită a reactanților). A fost cercetată stoechiometria AA : tRes : DPPH (1:1:2.6), datele fiind comparate cu experimentele ^{13}C RMN obținute în condițiile deficienței de radical liber - AA : tRes: DPPH (1:1:1). Au fost urmate două protocoale de realizare a reacției antioxidanților cu DPPH, care au precedat analiza ^{13}C RMN:

1) mixarea ambilor antioxidanți simultan cu radicalul liber (DPPH)- durata reacției – 1 oră;

2) mixarea Res cu radicalul DPPH- durata reacției -1 oră, apoi adăugarea AA- durata reacției 15 min.

Spectrele ^{13}C RMN au fost înregistrate la un spectrometru Bruker AVANCE 400 echipat cu o sondă inversă de bandă largă de 5 mm cu gradient de câmp z, care operează la 400.13 și 100.61 MHz pentru nucleele ^1H și, respectiv, ^{13}C , la 25 °C. Pentru spectrele ^{13}C RMN au fost înregistrate 10240 de scanări. Deplasările chimice (δ) sunt prezentate în părți per milion (ppm) și sunt raportate față de semnalul rezidual nedeuterat al metanol- d_4 (3.31 ppm pentru nucleele ^1H și 49.0 ppm pentru ^{13}C , respectiv). Schema 1 ilustrează procesele propuse care au loc în timpul captării speciilor DPPH $^{\bullet}$ de către AA și tRes.



Schema 1. Anihilarea radicalilor DPPH de către AA și tRes

Pentru a facilita analiza datelor ^{13}C RMN și pentru a evita confuziile, privind atribuirea semnalelor, au fost alese următoarele picuri caracteristice pentru identificarea compușilor: AA- 64.3 ppm, acid dehidroascorbic (DAA)- 89.9 ppm, tRes-117.1 ppm, DPPH-H-122.1 ppm, oligomerul tRes (viniferină) - 58.9 ppm (Figura 1).

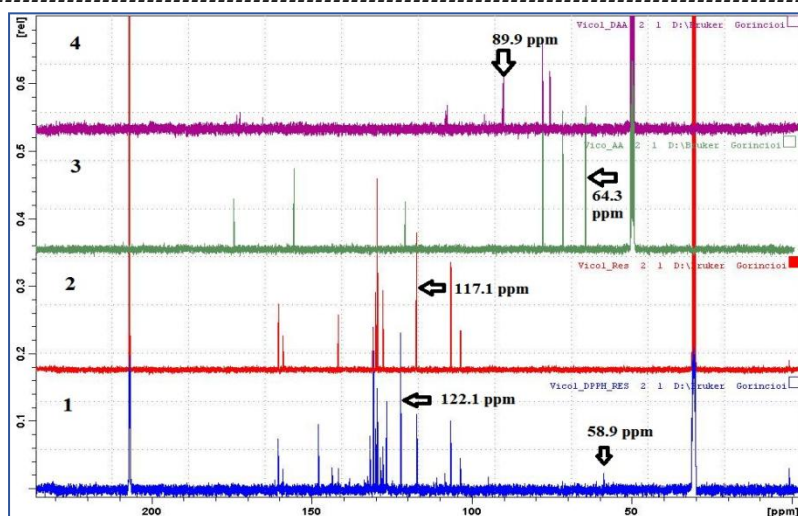


Fig. 1. Spectrele ^{13}C RMN: 1) reacția tRes cu radicalul liber DPPH, 1:1 raport molar, 25°C , 1hr., acetonă- d_6 ; 2) tRes în acetonă- d_6 ; 3) AA în metanol- d_4 ; 4) DAA în metanol- d_4 .

Este interesant de menționat, că în toate cazurile examinate, urmând diferite abordări, care au fost sus-numite și stoechiometrie diferită, în spectrele ^{13}C RMN nu au fost prezente semnalele tipice grupării carbonil, care ar caracteriza tRes-chinona (aproximativ la δ 180 ppm): nici pentru reacția tRes-DPPH (Figura 1, cazul 1), nici pentru celelalte reacții examinate (Figura 2, cazurile A, B și C). Astfel, oxidarea grupei hidroxil din inelul B al tRes nu a fost dovedită prin spectrele ^{13}C RMN, deci este exclusă. În schimb, semnalul la δ 58.9 ppm în regiunea tipică pentru unii oligomeri descriși ai tRes (viniferine) a fost detectat în spectru, Figura 2, cazul A [19-21]. Identificarea exactă a viniferinei a fost împiedicată de imposibilitatea de a reproduce exact condițiile măsurătorilor RMN descrise în literatură, inclusiv solvenul folosit și amestecul complex de reacție– în cazul nostru *versus* compușii puri descriși. Astfel, la interacțiunea inițială a tRes cu DPPH $^{\bullet}$, urmată de adăugarea AA (Figura 2, cazul A) în amestecul de reacție au fost identificați: viniferina, DPPH redus, precum și AA, de rând cu DAA, ceea ce confirmă, că raportul molar utilizat este insuficient pentru oxidarea totală a ambilor antioxidanți. Pe de altă parte, experiența ^{13}C RMN, în care este păstrată stoechiometria, dar modificată succesiunea interacțiunii antioxidanților cu DPPH, a confirmat datele privind rolul AA ca antioxidant de referință– în spectrul ^{13}C respectiv lipsesc picurile AA, fiind în schimb prezente picurile DAA (produsul captării radicalilor DPPH de către AA), fiind atestate și picurile tRes rămas netransformat (Figura 2, cazul B). Prin compararea reacțiilor cu varierea stoechiometriei (Figura 2, cazul C), urmând ambele căi de realizare a interacțiunilor, au fost confirmate concluziile sus-menționate.

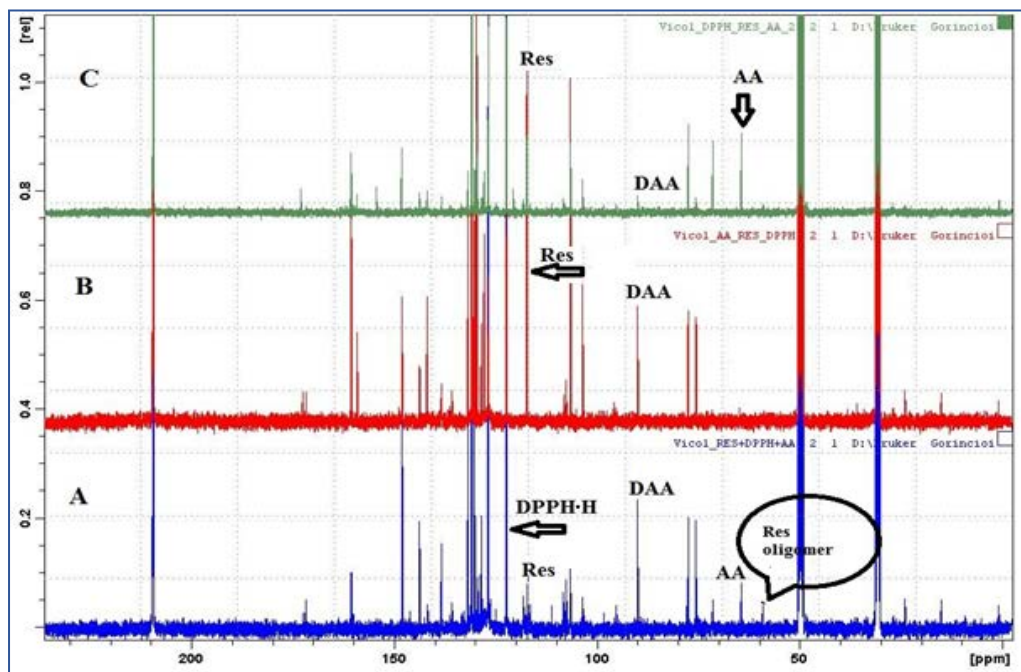


Fig. 2. Spectrele ^{13}C RMN: A) AA : tRes : DPPH (1:1:2.6) raport molar, al II-lea protocol; B) AA : tRes : DPPH (1:1:2.6) raport molar, I-ul protocol; C) AA : tRes : DPPH (1:1:1) raport molar, al II-lea protocol.

Este important de menționat, că și pentru derivații oligomerizați ai tRes sunt cunoscute efecte biologice remarcabile- targeting-ul structurilor ADN-ului duplex/G-cvadruplex, activitatea pronunțată antioxidantă, antiinflamatorie, anticancer, neuroprotectivă, antidiabetică, antiangiogenică, antiplasmodică, inhibiția xantin-oxidazei etc [17, 22, 23]. În Figura 3 sunt prezentate unele structuri de viniferine cunoscute.

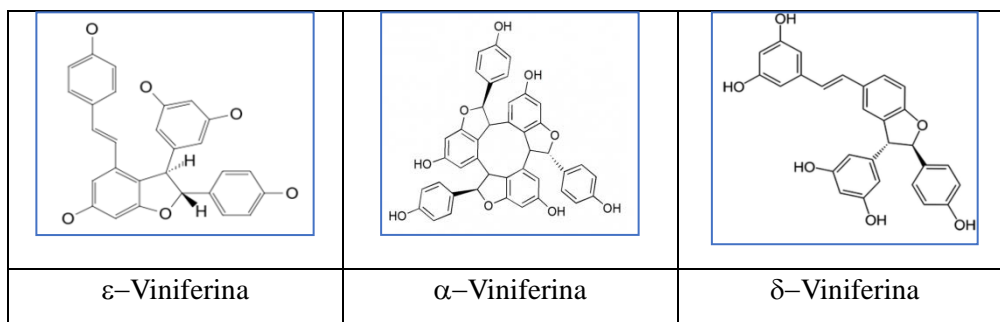


Fig. 3. Unele viniferine cunoscute

Merită să accentuăm că demonstrarea experimentală pe baza metodei ^{13}C RMN privind conversia tRes în viniferină(e) în condițiile sus-menționate are o relevanță deosebită tocmai în contextul propus inițial ca obiectiv al cercetării- stabilirea mecanismelor de interacțiune dintre antioxidanți numiți. Prin confruntarea datelor spectroscopiei ^{13}C RMN cu datele

spectroscopiei UV-Viz, ca metodă de referință, a fost demonstrat, că tocmai în condițiile experimentale relatate mai sus (Figura 2, cazul A) au fost fără dubii demonstrate importante efecte sinergice dintre tRes și AA. Prin urmare, anume prin formarea tRes-oligomerilor (viniferinelor) asistată de DPPH^{*} ca effect al oxidării tRes, prin urmarea protocolului II, în condițiile de stoechiometrie studiată – AA : tRes : DPPH (1:1:2.6) a fost demonstrată manifestarea sinergismului prin metoda UV-Viz, adică o activitate antioxidantă mai mare a combinației tRes – AA (datele privind aplicarea ambelor metode spectrale: RMN și UV-Viz pentru cercetarea sistemului tRes-AA, care confirmă fără dubii aceste concluzii sunt actualmente incluse într-un manuscris pregătit spre editare).

Cele mai recente date de literatură susțin rezultatele descrise de noi. Astfel, Mokrzyński și colaboratorii au folosit testul DPPH ca parte a unei abordări complexe dedicate evaluării impactului AA și tRes asupra leziunii oxidative mediate de materia particulată (PM_{2.5}) asupra celulelor HaCaT (linia celulară de keratinocite epidermice umane), ca model de epidermă [24]. A fost descoperit, că atât AA, cât și tRes, dar mai ales atunci când sunt aplicați în combinație, pot proteja celulele HaCaT împotriva toxicității UV și a luminii vizibile induse de PM_{2.5} prin eliminarea eficientă a radicalilor liberi și a oxigenului singlet produs de PM_{2.5}.

Rezultatele prezentate mai sus au fost diseminate la două evenimente științifice de prestigiu internaționale [25, 26].

Sistemul DHF-AA

În continuarea liniei de cercetări privind elucidarea posibilelor interacțiuni ale antioxidantilor din struguri/vin, am aplicat abordarea analitică sugerată de Sawai și col., care a folosit spectroscopia ¹³C RMN pentru determinarea proprietăților diferiților polifenoli din ceai pentru a se regenera reciproc, prin utilizarea testului DPPH [13]. Pentru modelarea interacțiunilor în sistemul cercetat, reacția AA și DHF cu DPPH^{*} a fost realizată direct în fiola pentru analiza RMN (*in situ*), în amestecul acelorași solvenți (acetonă-*d*₆-metanol-*d*₄), din aceleași considerente, relatate mai sus. Au fost urmate trei protocele de realizare a reacțiilor:

- I) Mixarea DHF cu radicalul liber DPPH (timp de reacție - 30 min.), apoi adăugarea AA (timp de reacție - 30 min.), analiza RMN, Figura 4, cazul F;
- II) Mixarea AA cu radicalul liber DPPH (timp de reacție - 10 min.), apoi adăugarea DHF (timp de reacție - 1 oră), analiză RMN, Figura 4, cazul D;
- III) Mixarea simultană a ambilor antioxidanți cu DPPH^{*} (timp de reacție - 30 min.), analiza RMN, Figura 4, cazul E. Au fost analizate rapoartele molare AA: DHF: DPPH (1:1:2), pe baza analizei datelor din literatură [18, 27].

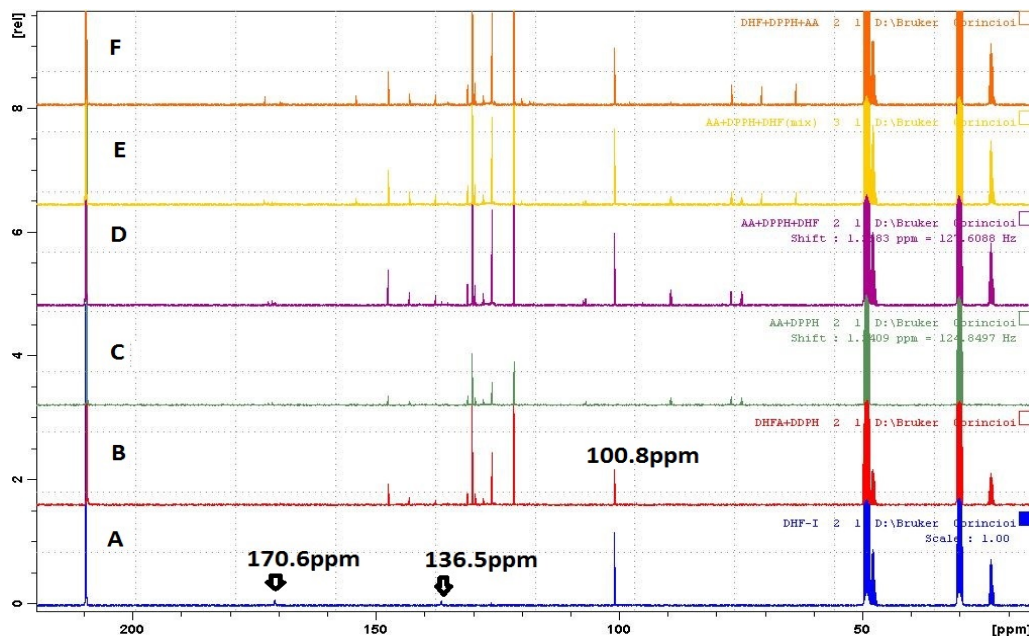


Fig. 4. Spectrele ^{13}C RMN ale DHF și L-AA în reacțiile studiate in situ

În primul rând, la începutul studiului, am constatat, că în spectrele ^{13}C RMN nu sunt prezente rezonanțele ^{13}C ale acidului diketosuccinic, nici în reacția DHF cu DPPH, nici în amestecurile de reacție (Figura 4, cazurile B, D-E). În plus, deși spectroscopia ^1H RMN nu este potrivită pentru investigațiile cu participarea DHF, am observat detalii interesante în timpul analizelor spectrelor ^1H RMN, care au fost susținute de experimentele ^{13}C RMN: apariția unor semnale suplimentare pentru solvenți: 3.12 ppm/47.7 ppm pentru metanol și 1.25 ppm/23.4 ppm pentru acetonă față de semnalele uzuale ale solventului: 3.31 ppm/49.0 ppm și 2.12 ppm/30.0 ppm (Figurile 4-6).

În spectrele ^{13}C RMN au fost prezente, de asemenea, rezonanțe neașteptate la 100.8 ppm (Figurile 4 și 7). Semnalele „ciudate” sunt prezente în spectrele ^1H și ^{13}C RMN chiar și în cazul în care numai pentru DHF au fost efectuate experimente în amestecul solvenților menționați (Figurile 4-6, cazul A), precum și în cazul interacțiunii acestuia cu DPPH• (Figura 4, cazul B; Figura 5, cazul D și Figura 6, cazul E) și în toate cazurile când au fost utilizați ambii antioxidanți (Figura 4, cazurile D-F; Figura 5, cazurile B, C, E; Figura 6, cazurile B,D,F), iar în reacția AA cu DPPH, aceste semnale din spectrele corespunzătoare sunt absente (Figura 4, cazul C; Figura 5, cazul D; Figura 6, cazul C).

Trebuie să menționăm, că în spectrele ^{13}C RMN care au fost raportate de Saway și col., care au fost obținute în urma studiului antioxidanților din ceai prin utilizarea ambilor solvenți deuterati, deasemenea a fost atestată și prezența semnalelor de solvenți suplimentare menționate mai sus de noi, dar aceste date nu au fost comentate, în timp ce semnalul la 100.8 ppm a fost atribuit atomului de carbon 4a al (+)-catehinei [28].

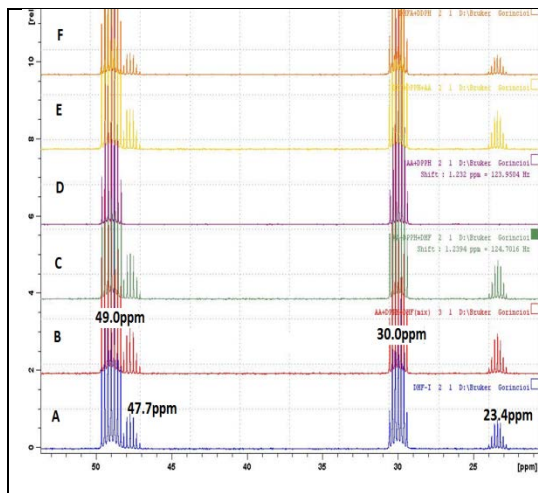


Fig. 5. Regiunea picurilor solventului în spectrele ^{13}C RMN pentru reacțiile studiate in situ

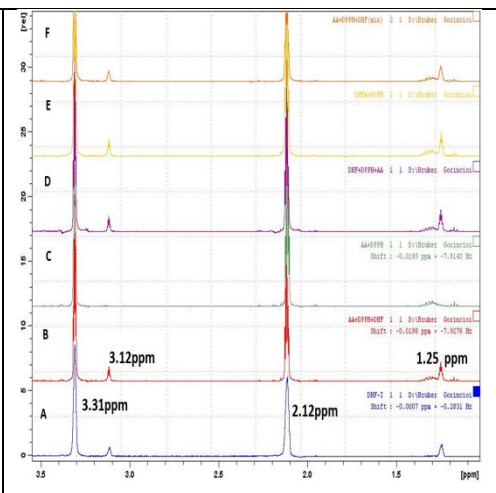


Fig. 6. Regiunea picurilor solventului în spectrele ^1H RMN pentru reacțiile studiate in situ

Astfel, rezultatele obținute pot servi ca un indiciu clar, că anume DHF, și nu AA, este implicat atât în setul dublu de semnale ale solventilor, prezent în spectre ^1H și ^{13}C , cât și semnalul puternic la 100.8 ppm în spectrele ^{13}C respective. Rezonanța la 100.8 ppm se găsește în spectre în imediata apropiere a semnalelor epimerice biciclice ai acidului dehidroascorbic la 106.8 ppm și 107.3 ppm [28] descriși de Saway (Figurile 7,8 și Schema 2). Natura cetalică a atomului de carbon la 100.8 ppm este sugerată de datele disponibile din literatură [29]. Pentru elucidarea definitivă a problemei menționate, au fost înregistrate spectrele RMN de heterocorelare 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC și $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC și au fost efectuate, de asemenea, experimente DOSY RMN.

Datele obținute confirmă că toate semnalele neobișnuite în spectrele ^1H și ^{13}C aparțin aceleiași structuri. Pe baza acestor rezultate, presupunem că în condițiile cercetate a fost atestată polimerizarea acetonei, catalizată de DHF, cu formarea carbocationilor intermediari, precum este cunoscută reacția pentru aldehida formică. Polimerul obținut este stabilizat de grupările metil terminale, așa cum este evident din spectrul RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC, în care se găsește heterocorelația 3.12/100.8 (Figura 9). Structura plauzibilă pentru polimerul în discuție este ilustrată în Figura 10.

Pe baza spectrelor RMN DOSY, a fost calculată valoarea coeficientului de difuzie pentru structura polimerului propus, utilizând ecuația Stokes-Einstein [30], obținându-se o valoare de $1.945 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, față de valorile calculate pentru moleculele de referință- acetona- d_6 și metanol- d_4 în aceeași soluție- $2.692 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ și, respectiv, $2.239 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

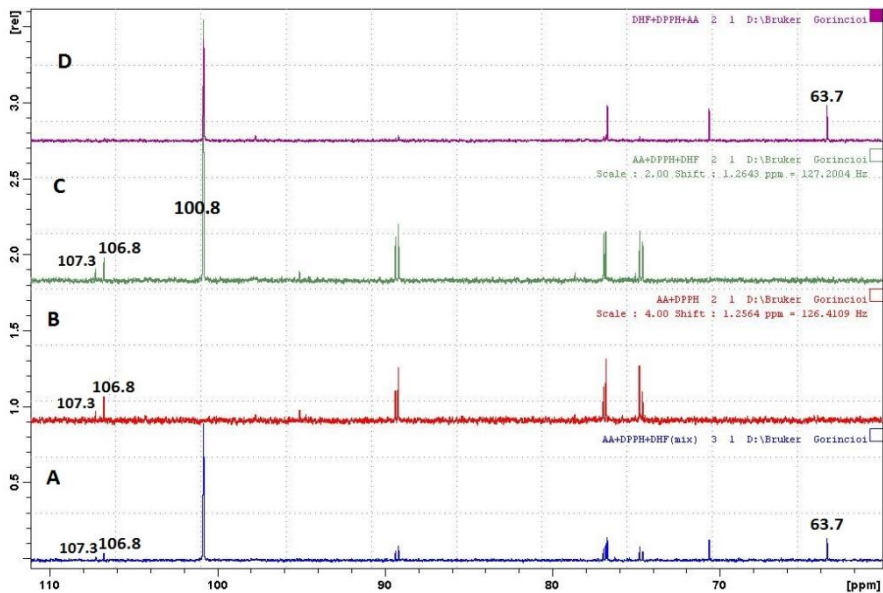
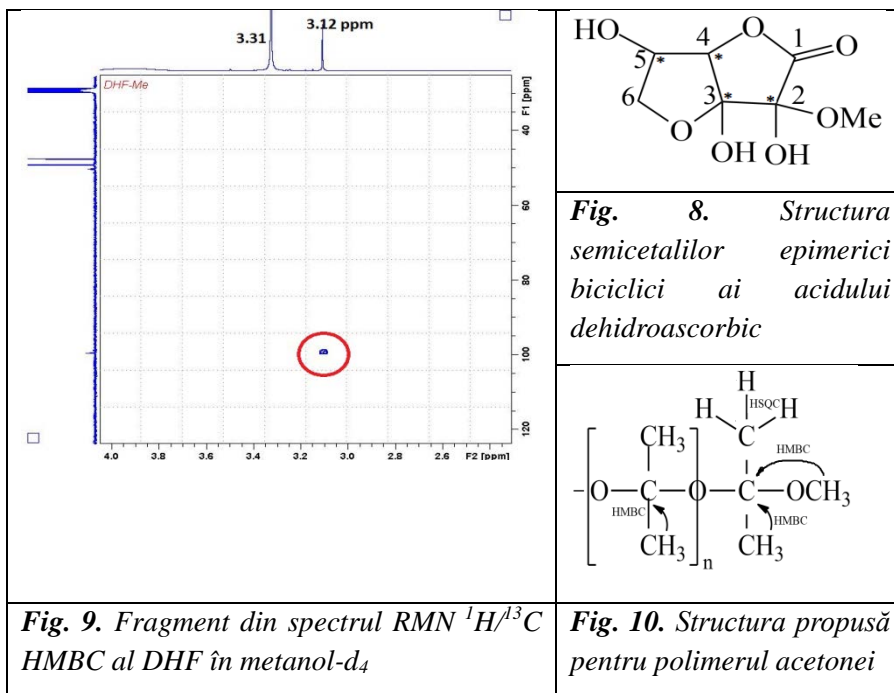


Fig. 7. Unele spectre ^{13}C RMN, regiunea selectată- 60-110 ppm



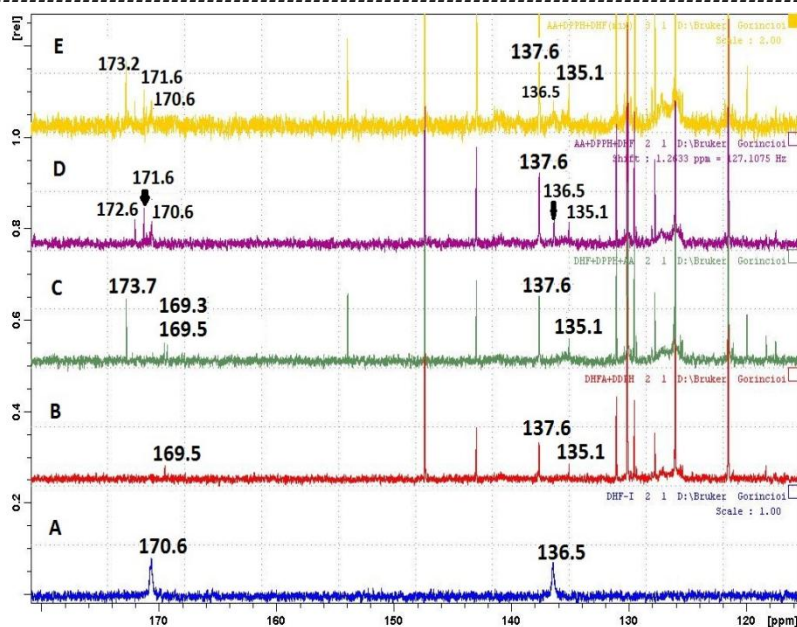
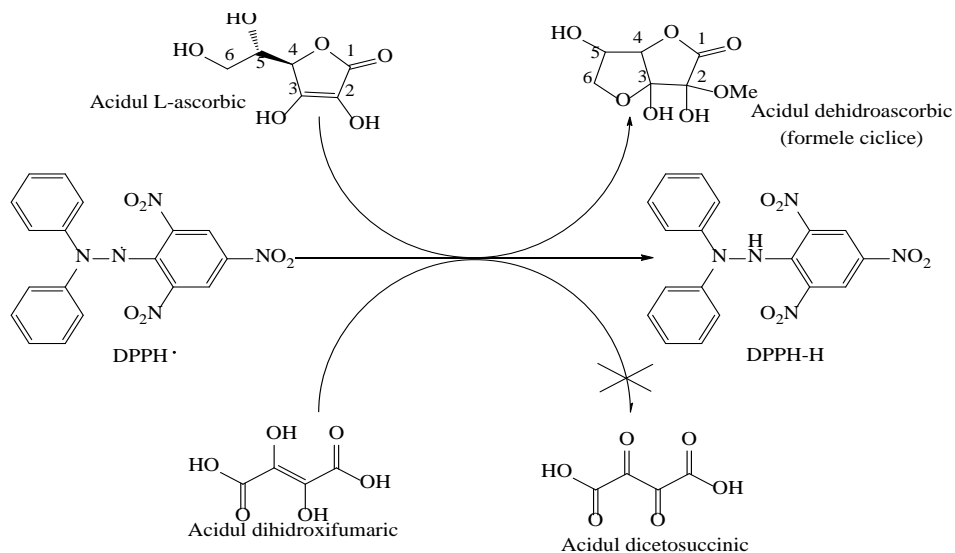


Fig. 11. Spectrele ^{13}C RMN ale DHF (cazul A) și reacțiile studiate *in situ*, regiunea de 120-175 ppm.

Pentru identificarea compușilor în reacțiile studiate *in situ* au fost alese următoarele picuri caracteristice: AA- 173.7, 63.7 ppm, DAA- 171.6 ppm, DHF- 170.6 și 136.5 ppm, DPPH- 137.6 (Figura 11).

Schema 2 ilustrează procesele generale de captare a radicalilor DPPH de către AA și DHF.



Schema 2. Anihilarea radicalilor DPPH de către L-AA și DHF

Unele concluzii care pot fi trase pe baza studiului ^1H și ^{13}C RMN privind sistemul investigat DHF-AA, sunt următoarele:

1) Nu a fost atestată oxidarea DHF până la acid dicetosuccinic, descrisă în literatură, nici prin reacția DHF cu radicalul liber DPPH, nici în combinație cu acidul ascorbic. A fost stabilit, că în urma interacțiunii cu radicalul DPPH are loc degradarea DHF. Această concluzie este susținută de înlocuirea rezonanțelor DHF în spectrele ^{13}C RMN (δ 136.5 și 170.6 ppm prin 135.1 și, respectiv, 169.6 ppm). Nu poate fi exclus faptul că are loc decarboxilarea DHF care este cunoscută în literatură, și alte transformări, fiind necesar un studiu de elucidare mai aprofundat.

2) În sistemul antioxidanților cercetați DHF-AA a fost semnalată polimerizarea acetonei, declanșată de DHF, cu participarea metanolului, ca proces secundar important, pe baza experimentelor 2D RMN: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC și $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC și DOSY, protocoalele I și III de studiu.

3) Captarea radicalilor liberi ai DPPH de către acidul ascorbic, urmat de participarea DHF la reacție (protocolul II de studiu), în amestecul solvenților metanol-acetonă, are loc ușor, așa cum s-a stabilit din analiza spectrelor ^{13}C RMN: semnalele caracteristice pentru nucleele de carbon din AA sunt înlocuite cu semnalele pentru DAA, adică radicalul DPPH este utilizat pentru oxidarea totală a AA, dar DHF suportă, de asemenea, parțial degradare (Figura 11, D).

4) La aplicarea protocolului III de conducere a reacției *in situ*, radicalul DPPH este consumat atât pentru degradarea DHF, cât și pentru oxidarea AA (Figura 11, E).

Rezultatele prezentate au fost diseminate la două evenimente științifice de prestigiu internaționale [31, 32].

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 BIBLIOGRAFIE

1. GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; BORRAS, C. Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015, 837042.
2. SKROZA, D.; ŠIMAT, V.; SMOLE MOŽINA, S.; KATALINIĆ, V.; BOBAN, N.; GENERALIĆ MEKINIĆ, I. Interactions of resveratrol with other phenolics and activity against food-borne pathogens. *Food Science & Nutrition*. 2019, 7(7), 2312-2318.

3. WANG, J.; ZHANG, X.; GAO, L.; WANG, L.; SONG, F.; ZHANG, L.; WAN, Y. The synergistic antifungal activity of resveratrol with azoles against *Candida albicans*. *Letters in Applied Microbiology*. 2021, 72(6), 688-697.
4. PLATELLA, C.; RAUCCI, U.; REGA, N.; D'ATRI, S.; LEVATI, L.; ROVIELLO, G. N.; MONTESARCHIO, D. Shedding light on the interaction of polydatin and resveratrol with G-quadruplex and duplex DNA: A biophysical, computational and biological approach. *International journal of biological macromolecules*. 2020, 151, 1163-1172.
5. SHAHCHERAGHI, S.H.; SALEMI, F.; SMALL, S.; SYED, S.; SALARI, F.; ALAM, W.; KHAN, H. Resveratrol regulates inflammation and improves oxidative stress via Nrf2 signaling pathway: Therapeutic and biotechnological prospects. *Phytotherapy Research*. 2023, 37(4).
6. SUZEN, S.; TUCCI, P.; PROFUMO, E.; BUTTARI, B.; SASO, L. A pivotal role of Nrf2 in neurodegenerative disorders: A new way for therapeutic strategies. *Pharmaceuticals*. 2022, 15(6), 692.
7. FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894, 65, 899-910.
8. DUCA, Gh. *Homogeneous catalysis with metal complexes: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media (Vol. 102), 2012. ISBN 978-3-642-24629-6.
9. ESCHENMOSER, A. On a hypothetical generational relationship between HCN and constituents of the reductive citric acid cycle. *Chemistry & biodiversity*. 2007, 4(4), 554-573.
10. WARD, G.; LIOTTA, C.L.; KRISHNAMURTHY, R.; FRANCE, S. Base-mediated cascade aldol addition and fragmentation reactions of dihydroxyfumaric acid and aromatic aldehydes: Controlling chemodivergence via choice of base, solvent, and substituents. *The Journal of Organic Chemistry*. 2018, 83(23), 14219-14233.
11. VICOL, C.; CIMPOIU, C.; DUCA, G. Investigation of synergic/anti-synergic interactions of dihydroxyfumaric acid and ascorbic acid with DPPH. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia*. 2021, 66(2), 49-58.
12. RICHTER, C.; BERNDT, F.; KUNDE, T.; MAHRWALD, R. Decarboxylative Cascade Reactions of Dihydroxyfumaric Acid: A Preparative Approach to the Glyoxylate Scenario. *Organic letters*. 2016, 18(12), 2950-2953.
13. SAWAI, Y.; MOON, J.H.; SAKATA, K.; WATANABE, N. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005, 53(9), 3598-3604.

14. LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food chemistry*. 2011, 125(2), 288-306.
15. AL-MAMARY, M.A.; MOUSSA, Z. Antioxidant activity: The presence and impact of hydroxyl groups in small molecules of natural and synthetic origin. *Antioxidants—Benefits, sources, mechanisms of action*. 2021, 318-377.
16. LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1977, 33, 151-152.
17. FULORIA, S.; SEKAR, M.; KHATTULANUAR, F.S.; GAN, S.H.; RANI, N.N.I. M.; RAVI, S.; FULORIA, N.K. Chemistry, biosynthesis and Pharmacology of viniferin: Potential resveratrol-derived molecules for new drug discovery, development and therapy. *Molecules*. 2022, 27(16), 5072.
18. VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 2007, 71(1), 230-235.
19. LIU, W.B.; HU, L.; HU, Q.; CHEN, N.N.; YANG, Q.S.; WANG, F.F. New resveratrol oligomer derivatives from the roots of *Rheum lhasaense*. *Molecules*. 2013, 18(6), 7093-7102.
20. MAO, Q. *The synthesis and antioxidant capacities of a range of resveratrol and related phenolic glucosides*: Doctoral dissertation, Univeristy of Adelaide, 2015, 184 p.
21. SHANG, Y.J.; QIAN, Y.P.; LIU, X.D.; DAI, F.; SHANG, X L.; JIA, W.Q.; ZHOU, B. Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: Influence of the solvent, radical, and substitution. *The Journal of organic chemistry*. 2009, 74(14), 5025-5031.
22. AGBADUA, O.G.; KÚSZ, N.; BERKECZ, R.; GÁTI, T.; TÓTH, G.; HUNYADI, A. Oxidized resveratrol metabolites as potent antioxidants and xanthine oxidase inhibitors. *Antioxidants*. 2022, 11(9), 1832.
23. PLATELLA, C., MAZZINI, S., NAPOLITANO, E., MATTIO, L. M., BERETTA, G. L., ZAFFARONI, N., DALLAVALLE, S. Plant-Derived Stilbenoids as DNA-Binding Agents: From Monomers to Dimers. In: *Chemistry—A European Journal*. 2021, 27(34), 8832-8845.
24. MOKRZYŃSKI, K.; KRZYSZTYŃSKA-KULETA, O.; WOJTALA, M.; WNUK, D.; SARNA, M.; SARNA, T. Can l-ascorbic acid and trans-resveratrol protect H a C a T cells from fine particulate matter toxicity?. *Photochemistry and Photobiology*. 2023, 1-18.

25. GORINCIOI, E.; VICOL, C.; BARBA, A.; DUCA, Gh. NMR spectral data as robust evidence in studies of the antioxidant's interplay: report on some grape metabolites. In: *The Central European NMR Symposium & Bruker Users Meeting 2023/solid-state NMR workshop*, Prague, Czech Republic. September 13-15, 2023, p. 35.
26. VICOL, C.; GORINCIOI, E.; DUCA, Gh. ¹³C NMR Investigations Of Radical Scavenging Activities Of Ascorbic Acid And Resveratrol Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *XXIIIrd International Conference "New Cryogenic and Isotope Technologies for Energy and Environment" – EnergEn 2021*, Băile Govora, România, October 26-29, 2021, pp. 312-316. ISSN: 2810-3203
27. BOLOCAN, N. Stopped-flow spectrophotometric studies of the kinetics of interaction of dihydroxyfumaric acid with the DPPH free radical. *Chemistry Journal of Moldova*. 2010, 5(2), 83-87.
28. SAWAI, Y.; MOON, J.H. NMR analytical approach to clarify the molecular mechanisms of the antioxidative and radical-scavenging activities of antioxidants in tea using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(12), 6247-6253.
29. *Hans Reich's Collection: NMR Spectroscopy*, ©2023 [citat 10.10.2023]. Disponibil: https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/nmr/?index=nmr_in dex%2F13C_shift#pdata01.
30. WALDECK, A.R.; KUCHEL, P.W.; LENNON, A.J.; CHAPMAN, B.E. NMR diffusion measurements to characterise membrane transport and solute binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1997, 30(1-2), 39-68.
31. GORINCIOI, E.; VICOL, C.; BARBA, A.; DUCA, Gh. Preliminary Results on ¹³C NMR Studies regarding the Radical Scavenging Activities Of Ascorbic Acid And Dihydroxyfumaric Acid Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. In: *Abstract book of the 7th International Conference ECOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY-2022*, Chisinau, Republic of Moldova, March 3-4, 2022, pag. 64. ISBN 978-9975-159-06-7.
32. VICOL, C.; GORINCIOI, E.; BARBA, A.; DUCA, Gh. Use of UV-Vis and NMR spectroscopies in studies of antioxidants' synergism involving ascorbic and dihydroxyfumaric acids. In: *Book of Abstracts Ed. a XXXVI-a a CONFERINȚEI NAȚIONALE DE CHIMIE CN-Chim-2022*, Călimănești – Căciulata, România, 4-7 octombrie, 2022, pag. 107.