

INSTITUTUL DE CHIMIE

Cu titlul de manuscris

C.Z.U: [544.222.3:544.4]:577.334(043.2)

BOLOCAN NATALIA

**CERCETAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIRADICALICE ALE
ACIDULUI DIHIDROXIFUMARIC ȘI A UNOR DERIVAȚI AI
SĂI CU APLICAREA METODELOR CINETICE ȘI
COMPUTAȚIONALE**

144.01 – CHIMIE FIZICĂ

Teză de doctor în științe chimice

Conducător științific



Duca Gheorghe, academician,
profesor universitar

Autor



Bolocan Natalia

CHIȘINĂU, 2023

© Bolocan Natalia, 2023

CUPRINS

ADNOTARE	5
ANNOTATION	6
АННОТАЦИЯ	7
LISTA TABELELOR	8
INTRODUCERE	17
1. ACIDUL DIHIDROXIFUMARIC: TRANSFORMĂRI CHIMICE, PARTICULARITĂȚI, IMPORTANȚA ÎN ORGANISMELE VII ȘI PROCESE TEHNOLOGICE	23
1.1. Formarea radicalilor liberi în organismele vii și alimente	23
1.2. Structura și transformările acidului dihidroxifumaric, aspecte generale	25
1.3. Acidul dihidroxifumaric în contextul chimiei biotice și prebiotice	30
1.3.1. Acidul dihidroxifumaric în sistemele biologice	30
1.3.2. Participarea DFH ₄ în formarea supramoleculilor în perioada prebiotică	33
1.4. Participarea acidului dihidroxifumaric în procesele oenologice	38
1.4. Utilizarea DFH ₄ pentru inhibiția procesului de formare a N-nitrozaminelor în sisteme model, <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>	40
1.5. Concluzii la capitolul 1	42
2. MATERIALE, ECHIPAMENT, METODE ȘI SINTEZA ORGANICĂ	43
2.1. Materiale și echipament	43
2.2. Metode experimentale de determinare a activității antioxidante/antiradicalice	43
2.3. Metoda stopped-flow de determinare a cineticii reacțiilor rapide în soluție	46
2.4. Calcule cuanto-chimice efectuate prin metoda DFT	48
2.6. Concluzii la capitolul 2	51
3. STUDIUL EXPERIMENTAL AL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A DFH ₄ ȘI A DERIVAȚILOR SĂI CU RADICALII DPPH• ȘI ABTS ^{•+}	52
3.1. Obținerea și caracterizarea derivaților sintetizați din DFH ₄	52
3.2. Determinarea activității antioxidante prin utilizarea radicalului DPPH•	61
3.3. Studiul legăturilor cinetice ce descriu reacțiile dintre acidul dihidroxifumaric și derivații aceștia cu radicalul DPPH•	66
3.4. Determinarea activității antioxidante prin utilizarea radical-cationului ABTS ^{•+}	76
3.5. Concluzii la capitolul 3	80
4. STUDIUL TEORETIC AL INTERACȚIUNII DFH ₄ ȘI A DERIVAȚILOR SĂI CU RADICALUL DPPH•	81
4.1. Identificarea izomerilor enediolici și cetonici ai DFH ₄ <i>in vacuo</i> și în apă	81

4.2. Studiu termodinamic și cinetic al izomerizării geometrice și tautomerizării celor mai stabili izomeri ai acidului dihidroxifumaric <i>in vacuo</i> și în solvent (apă).....	87
4.3. Descriptorii de reactivitate globală și validitatea procedurii KID	93
4.4. Funcțiile Fukui, Parr și indicele diferenței de reactivitate locală	98
4.5. Analiza comparativă a indicilor de reactivitate locală	102
4.6. Compușii cercetați prin prisma teoriei orbitalilor moleculari de frontieră	116
4.7. Determinarea mecanismului activității antioxidante a acidului dihidroxifumaric	124
4.8. Estimarea proprietăților farmaco-cinetice și de toxicitate a derivaților cercetați	127
4.8. Cercetarea computațională a efectului inhibitor al compușilor cercetați asupra virusului SARS-CoV-2	131
4.9. Concluzii la capitolul 4	1390
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	141
BIBLIOGRAFIA	143
ANEXE	154
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	15455
CV-ul CANDIDATULUI	1566
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘTIINȚIFICE	158

ADNOTARE

Bolocan Natalia „Cercetarea proprietăților antiradicalice ale acidului dihidroxifumaric și a unor derivați ai săi cu aplicarea metodelor cinetice și computaționale”, teză de doctor în științe chimice, mun. Chișinău, Republica Moldova, 2022

Structura tezei: Teza constă din introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, 155 referințe bibliografice, 127 pagini cu text de bază, 77 figuri, 28 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 18 lucrări științifice, dintre care 9 articole.

Cuvinte-cheie: acid dihidroxifumaric, antioxidant, sinteza organică, derivați noi, activitate antiradicalică, DPPH radical, ABTS^{•+} cation radical, stop-flow, calcule computaționale, reactivitate globală/locală, orbitali HOMO/LUMO, modelare ADMET, andocare moleculară.

Scopul tezei: constă în cercetarea prin metode cinetice și cuanto-chimice a activității antiradicalice a acidului dihidroxifumaric și a zece derivați ai săi, obținuți în cadrul acestei lucrări.

Obiectivele cercetării: obținerea și caracterizarea derivaților noi ai DFH₄; determinarea activității antioxidante/antiradicalice prin utilizarea radicalilor DPPH[•] și ABTS^{•+}; studiul legăturilor cinetice ce descriu reacțiile dintre DFH₄ și derivații acestuia cu radicalul DPPH[•]; cercetări cuanto-chimice a izomerizării și tautomerizării DFH₄ în diferite medii; calculul descriptorilor de reactivitate globală și locală a DFH₄ și derivaților săi; estimarea prin metode computaționale a proprietăților farmaco-cinetice și de toxicitate a derivaților cercetați, modelarea efectului inhibitor asupra virusului SARS-CoV-2 utilizând metoda andocării moleculare.

Noutatea și originalitatea științifică: constă în obținerea a zece derivați ai DFH₄ (dintre care 9 sunt derivați noi) cu proprietăți antiradicalice, cu potențial de utilizare în diferite ramuri ale industriei, precum industria alimentară, viti-vinicola și farmaceutică. Cercetările cuanto-chimice au permis identificarea, pentru prima dată a celor trei izomeri ai DFH₄ și abundența lor în diferite medii. Au fost utilizate metode computaționale de precizie a proprietăților farmaco-cinetice, de toxicitate și biodisponibilitate pentru substanțele cercetate, a fost demonstrat computațional efectul inhibitor al compușilor cercetați asupra virusului SARS-CoV-2.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante: constau în sinteza a zece derivați ai DFH₄ cu proprietăți antioxidante/antiradicalice, și stabilirea experimentală a legăturilor cinetice de interacțiune a acestor compuși cu radicalul DPPH[•], precum și studiul cuanto-chimic a structurii electronice și proprietăților acestor compuși. În plan practic, aceste rezultate se înscriu în direcția de obținere a derivaților cu proprietăți antioxidante/antiradicalice din produsele secundare vinicole, cu potențial de utilizare în industria alimentară, viti-vinicola și farmaceutică.

Semnificația teoretică: Rezultatele cercetării contribuie la fundamentarea cunoștințelor în domeniul cineticii chimice a reacțiilor dintre antioxidanți și radicalii DPPH[•] și ABTS^{•+}. S-a confirmat posibilitatea obținerii derivaților cu caracteristici antioxidante pe bază de DFH₄, lărgind astfel baza compușilor cu potențial aplicativ în diferite industrii. Cercetările computaționale demonstrează potențialul de aplicare al metodelor teoretice și predictive în etapele de design și obținere a noilor derivați cu proprietăți dirijate.

Valoarea aplicativă: în ultimii ani, un accent deosebit se pune pe dezvoltarea durabilă și asigurarea sănătății populației, inclusiv prin siguranța medicamentelor și a alimentelor, astfel că obținerea substanțelor noi cu caracter antioxidant/antiradicalic pe baza compușilor naturali este o direcție de mare interes și potențial aplicativ. În cadrul cercetării au fost obținuți nouă derivați noi pe bază de DFH₄, dintre care patru compuși posedă activitate antioxidantă/antiradicalică pronunțată față de radicalii DPPH[•] și ABTS^{•+} demonstrată experimental, și proprietăți similare medicamentelor (inclusiv farmaco-cinetice, de biodisponibilitate și toxicitate) precise prin metode computaționale. Toți compușii cercetați au demonstrat o bună afinitate de legare cu proteaza principală a virusului SARS-CoV-2, subliniind posibilitatea de utilizare a lor pentru combaterea acestui virus.

Implementarea rezultatelor științifice: Lucrarea a servit drept bază pentru dezvoltarea direcției de cercetare a reacțiilor dintre substanțe cu caracter antioxidant/antiradicalic cu DPPH[•] și ABTS^{•+} în cadrul Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică. Rezultatele obținute pot fi interesante pentru firmele farmaceutice, pentru producătorii aditivilor alimentari. Metodele computaționale moderne utilizate în premieră în cadrul Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică vor contribui la fundamentarea cunoștințelor studenților/masteranzilor/doctoranzilor cu privire la modelele teoretice disponibile pentru cercetarea și prognozarea reactivității substanțelor chimice de interes.

ANNOTATION

Bolocan Natalia “Research of the antiradical properties of dihydroxyfumaric acid and some of its derivatives with the application of kinetic and computational methods”, doctoral thesis in chemical sciences, mun. Chisinau, Republic of Moldova, 2022

Thesis structure: The thesis consists of an introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, 155 bibliographic references, 127 pages with basic text, 77 figures, 28 tables. The results are published in 18 scientific papers, of which 9 are articles.

Keywords: dihydroxyfumaric acid, antioxidant, organic synthesis, new derivatives, antiradical activity, DPPH[•], ABTS^{•+}, stop-flow, computational calculations, global/local reactivity, HOMO/LUMO orbitals, ADMET profiling, molecular docking.

The aim of the thesis: consists in the research by kinetics and quantum-chemical methods of the antiradical activity of dihydroxyfumaric acid and its derivatives, obtained by the author herein.

Research objectives: obtaining and characterizing new derivatives of DFH₄; determination of antioxidant/antiradical activity using the radicals DPPH[•] and ABTS^{•+}; study of the kinetic laws describing the reactions between DFH₄ and its derivatives with DPPH[•]; quantum-chemical research of the isomerization and tautomerization processes of DFH₄ in different media; calculation of the global and local reactivity descriptors of DFH₄ and its derivatives; estimation by computational methods of the pharmacokinetic and toxicity properties of the researched derivatives, modeling of the inhibitory effect on the SARS-CoV-2 main protease using the molecular docking method.

Scientific novelty and originality: lies in the synthesis of ten new DFH₄ derivatives with antiradical properties, with potential for use in the food, wine-making and pharmaceutical industries. Quantum chemical research has identified, for the first time, the most stable three isomers of DFH₄ and their abundance in different environments. Computational methods were used to predict the pharmacokinetic, toxicity and bioavailability properties of the investigated substances, the inhibitory effect of the investigated compounds on the SARS-CoV-2 main protease was demonstrated computationally.

The obtained results that contribute to the solution of an important scientific problem: consist in the synthesis of ten DFH₄ derivatives (of which 9 are new) with antioxidant/antiradical properties, and the experimental establishment of the kinetic laws of interaction of these compounds with the radical DPPH[•], as well as the quantum chemical study of the electronic structure and properties of these compounds. In practical terms, these results are in strong connection with the direction for obtaining derivatives with antioxidant properties from wine by-products, with potential for use in pharmaceutical and food industries.

Theoretical significance: the research results contribute to the substantiation of knowledge in the field of chemical kinetics of the reactions between antioxidant compounds and DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals. The results confirmed the possibility of obtaining derivatives with antioxidant/antiradical characteristics based on DFH₄, thus broadening the base of compounds with potential applications in industry. The results of computational research demonstrated the potential for the application of theoretical and predictive methods in the design stages of new compounds with useful properties.

Applicability: in recent years, a special emphasis is placed on sustainable development and ensuring the health of the population, including through the safety of medicines and food, so obtaining new substances with an antioxidant/antiradical character based on natural compounds is a direction of great interest and application potential. In this research, nine new DFH₄ based derivatives were obtained, of which four compounds have experimentally demonstrated pronounced antioxidant/antiradical activity in DPPH[•] and ABTS^{•+} tests, and significant computationally predicted drug-like properties, including pharmacokinetic and toxicity properties, as well as good bioavailability. All investigated compounds demonstrated a good binding affinity with the main protease of the SARS-CoV-2 virus, underlining the possibility of their use to combat this virus.

Implementation of scientific results: This research served as the basis of the research direction regarding the reactions between antioxidant/antiradical substances with DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals within the Laboratory of Physical and Quantum Chemistry. The results obtained can be interesting for pharmaceutical companies, for food additive manufacturers. The quantum chemical methods used for the first time in the Physical and Quantum Chemistry Laboratory will contribute to the substantiation of students knowledge on the theoretical models available for the research and design of the reactivity of chemicals of interest.

АННОТАЦИЯ

Болокан Наталья «Исследование антирадикальных свойств диоксифумаровой кислоты и некоторых ее производных с применением кинетических и вычислительных методов», докторская диссертация по химическим наукам, мун. Кишинев, Республика Молдова, 2022

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, четырех глав, общих выводов и рекомендаций, 155 библиографических ссылок, 127 страниц основного текста, 77 рисунков, 28 таблиц. Результаты опубликованы в 18 научных работах, из которых 9 статей.

Ключевые слова: дигидроксифумаровая кислота, антиоксидант, органический синтез, новые производные, антирадикальная активность, радикал DPPH[•], ABTS^{•+} катион-радикал, stop-flow, расчётные методы, глобальная/локальная реакционная способность, НОМО/LUMO орбитали, молекулярный докинг.

Цель диссертации: заключается в исследовании кинетическими и квантохимическими методами антирадикальной активности диоксифумаровой кислоты и десяти ее производных, полученных автором.

Задачи исследования: получение и характеристика новых производных DFH₄; определение антиоксидантной активности с использованием радикалов DPPH[•] и ABTS^{•+}; изучение кинетических закономерностей, описывающих реакции DFH₄ и его производных с радикалом DPPH[•]; квантово-химические исследования процессов изомеризации и таутомеризации DFH₄ в различных средах; расчёт глобальных и локальных дескрипторов реактивности DFH₄ и его производных; оценка расчётными методами фармако-кинетических и токсических свойств исследуемых производных, моделирование ингибирующего действия на вирус SARS-CoV-2 методом молекулярного докинга.

Научная новизна и оригинальность: заключается в получении десяти новых производных DFH₄ с антирадикальными свойствами, перспективных для использования в различных отраслях таких как пищевая, винодельческая и фармацевтическая промышленность. Квантово-химические исследования впервые выявили три самых стабильных изомера DFH₄ и их распространенность в различных средах. Использованы вычислительные методы прогнозирования фармако-кинетических, токсических свойств и биодоступности исследуемых веществ, было продемонстрировано расчетным путем ингибирующее действие исследуемых соединений на вирус SARS-CoV-2.

Полученные результаты, способствующие решению важной научной задачи: заключаются в синтезе девяти новых производных DFH₄, обладающих антиоксидантными/антирадикальными свойствами, в экспериментальном установлении кинетических закономерностей взаимодействия этих соединений с радикалом DPPH[•], а также в квантово-химическом изучении электронной структуры и свойств этих соединений. В практическом плане эти результаты тесно связаны с направлением получения производных с антиоксидантными/антирадикальными свойствами из остаточных продуктов виноделия, с потенциалом использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

Теоретическая значимость: результаты исследований способствуют обоснованию знаний в области химической кинетики реакций антиоксидантных соединений с радикалами DPPH[•] и ABTS^{•+}. Полученные результаты подтвердили возможность получения производных с антирадикальными свойствами на основе DFH₄, что расширило круг соединений с потенциалом применения в промышленности. Результаты вычислительных исследований демонстрируют возможность применения теоретических методов прогнозирования на этапах конструирования новых производных с желаемыми свойствами.

Применимость: В последние годы особое внимание уделяется устойчивому развитию и обеспечению здоровья населения, в том числе за счет безопасности лекарственных средств и продуктов питания, поэтому получение новых веществ с антиоксидантными свойствами на основе природных соединений является направлением, представляющим большой интерес и прикладной потенциал. Автором получено 9 новых производных на основе DFH₄, из которых 4 соединения экспериментально продемонстрировали выраженную антирадикальную активность и предсказанные расчетным путем лекарственные свойства, включая фармако-кинетические и токсические свойства, а также хорошую биодоступность. Все исследованные соединения продемонстрировали хорошее связывание с основной протеазой вируса SARS-CoV-2, что подчеркивает возможность их использования для борьбы с этим вирусом.

Внедрение научных результатов: Исследования привели к широкому развитию направления исследований реакций антиоксидантов с радикалами DPPH[•] и ABTS^{•+} в Лаборатории физической и квантовой химии. Полученные результаты могут быть интересны фармацевтическим компаниям, производителям пищевых добавок. Квантово-химические методы, впервые используемые в Лаборатории физической и квантовой химии, будут способствовать обоснованию знаний студентов/магистров/аспирантов о теоретических моделях, доступных для исследования и прогнозирования реакционной способности интересующих химических веществ.

LISTA TABELELOR

Tabelul 3.1. Rezultatele analizei compușilor sintetizați	58
Tabelul 3.2. Structurile, coeficienții de absorbție ε și valoarea maximului de absorbție	59
Tabelul 3.3. Clasificarea compușilor testați în dependență de legitatea cinetică în reacția cu DPPH*, cu valorile respective ale PAR, EC ₅₀ și constantei stoichiometrice	66
Tabelul 3.4. Ordinele de reacție parțiale și constantele de viteză ale compușilor studiați	76
Tabelul 3.5. Activitatea antioxidantă totală și TEAC pentru diferiți reducători	79
Tabelul 4.1. Energiile relative (kJ mol ⁻¹) față de cel mai stabil enediol (E1), a izomerilor enediolici (E1–E22) și cetonici (K1–K23) ai DFH ₄ la 298.15 K	84
Tabelul 4.2. Unele unghiuri (în °), lungimi de legătură (în Å) și momentele de dipol (în Debye) ale celor mai stabile structuri enediolice și cetonice ale DFH ₄	86
Tabelul 4.3. Energia de activare, E_a , energia liberă de activare Gibbs, ΔG^\ddagger (KJ·mol ⁻¹), și frecvențele imaginare, ν (cm ⁻¹), pentru unele interconversii ale enediolilor și ale formelor cetonice	89
Tabelul 4.4. Energia de activare, E_a , frecvența imaginară, ν (cm ⁻¹), și energia liberă de activare Gibbs, ΔG^\ddagger , pentru procesele de tautomerizare ceto-enolică a celor mai stabile trei forme enediolice, în vid și în apă	91
Tabelul 4.5. 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 ⁻¹ iar constantele de viteză în s ⁻¹	92
Tabelul 4.6. Energiile electronice în hartree, ale compușilor studiați, în vid, apă și metanol	96
Tabelul 4.7. Energiile orbitalilor HOMO și LUMO (în eV), diferența HOMO–LUMO $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ (eV), potențialele de ionizare I și afinitățile electronice A (în eV), și electronegativitatea globală χ (in eV), electrorigiditatea totală η (în eV), și electrofilicitatea globală ω (în eV) a compușilor studiați, în vid, apă și metanol	97
Tabelul 4.8. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de acid DFH ₄ 1, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară	103
Tabelul 4.9. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de EDM 2,	

	calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	104
Tabelul 4.10.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de anilidă 5, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	105
Tabelul 4.11.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 6, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	107
Tabelul 4.12.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de MBD 12, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	108
Tabelul 4.13.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de BBD 13, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	110
Tabelul 4.14.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă MEAD 7, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	111
Tabelul 4.15.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă MPAD 8, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	112
Tabelul 4.16.	Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 9, calculate <i>in vacuo</i> , în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară.....	114

- Tabelul 4.17. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 10, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară..... 115
- Tabelul 4.18. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 11, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară..... 116
- Tabelul 4.19. Orbitalii moleculari HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 pentru izomerii E2 și E3 ai acidului DFH₄, precum și formele lor disociate..... 119
- Tabelul 4.20. Orbitalii moleculari de frontieră HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 pentru derivații cercetați, în apă și metanol.....122
- Tabelul 4.21. Valorile calculate ale BDE, IP, PDE, PA, și ETE (kJ·mol⁻¹) pentru izomerii DFH₄ și speciile anionice respective *in vacuo* și în apă..... 126
- Tabelul 4.22. Proprietățile de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate (ADMET) pentru compușii cercetați: (1) acidul DFH₄ 1; (2) esterul EDM 2; (5) anilida 5; (6) fumaramida 6; (7) MEAD 7; (8) MPAD 8; (9) fumaramida 9; (10) fumaramida 10; (11) fumaramida 11; (12) MBD 12; (13) BBD 13..... 128
- Tabelul 4.23. Rezultatele andocării moleculare a compușilor cercetați la proteaza principală a virusului SARS-COV-2..... 133

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1. Reprezentarea schematică a tautomeriei DFH ₄	25
Fig. 1.2. Prezentarea schematică a principalelor căi de degradare a DFH ₄ în soluție.....	25
Fig. 1.3. Reprezentarea schematică a electrofilicității și nucleofilicității DFH ₄ (a) și a caracterului oxidant/reducător (b) [38].....	26
Fig. 1.4. Reprezentarea schematică a transformărilor chimice ale DFH ₄ din [16].....	27
Fig. 1.5. Reprezentarea schematică a transformărilor chimice ale DFH ₄ din [40].....	28
Fig. 1.6. Reprezentarea schematică a transformărilor chimice ale DFH ₄ din [41].....	29
Fig. 1.7. Reactivitatea latentă a DFH ₄ ca nucleofil (echivalentul umpolung al α -acetil anionului) și ca electrofil (α -carboxiglicolaldehidă) în mediul apos [35].....	29
Fig. 1.8. Transformarea DFH ₄ în acid dicetosuccinic sub acțiunea DFH ₄ -ozidazei.....	30
Fig. 1.9. Transformarea acidului ascorbic sub acțiunea L-ascorbat ozidazei.....	31
Fig. 1.10. Transformările DFH ₄ care duc la formarea 3-cetopentozei.....	31
Fig. 1.11. Interrelația ciclurilor metabolice [50].....	32
Fig. 1.12. Reprezentarea schematică a scenariului glioxalic: biomoleculele ce se pot forma din constituenții ciclului acidului dihidroxifumaric [36].....	34
Fig. 1.13. Reprezentarea schematică a procesului de autocondensare a DFH ₂ ²⁻ [58].....	34
Fig. 1.14. Reprezentarea schematică a relației ipotetice între acizii carboxilici identificați de autorii [55], ținând cont de scenariul glioxalic propus în [36] și de rezultatele obținute ulterior [59,60,61,62].....	35
Fig. 1.15. Reprezentarea schematică a divergenței datorate pH-ului pentru reacția dintre dihidroxifumarat și glioxalat [60].....	36
Fig. 1.16. Reprezentarea schematică a divergenței datorate pH-ului pentru reacția dintre dihidroxifumarat și formaldehidă [60].....	37
Fig. 1.17. Reprezentarea schematică a obținerii DFH ₄ din acidul tartric prin acțiunea fierului(II) și a peroxidului de hidrogen, și prin acțiunea directă a radicalilor hidroxilici.....	39
Fig. 1.18. Reprezentarea schematică a reacției dintre DFH ₄ , esterul său dimetilic și sarea acidă de natriu, în medii mai puțin acidulate [78].....	41
Fig. 2.1. Structura moleculară a radicalului stabil de DPPH [*]	43
Fig. 2.2. Spectrele UV/VIS pentru radicalul stabil DPPH [*] și hidrazina redusă DPPH-H.....	44
Fig. 2.3. Structura moleculară a radicalului ABTS ^{•+}	45
Fig. 2.4. Reprezentarea grafică a principiului de lucru al aparatului stopped-flow.....	46
Fig. 2.5. Etapele de înregistrare a unei reacții stop-flow [87].....	47
Fig. 3.1. Prezentarea schematică a unor derivați ce conțin azot ce pot fi obținuți din DFH ₄	52
Fig. 3.2. Transformările formelor izomerice ale DFH ₄	53
Fig. 3.3. Schema de sinteză a (<i>E</i>)-metil-2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoatul 5.....	54
Fig. 3.4. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-di(piridin-2-il)fumaramidei 6.....	55
Fig. 3.5. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(2-hidroxietyl)fumaramidei 7.....	56
Fig. 3.6. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(2-hidroxiopropil)fumaramidei 8.....	56

Fig. 3.7. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramidei 9, N1,N4-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxifumaramidei 10 și N1,N4-di-tert-butil-2,3-dihidroxifumaramidei 11	57
Fig. 3.8. Schema de sinteză a acidul (E)-3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic 12 și a (E)-1,2-di(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etene-1,2-diolului 13	57
Fig. 3.9. Curbele de calibrare pentru DPPH [•] (a) și DFH ₄ (b) în soluție metanolică (70%)	62
Fig. 3.10. Curba cinetică de consum a DPPH [•] la interacțiunea cu acidul ascorbic, [AAs] ₀ = 2·10 ⁻⁵ M; [DPPH [•]] ₀ = 1·10 ⁻⁴ M, t = 30 s	62
Fig. 3.11. Curbele cinetice de consum a DPPH [•] la interacțiunea cu DFH ₄ 1 (albastru) și acidul MBD 12 (verde) în condițiile: [DFH ₄] ₀ = [MBD] ₀ = 2·10 ⁻⁵ M; [DPPH [•]] ₀ = 1·10 ⁻⁴ M, t = 30 s	63
Fig. 3.12. Curbele cinetice de consum a DPPH [•] la interacțiunea cu diolul BBD 13 (albastru) și esterul 2 (oranj) în condițiile: [BBD] ₀ = [EMD] ₀ = 2·10 ⁻⁵ M; [DPPH [•]] ₀ = 0,7·10 ⁻⁴ M, t = 120 s	64
Fig. 3.13. Curbele cinetice de consum a DPPH [•] la interacțiunea cu: (a) anilida 5, [anilida] ₀ = 2,26·10 ⁻⁵ M, [DPPH [•]] ₀ = 6·10 ⁻⁵ M, t = 30 min și (b) fumaramida 6, [fumaramida] ₀ = 2,7·10 ⁻⁵ M; [DPPH [•]] ₀ = 6·10 ⁻⁵ M, t = 30 min	64
Fig. 3.14. Determinarea constantelor stoichiometrice pentru reacția dintre DPPH [•] și derivații cercetați	65
Fig. 3.15. Micșorarea concentrației de DPPH [•] la reducerea acestuia cu DFH ₄ , atunci când inițial [DFH ₄] ₀ = ([DPPH [•]] ₀ /σ), unde σ = 2	67
Fig. 3.16. Mecanismul presupus al reacției dintre DFH ₄ și DPPH care nu a fost confirmat prin cercetări RMN	67
Fig. 3.17. Scăderea absorbției radicalului DPPH [•] în timp, la interacțiunea cu AAs, în primele 18 secunde de reacție, pentru condiția [AAs] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ, unde σ = 2	69
Fig. 3.18. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH [•] (a), și a ordinului total de reacție x+y (b) în reacția radicalului DPPH [•] cu AAs, unde [AAs] ₀ = 2·10 ⁻⁵ M (a) și [AAs] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ (b), la timpul de reacție t = 0.2 s	70
Fig. 3.19. Scăderea absorbției radicalului DPPH [•] în timp, la interacțiunea cu DFH ₄ 1, în primele 5 secunde de reacție, pentru condiția [DFH ₄] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ, unde σ = 2	71
Fig. 3.20. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH [•] (a), și a ordinului total de reacție x+y (b) în reacția radicalului DPPH [•] cu DFH ₄ 1, unde [DFH ₄] ₀ = 2·10 ⁻⁵ M (a) și [DFH ₄] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ (b), la timpul de reacție t = 0.3 s	71
Fig. 3.21. Scăderea absorbției radicalului DPPH [•] în timp, la interacțiunea cu MBD 12, în primele 5 secunde de reacție, pentru condiția [MBD] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ, unde σ = 2	72
Fig. 3.22. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH [•] (a), și a ordinului total de reacție x+y (b) în reacția radicalului DPPH [•] cu MBD 12, unde [MBD] ₀ = 2·10 ⁻⁵ M (a) și [MBD] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ, unde σ = 2 (b), la timpul de reacție t = 0.2 s	72
Fig. 3.23. Scăderea absorbției radicalului DPPH [•] în timp, la interacțiunea cu BBD 13, în primele 5 secunde de reacție, pentru condiția [BBD] ₀ = [DPPH [•]] ₀ /σ, unde σ = 1	73

Fig. 3.24. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH* (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului DPPH* cu BBD 13, unde $[BBD]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M (a) și $[BBD]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$, unde $\sigma = 1$ (b), la timpul de reacție $t = 0.2$ s.....	73
Fig. 3.26. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH* (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului DPPH* cu esterul EMD 2, unde $[EMD]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M (a) și $[EMD]_0 = [DPPH^*]_0$ (b), timpul de reacție $t = 1$ s.....	74
Fig. 3.27. Scăderea absorbției radicalului DPPH* în timp, la interacțiunea cu anilida 5, în primele 120 secunde de reacție, pentru condiția $[anilida]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$	75
Fig. 3.28. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH* (a), și a ordinului de reacție y (b) față de anilida 5, unde $[anilida]_0 = 2,26 \cdot 10^{-5}$ M (a) și $[DPPH^*]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M (b), timpul de reacție $t = 10$ min.....	75
Fig. 3.29. Activitatea antioxidantă totală a soluției de Trolox, în funcție de $[Trolox]_0$, determinată prin metoda ABTS ⁺	77
Fig. 3.30. Descreșterea absorbției soluțiilor de ABTS ⁺ în funcție de natura reducătorilor, pentru $[Red]_0 = 25$ μM.....	78
Fig. 3.31. Dependența AAT de natura și concentrația reducătorilor.....	78
Fig. 4.1. Structurile geometrice optimizate ale izomerilor enediolici ai DFH ₄	82
Fig. 4.2. Structurile geometrice optimizate ale izomerilor cetonici ai DFH ₄	83
Fig. 4.3. Structurile geometrice optimizate ale celor mai stabile trei structuri enediolice și trei structuri cetonice, <i>in vacuo</i>	85
Fig. 4.4. Structurile geometrice optimizate ale unor TS caracteristice pentru interconversiile enediol-enediol și cetonă-cetonă, în apă.....	88
Fig. 4.5. Structurile geometrice optimizate ale stărilor de tranziție în tautomeria ceto-enolică a celor mai stabili trei izomeri ai DFH ₄ , în vid.....	91
Fig. 4.6. Structurile optimizate ale compușilor cercetați în soluție apoasă: 1 - DFH ₄ , 2 - dimetil 2,3-dihidroxifumarat, 5 - (<i>E</i>)-metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoat, 6 - 2,3-dihidroxi-N1,N4-di(piridin-2-il)fumaramida, 7 - MEAD, 8 - MPAD, 9 - 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramida, 10 - N1,N4-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxifumaramida, 11 - N1,N4-di-tert-butil-2,3-dihidroxifumaramida, 12 - MBD, 13 - BBD.....	95
Fig. 4.7. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale DFH ₄ 1 și EDM 2, în metanol.....	104
Fig. 4.8. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale anilidei 5 și fumaramidei 6, în metanol.....	106
Fig. 4.9. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale MBD 12 și BBD 13, în metanol.....	109
Fig. 4.10. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale MEAD 7 (a) și MPAD 8 (b), în metanol.....	111

Fig. 4.11. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale fumaramidelor 9 (a), 10 (b) și 11 (c), în metanol	113
Fig. 4.12. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră ai izomerului E2 (stânga) al acidului DFH ₄ , anionul cu hidrogenul din poziția <i>anti</i> - disociat (centru) și anionul cu hidrogenul din poziția <i>syn</i> - disociat (dreapta)	117
Fig. 4.13. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră ai izomerului E3 (stânga) al acidului DFH ₄ și anionul respectiv	118
Fig. 4.14. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră pentru (a) esterul EMD 2, (b) anilida 5, (c) fumaramida 6 și (d) MEAD 7	120
Fig. 4.15. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră pentru (a) MBD 12, (b) BBD 13, (c) MPAD 8, (d) fumaramida 9, (e) fumaramida 10, (f) fumaramida 11	121
Fig. 4.16. Geometria optimizată a DPPH [*] (a), orbitalii moleculari β-LUMO +3 responsabili pentru acceptul electronului de la antioxidant (b) și harta potențialului molecular electrostatic (c)	123
Fig. 4.17. Speciile moleculare cu caracter antioxidant cercetate în solvent (apă)	125
Fig. 4.18. Radarele de biodisponibilitate pentru substanțele cercetate: (a) acidul DFH ₄ 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	130
Fig. 4.19. 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)	133
Fig. 4.20. Reprezentarea interacțiunilor cu cel mai mare scor de andocare între proteaza principală a virusului SARS-COV-2 și (a) acidul DFH ₄ 1, (b) esterul EDM 2, (c) acidul ascorbic (imagine 3D - pe stânga și 2D - pe dreapta)	135
Fig. 4.21. 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 substanțele cercetate: (a) anilida 5, (b) fumaramida 6, (c) MEAD 7, (d) MPAD 8	136
Fig. 4.22. 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 fumaramidele 9 (a), 10 (b) și 11 (c)	137
Fig. 4.23. 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: (a) MBD 12, (b) BBD 13	138

LISTA ABREVIERILOR

AAs	— acid ascorbic
ABTS ^{•+}	— radical cation de acid 2,2'-Azinobis-(3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonic)
ACE2	— enzima de conversie a angiotensinei 2
ADMET	— absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate
AH	— antioxidant
AR	— abundența relativă a izomerilor
ASN	— asparagină
B3LYP	— Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr (denumirea funcționalei)
BBB	— bariera sanguină a creierului
BBD	— (E)-1,2-di(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etene-1,2-diol
BDE	— bond dissociation energy / energia de disociere a legăturii
CRATC	— ciclul reductiv al acizilor tricarboxilici
CYS	— cisteină
DFH3Na	— sarea de sodiu a acidului dihidroxifumaric
DFH ₄	— acidul dihidroxifumaric
DFT	— teoria funcționalei de densitate
DPPH [•]	— radicalul 2,2-difenil-2-picrilhidrazil
EC ₅₀	— concentrația eficientă la 50%
EDM	— dimetil 2,3-dihidroxifumarat
ETE	— electron transfer enthalpy / entalpia de transfer a electronului
FMOA	— aproximarea orbitalilor moleculari de frontieră
GLN	— glicină
GLU	— glutamină
GLY	— glicină
HAT	— hydrogen atom transfer - transferul atomului de hidrogen
HbO ₂	— hemoglobina
HIS	— histidină
HOMO	— cel mai înalt orbital molecular ocupat
IP	— potențialul de ionizare
KID	— teorema lui Koopman în cadrul DFT (Koopman in DFT procedure)
LEU	— leucină
LUMO	— cel mai jos orbital molecular liber
MBD	— acidul (E)-3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic
MEAD	— 2,3-dihidroxi-N ¹ ,N ⁴ -bis(2-hidroxietyl)fumaramida

MEDT	— teorie a densității electronilor moleculari
MEP	— harta potențialului molecular electrostatic
MET	— metionină
MPAD	— 2,3-dihidroxi-N ¹ ,N ⁴ -bis(2-hidroxiopropil)fumaramida
M ^{pro}	— proteaza principală a virusului SARS-CoV-2
NAD	— nicotinamid adenin dinucleotid
NADPH	— nicotinamid adenin dinucleotid fosfat
NBO	— orbitali naturali de legătură
NEB	— Nudged Elastic Band (denumire a metodei)
PA	— proton affinity/ afinitatea protonului
PAR	— putere antiradicalică PAR
PDB	— baza de structuri proteice Protein Data Bank
PDE	— proton dissociation energy / entalpia de disociere a protonului
PHE	— fenilalanină
R	— specie radicalică
S	— glicoproteina spike
SER	— serină
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
SRA	— specii reactive de azot
SRH	— specii reactive de halogeni
SRO	— specii reactive de oxigen
ST	— stare de tranziție
TAA	— activitatea antioxidantă totală
TCE	— tetracianoetilenă
TEAC	— capacitatea antioxidantă în echivalenți Trolox
THR	— treonină

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate

Cercetările de față sunt axate pe completarea și aprofundarea studiilor legate de acidul dihidroxifumaric, de procesele de sinteză a derivaților noi cu caracteristici antioxidante, de cinetica interacțiunii a DFH₄ și derivaților săi cu unii radicali liberi. O atenție deosebită îi revine utilizării metodelor computaționale pentru înțelegerea datelor empirice obținute, pentru prezicerea proprietăților farmaco-cinetice, toxicității și indisponibilității substanțelor cercetate, precum și pentru modelarea computațională a interacțiunilor cu proteaza principală a virusului SARS-CoV-2.

Acidul dihidroxifumaric a captat atenția Acad. Gheorghe Duca și echipei sale încă în anii '80 ai secolului trecut, în timpul cercetărilor transformărilor oxidative ale polifenolilor și acizilor dicarboxilici din ciclul Baroud.

S-a observat încă atunci faptul că DFH₄ participă în procesele oxidative ale vinului și restabilește formele oxidate ale polifenolilor, îmbunătățind calitatea vinurilor. Grație caracterului său antioxidant, DFH₄ a fost utilizat în cercetările ulterioare unde s-a demonstrat că acest compus posedă un potențial înalt de utilizare în calitate de aditiv în procesul tehnologic de fabricare a vinurilor, în industria alimentară pentru stoparea deteriorării oxidative a alimentelor și prevenirea formării *N*-nitrozaminelor (substanțe puternic cancerigene), în procesul de fabricare a țigărilor. Surse importante de *N*-nitrozamine sunt alimentele preparate din carne, berea, cașcavalurile, peștele preparat, peștele uscat, laptele praf și produsele cosmetice, toate acestea prezentând potențiale domenii de utilizare a DFH₄.

Dezavantajele utilizării DFH₄ sunt câteva, și acestea derivă din structura acidului: același fragment enediolic care este responsabil pentru activitatea antioxidantă avansată, are capacitatea de a tautomeriza în forma cetonică, susceptibilă la decarboxilare. În general, fragmentul enediolic este destul de labil, și DFH₄ se distruge foarte ușor în soluție, prin autocondensare sau oxidare, în special în prezența metalelor de tranziție. În acest context, sinteza derivaților DFH₄ prezintă un interes practic deosebit, scopul principal fiind obținerea compușilor stabili prin înlocuirea fragmentelor carboxilice.

În ultimii ani, un accent deosebit se pune pe dezvoltarea durabilă și asigurarea sănătății populației, inclusiv prin siguranța medicamentelor și a alimentelor, astfel că obținerea substanțelor noi cu caracter antioxidant/antiradicalic pe baza compușilor naturali este o direcție de mare interes și potențial aplicativ.

Rezultatele expuse și analizate în teza de doctor au fost obținute în cadrul laboratorului de Chimie fizică și Cuantică din Institutul de Chimie al Republicii Moldova, în cadrul proiectelor de cercetare nr. 06.408.029, perioada de realizare 2006-2010; nr. 11.817.08.22F, perioada de realizare 2011-2014 și nr. 20.8009.5007.27 în cadrul „Programului de stat 2020-2023”.

Scopul lucrării constă în cercetarea activității antiradicalice a acidului dihidroxifumaric și a derivaților săi noi, prin metode empirice și computaționale.

Pentru realizarea acestui scop au fost înaintate următoarele sarcini:

- sinteza și caracterizarea unor derivați noi ai DFH₄;
- determinarea activității antioxidante/antiradicalice a substanțelor cercetate prin utilizarea radicalilor DPPH• și ABTS^{•+};
- studiul legităților cinetice ce descriu reacțiile dintre DFH₄ și derivații acestuia cu radicalul stabil DPPH•;
- utilizarea metodelor cuanto-chimice pentru cercetarea proceselor de izomerizare și tautomerizare a DFH₄, pentru calculul descriptorilor de reactivitate globală și locală a DFH₄ și a derivaților săi *in vacuo* și solvent; pentru determinarea celui mai probabil mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă a DFH₄;
- estimarea prin metode computaționale a proprietăților farmaco-cinetice, toxicității și biodisponibilității derivaților cercetați;
- utilizarea metodei de andocare moleculară pentru modelarea efectului inhibitor al compușilor cercetați asupra protezei principale a virusului SARS-CoV-2.

Noutatea și originalitatea științifică rezidă în elaborarea unor metode noi de obținere a zece de derivați stabili ai DFH₄ (dintre care 9 compuși sunt noi) cu proprietăți antiradicalice, cu potențial de utilizare în diferite ramuri ale industriei, precum industria alimentară și farmaceutică. Având în structura sa fragmente carboxil-, hidroxil- și olefină, DFH₄ poate fi utilizat pentru a crea macrocicli porfirinici sau pirimidinici. Totuși, în pofida progreselor evidente în această direcție, chimia acidului dihidroxifumaric, rămâne a fi un domeniu slab studiat în multe aspecte. Printre lucrările ce țin de modificarea DFH₄ există date limitate cu privire la sinteza derivaților aminici, inclusiv a celor cu un fragment heterociclic. În același timp, derivați ai DFH₄ ce conțin azot pot deschide noi posibilități în sinteza organică: selectarea combinațiilor adecvate de substituenți va permite adaptarea polarității în limite largi, a capacității de solvatare, a proprietăților catalitice și, prin urmare, poate influența profunzimea și selectivitatea reacției. Din punct de vedere practic, nucleul benzimidazolic, care a fost unul din fragmentele alese pentru

obținerea derivaților, s-a bucurat de un interes științific considerabil odată ce s-a constatat că benzimidazolul inhibă creșterea drojdiilor și anumitor bacterii, iar unii derivații benzimidazolici posedă diferite efecte farmacologice (antihistaminic, antiulcer, antihipertensiv) și sunt pe larg utilizați în tratamentul clinic. Derivatul anilinei pe bază de DFH₄ ar putea și el prezenta interes, ținând cont de faptul că un compus similar, acetaminofenul (comercializat sub mărcile Panadol, Tylenol, paracetamol) este cel mai popular medicament pentru reducerea febrei și a durerilor.

Cinetica reacțiilor dintre derivații obținuți și radicalul DPPH^{*} a fost studiată utilizând metoda stop-flow care a permis monitorizarea spectrofotometrică a reactanților după prima jumătate de secundă de reacție. Accesul la timpuri atât de mici de reacție permite determinarea vitezei de reacție, stoichiometriei și ordinilor de reacție pentru etapa inițială a reacției, inaccesibilă până acum.

Cercetările cuanto-chimice au permis identificarea, pentru prima dată a celor trei izomeri ai DFH₄, precum și abundența acestora în diferite medii. S-au determinat orbitalii responsabili pentru manifestarea activității antiradicalice. Pentru prima dată au fost utilizate metodele cuanto-chimice pentru determinarea indicilor de reactivitate globală și locală a DFH₄ și a derivaților obținuți. Au fost utilizate metode computaționale de precizie a proprietăților farmaco-cinetice, de toxicitate și biodisponibilitate pentru substanțele cercetate, iar la final a fost demonstrată o bună similitudine cu medicamente ale compușilor cercetați. În premieră a fost utilizată metoda andocării moleculare pentru relevarea interacțiunilor dintre substanțele cercetate și proteaza principală a virusului SARS-CoV-2, cu scopul de a determina potențialul de inhibiție a acestui virus de către compușii vizați în studiu.

Ipoteza de cercetare se bazează pe faptul că acidul dihidroxifumaric este un compus natural ce participă activ în metabolismul celulelor, făcând parte din ciclul acizilor *di-* și *tricarboxilici*, cu proprietăți antioxidante/antiradicalice semnificative. Conform ipotezei de cercetare, pot fi obținuți derivați ai acestui acid prin metode de sinteză care ar permite stabilizarea structurii chimice față de procesele oxidare, autocondensare, decarboxilare, cu o păstrare concomitentă a activității antiradicalice.

A doua ipoteză constă în faptul că derivații obținuți vor demonstra caracteristici similare medicamentelor în ceea ce privește biodisponibilitatea, absorbanta, distribuția, metabolism celular, excreție și toxicitate, datorită utilizării în sinteza chimică a fragmentelor cunoscute pentru utilitatea lor clinică în designul medicamentelor.

Semnificația teoretică. Rezultatele cercetării contribuie la fundamentarea cunoștințelor în domeniul cineticii chimice a reacțiilor dintre compușii antioxidanți și radicalii DPPH[•] și ABTS^{•+}. Rezultatele au confirmat posibilitatea obținerii derivaților cu caracteristici antiradicalice pe baza DFH₄, lărgind astfel baza compușilor cu potențial aplicativ în ramurile industriei ce au impact direct asupra sănătății omului. Rezultatele cercetărilor computaționale demonstrează potențialul de aplicare al metodelor teoretice și predictive în etapele de design al noilor derivați cu caracter antioxidant/antiradicalic.

Valoarea aplicativă. Au fost obținuți de către autor zece derivați pe bază de DFH₄, dintre care nouă compuși sunt noi, iar patru compuși posedă activitate antioxidantă/antiradicalică pronunțată față de radicalii DPPH[•] și ABTS^{•+} demonstrată experimental și argumentată teoretic, având proprietăți similare medicamentelor, precise computațional, inclusiv proprietăți farmacocinetice și de toxicitate, precum și o buna biodisponibilitate. Toți compușii cercetați au arătat energii de legare cu proteaza principală a virusului SARS-CoV-2 similare sau mai bune decât acidul ascorbic, subliniind potențialul semnificativ de a inhiba acest virus.

Implementarea rezultatelor științifice. Cercetarea a servit drept bază pentru dezvoltarea direcției de cercetare a reacțiilor dintre substanțe cu caracter antioxidant/antiradicalic cu radicalii DPPH[•] și ABTS^{•+} în cadrul Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică. Rezultatele obținute pot fi interesante pentru firmele farmaceutice, pentru producătorii aditivilor alimentari. Metodele cuanto-chimice utilizate în premieră în cadrul Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică vor contribui la fundamentarea cunoștințelor studenților/masteranzilor/doctoranzilor cu privire la metodele teoretice disponibile pentru cercetarea și prognozarea reactivității substanțelor chimice de interes. A fost elaborată prelegerea *Cinetica chimică a sistemelor ecologice* pentru studenții an. III a Facultății de Chimie și Tehnologie Chimică a USM, unde au fost utilizate rezultatele obținute în lucrarea de față.

Aprobarea rezultatelor. Rezultatele obținute la tema tezei sunt reflectate în 18 lucrări științifice: 6 articole în reviste internaționale cotate ISI și Scopus (dintre care două fără coautori); 2 articole în reviste internaționale recunoscute și 1 articol în revistă națională de categoria B, precum și 9 rezumate la diferite manifestări științifice naționale și internaționale. Cercetările realizate și rezultatele obținute au fost raportate și discutate în fiecare an la ședințele semestriale ale Laboratorului de Chimie fizică și Cuantică în perioada studiilor la doctorat. De asemenea, rezultatele obținute au fost prezentate la diferite manifestări științifice: International Conference

dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova, (May 26-28, 2009, Chisinau); Всероссийская науч.-практ. конф. с междунар. участием, (Уфа, Россия, 25-26 февр. 2011); The 3rd International scientific and practical conference (Chicago, 2021), The 1st International scientific and practical conference (Vancouver, 2021), A 7-a ediție a conferinței internaționale ECOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY-2022, conferința națională cu participare internațională "Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni între universități, academie și comunitatea de afaceri" (Chișinău, 29-30 sept., 2022).

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. La elaborarea tezei de doctor, metodologia de cercetare s-a bazat pe principiile chimiei organice, în ceea ce privește sinteza compușilor prin optimizarea metodelor cunoscute, precum și pe principiile fundamentale ale chimiei fizice, pentru studiul vitezelor de reacție, a constantelor de viteză, stoichiometriei și ordinilor de reacție. Luând în considerație viteza fulgerătoare a reacțiilor dintre radicalii liberi și substanțele antioxidante, aparatul stop-flow a permis urmărirea spectrofotometrică a reacției după prima jumătate de secundă. În cadrul cercetării au fost de asemenea utilizate metode analitice, de analiză calitativă și cantitativă; metode generale de cercetare științifică (logică, analiză, sinteză, planificarea experimentului chimic); metode computaționale (orbitali de frontieră, reactivitate globală și locală, potențial electrostatic, etc.), metode moderne de modelare a proprietăților farmaco-cinetice, metoda andocării moleculare.

Sumarul capitolelor tezei

Lucrarea conține adnotarea scrisă în 3 limbi: română, rusă și engleză, lista tabelor, lista figurilor, lista abrevierilor, introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului. Conținutul tezei constituie 127 pagini de text principal completat cu 28 tabele și 78 figuri.

În *Introducere* sunt descrise actualitatea și importanța temei studiate, este formulat scopul și obiectivele tezei, este descrisă noutatea și originalitatea științifică a cercetărilor, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor, fiind argumentată metodologia de cercetare și justificate metodele de cercetare alese.

În *Capitolul 1* se discută structura și transformările acidului dihidroxifumaric, sunt prezentate abordările teoretice și practice generale ce țin de metodele de studiu a izomeriei *cis-/trans-*, rolul DFH₄ în sistemele biologice, importanța în cadrul postulatelor chimiei prebiotice, precum și rezultatele aplicative obținute cu utilizarea DFH₄.

În *Capitolul 2* este expusă metodologia de cercetare pentru realizarea scopului și obiectivelor propuse, după cum urmează: descrierea echipamentului și a reactivilor, a metodelor de determinare a activității antioxidante cu utilizarea radicalilor DPPH• și ABTS^{•+}; prezentarea tehnicilor de sinteză utilizate de către autor pentru obținerea celor zece derivați (dintre care 9 sunt noi) ai DFH₄, și a metodelor computaționale utilizate pentru efectuarea calculelor cuantochimice, a modelării proprietăților ADMET și a andocării moleculare.

Capitolul 3 descrie obținerea și caracterizarea derivaților sintetizați de către autor din DFH₄, determinarea activității antioxidante a DFH₄ și a derivaților săi noi prin utilizarea radicalilor DPPH• și ABTS^{•+}; precum și studiul legităților cinetice ce descriu reacțiile dintre acidul dihidroxifumaric și derivații acestuia cu radicalul DPPH•: viteze de reacții, constante de viteză, stoichiometria reacțiilor, ordine de reacție.

În *Capitolul 4* este prezentat un amplu studiu teoretic care cuprinde identificarea izomerilor enediolici și cetonici ai DFH₄ *in vacuo* și în apă, studiul termodinamic și cinetic al izomerizării geometrice și tautomerizării celor mai stabili izomeri ai DFH₄ *in vacuo* și în apă, determinarea indicilor de reactivitate globală și locală pentru compușii studiați prin metoda funcțiilor Fukui, Parr și a indicelui diferenței de reactivitate locală, și utilizând teoria orbitalilor moleculari de frontieră, *in vacuo*, apă și metanol. De asemenea, au fost estimate proprietățile farmaco-cinetice și de toxicitate a derivaților cercetați, precum și potențialul de inhibiție a acestora asupra virusului SARS-CoV-2 prin metoda andocării moleculare.

La finele fiecărui capitol se regăsesc concluziile care redau în mod generalizat cele mai importante aspecte ale informației prezentate. În compartimentul *Concluzii generale și recomandări* sunt expuse concluziile principale în baza rezultatelor obținute în teză, importanța practică a acestora și posibilitatea implementării lor.

1. ACIDUL DIHIDROXIFUMARIC: TRANSFORMĂRI CHIMICE, PARTICULARITĂȚI, IMPORTANȚA ÎN ORGANISMELE VII ȘI PROCESE TEHNOLOGICE

1.1. Formarea radicalilor liberi în organismele vii și alimente

Ultimele decenii se caracterizează printr-un interes sporit față de cercetările ce se referă la descoperirea posibilităților de prevenire a bolilor, în special în ceea ce privește rolul radicalilor liberi. Studiile ce țin de biologia și medicina radicalilor liberi se extind rapid, deoarece acești compuși au un rol important pentru sănătatea umană și, prin urmare, pentru calitatea vieții [1].

Oxigenul este esențial pentru viața organismelor aerobe, însă poate deveni toxic în concentrații prea mari. Deși oxigenul molecular în stare fundamentală este un gaz inert, reducerea parțială a acestuia duce la formarea speciilor reactive de oxigen (SRO), iar acumularea daunelor cauzate de SRO stă la baza uneia dintre cele mai larg acceptate teorii a îmbătrânirii [2,3,4].

În celule, radicalii liberi se formează în mod continuu, fiind produse secundare ale metabolismului oxigenului în timpul procesului de fosforilare oxidativă care are loc în mitocondrii. Astfel, principala sursă de radicali liberi *in vivo* este mitocondria [5], urmată de peroxizomi și reticulul endoplasmatic, activitatea enzimelor, metabolismul acizilor grași și celulele fagocitare [6]. Surse exogene de radicali liberi includ fumul de țigară, radiația ionizantă, unii poluanți, solvenții organici, ionii metalelor de tranziție, pesticidele.

Studii recente au demonstrat că radicalii liberi îndeplinesc multiple funcții biologice importante, de exemplu SRO și speciile reactive de azot (SRA) operează împreună cu speciile reactive de halogeni (SRH), ca parte a răspunsului imun celular la infecția cu microorganisme [7,8], și chiar posedă funcții de semnalizare, activând căi biochimice specifice în interiorul celulei [8,9]. O bună funcționare fiziologică impune necesitatea unui echilibru între radicalii liberi și sistemele de dezactivare a acestora. Atunci când radicalii liberi copleșesc capacitatea organismului de a-i regla, apare o afecțiune cunoscută sub numele de stres oxidativ [8,10], corelată cu o incidență mărită a bolilor degenerative, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, cataracta, bolile ficatului, inflamații, insuficiența renală ș.a. [11,12]. Astfel, în concentrații mari, interacțiunea acestor specii cu membranele lipidelor, acizii nucleici, proteine și enzime sau alte molecule mici, duce inevitabil la leziuni celulare. Când SRO acționează asupra ADN-ului, guanina este transformată în 8-oxoguanină, permițându-i să se cupleze cu citozina și adenina. Această mutație poate apărea atât în ADN-ul nuclear, cât și în cel mitocondrial și poate da naștere la rupturi duble ale catenei în ADN, ducând la instabilitate genomică [4,13]. Deteriorarea

proteinelor are loc prin oxidarea de către SRO a lanțurilor laterale și a lanțului principal de aminoacizi, în special în reziduurile de cisteină și metionină care conțin tiol; acest lucru poate modifica structural proteina și poate duce la pierderea funcției sau la utilizarea proteinei pentru semnalizarea mediată de SRO [14]. În cazul lipidelor, expunerea acestora la SRO are ca rezultat peroxidarea lipidelor, cauzând deteriorarea membranei celulare și generând produse secundare reactive care pot deteriora și mai mult celula [15].

O altă direcție semnificativ influențată de formarea radicalilor liberi, la fel de importantă și strâns legată de sănătatea omului, este industria alimentară. Produsele alimentare ce conțin grăsimi și uleiuri, cum ar fi carnea, mezelurile, uleiurile vegetal, lactatele și produsele de panificație sunt susceptibile la oxidare datorită compoziției lor chimice [16]. Oxidarea alimentelor, ce duce inevitabil la rănecizare, reprezintă a doua cea mai importantă cauză de deteriorare a alimentelor, după alterarea microbiană [17]. Astfel, în timpul păstrării îndelungate a produselor alimentare apar schimbări organoleptice, în special din cauza procesului de auto-oxidare a acizilor grași nesaturați, care sunt mai vulnerabili la rănecizare din cauza stabilității mai mici în comparație cu acizii grași saturați. Aceste produse oxidate pot avea diferite tipuri de efecte nocive, cum ar fi citotoxicitatea, mutagenitatea, ulcerul peptic, placa aterosclerotică, stresul oxidativ etc. [16]. Auto-oxidarea produselor alimentare este influențată de diverși factori precum temperatura, lumina, oxigenul, umiditatea, radiațiile ionizante, catalizatori, tipurile de ulei, microorganisme și condiții de procesare și/sau depozitare și pot fi prevenite sau blocate în cadrul diferitor etape tehnologice (prelucrare, ambalare și depozitare).

O metodă pe larg utilizată pentru prevenirea oxidării este îmbogățirea alimentelor cu antioxidanți în timpul procesării și conservării. Mecanismele de acțiune ale antioxidanților sunt diferite, inclusiv controlul pro-oxidanților, inactivarea radicalilor liberi și controlul substraturilor predispuse la oxidare (acizi grași nesaturați și oxigen) [18]. Cu toate acestea, industria utilizează în mare parte aditivi sintetici, care însă sunt priviți cu precauție sau chiar negativ de către consumatorii moderni, care preferă antioxidanții naturali și alimentele fără aditivi sintetici [17,18,19].

Un număr mare de acizi organici și săruri ale acestora sunt deja aprobați pentru utilizare în industria alimentară, de exemplu acizii malic (E296), tartric (E334), ascorbic (E300), lactic (270), succinic (E363) [20]. Acizii lactic, citric, tartric sunt, de asemenea, pe larg utilizați în industria farmaceutică și de fabricare a produselor cosmetice [21].

În acest context, trebuie subliniată importanța cercetărilor referitor la obținerea derivaților cu caracteristici antioxidante/antiradicalice pe bază de DFH₄, lărgind astfel baza compușilor cu

potențial aplicativ în ramurile industriei ce au impact direct asupra sănătății omului și a calității vieții.

1.2. Structura și transformările acidului dihidroxifumaric, aspecte generale

Acidul dihidroxifumaric, numit sistematic acidul (2*E*)-2,3-dihidroxi-but-2-enedioic conform IUPAC [22], este un dihidroxiacid dicarboxilic, care se obține din acid tartric prin dehidrogenare lentă sau procese de oxidare. Pentru prima dată, DFH₄ a fost obținut prin procedee chimice în 1894 de către Fenton, în urma oxidării acidului tartric cu peroxidul de hidrogen, în prezența Fe(II) [24,24].

DFH₄ posedă izomerie *cis*- și *trans*-. Astfel, *trans*-izomerul poartă numele de acid dihidroxifumaric, iar *cis*-izomerul se numește acid dihidroximaleic. La sfârșitul secolului XIX, Fenton a propus ideea că DFH₄ există preponderent sub formă de *cis*-izomer, prin urmare, în toate lucrările științifice publicate înainte de anii 1950, acidul este menționat ca dihidroximaleic. La începutul secolului XX a fost demonstrat [25] că formele *cis*- și *trans*- sunt identice chimic, iar în 1953 Hartree [26] a ajuns la concluzia că atât în formă cristalină, precum și în soluție, acidul există doar sub formă de *trans*-izomer. În soluție, DFH₄ se regăsește în două forme tautomerice aflate în echilibru dinamic (Fig. 1.1.), iar concentrația formelor tautomerice depinde de pH-ul soluției [27,28].

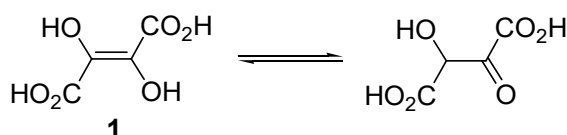


Fig. 1.1. Reprezentarea schematică a tautomeriei DFH₄

Literatura de specialitate menționează câteva dezavantaje în lucrul experimental cu utilizarea DFH₄, și anume: instabilitatea acestui acid în mediul apos (Figura 1.2.), în special din cauza transformărilor oxidative care duc la formarea acidului dicetosuccinic [29,30], și a decarboxilării cu formarea glicolaldehidei, precum și solubilitatea redusă a acidului și a sărurilor sale de Na⁺, K⁺, și NH₄⁺ în apă [31,32,33].

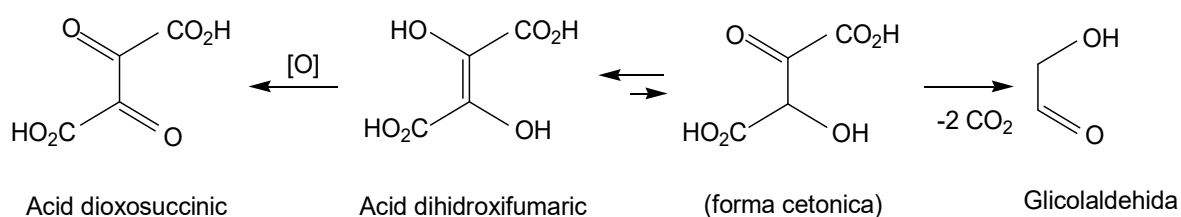


Fig. 1.2. Prezentarea schematică a principalelor căi de degradare a DFH₄ în soluție

Anterior a fost arătat că proprietățile fizice și chimice ale DFH₄ variază semnificativ în dependență de specia cercetată: acid dicarboxilic, bază conjugată a acidului dicarboxilic, sau diester, și literatura de specialitate menționează că aceste specii posedă (a) comportament nucleofilic sau electrofilic; și/sau (b) caracter oxidant sau reducător (Figura 1.2). DFH₄ posedă caracter nucleofilic foarte puțin pronunțat, în timp ce ionizarea grupărilor carboxilice în mediu bazic duce la deprotonarea acidului și formarea ionului dicarboxilic (DFH₂⁻) cu caracter nucleofilic foarte pronunțat [34,35], în timp ce formele esterificate demonstrează reactivitate electrofilă [35,36,37].

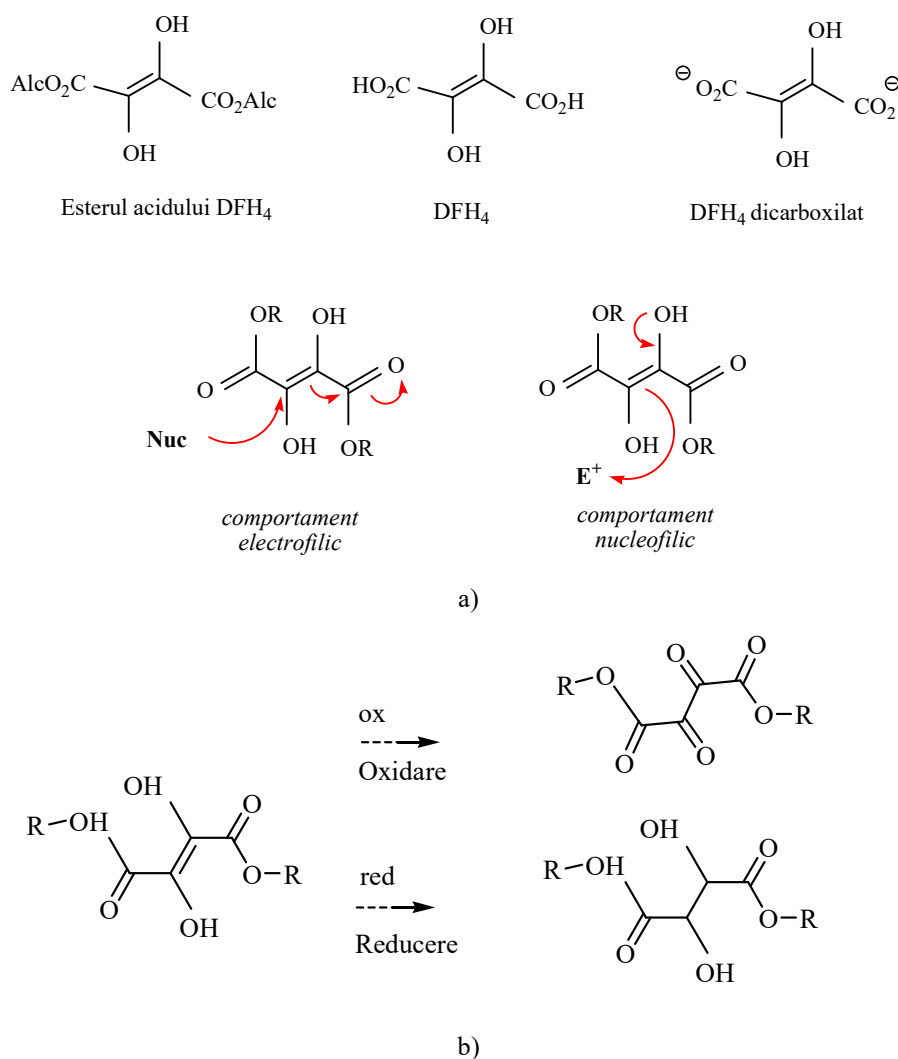


Fig. 1.3. Reprezentarea schematică a electrofilicității și nucleofilicității DFH₄ (a) și a caracterului oxidant/reducător (b) [38]

Stabilitatea speciilor menționate anterior este, de asemenea, diferită. La temperatura camerei, DFH₄ dispare într-un timp destul de scurt (până la o oră), suferind transformări oxidative, de auto-condensare și decarboxilare, în timp ce forma esterificată rămâne stabilă timp de mai multe săptămâni, fără a suferi procese de degradare sau auto-condensare [33,38]. DFH₄

este mult mai solubil în solvenți organici, în comparație cu esterul său dimetilic, care se solubilizează fără reflux la temperatura camerei doar în diclorometan într-o concentrație ne semnificativă (< 0.05 M) [38]. Ionul dicarboxilic este foarte rapid oxidat de către oxigenul atmosferic, iar auto-condensarea are loc în doar câteva ore [35].

Având în vedere structura acidului dihidroxifumaric **1**, atacul reagenților asupra moleculei sale este îndreptat în general asupra grupărilor carboxil sau hidroxil. Transformarea ulterioară a compușilor rezultați conduce la formarea substanțelor cu un număr mai mare sau mai mic de atomi de carbon decât acidul inițial. Pe de altă parte, tendința către tautomerismul ceto-enolic al DFH₄ și izomerizarea *trans*- izomerului **1** în izomerul *cis*- **8** a stârnit interesul autorilor [26] care au explorat configurația esterilor respectivi (Figura 1.4).

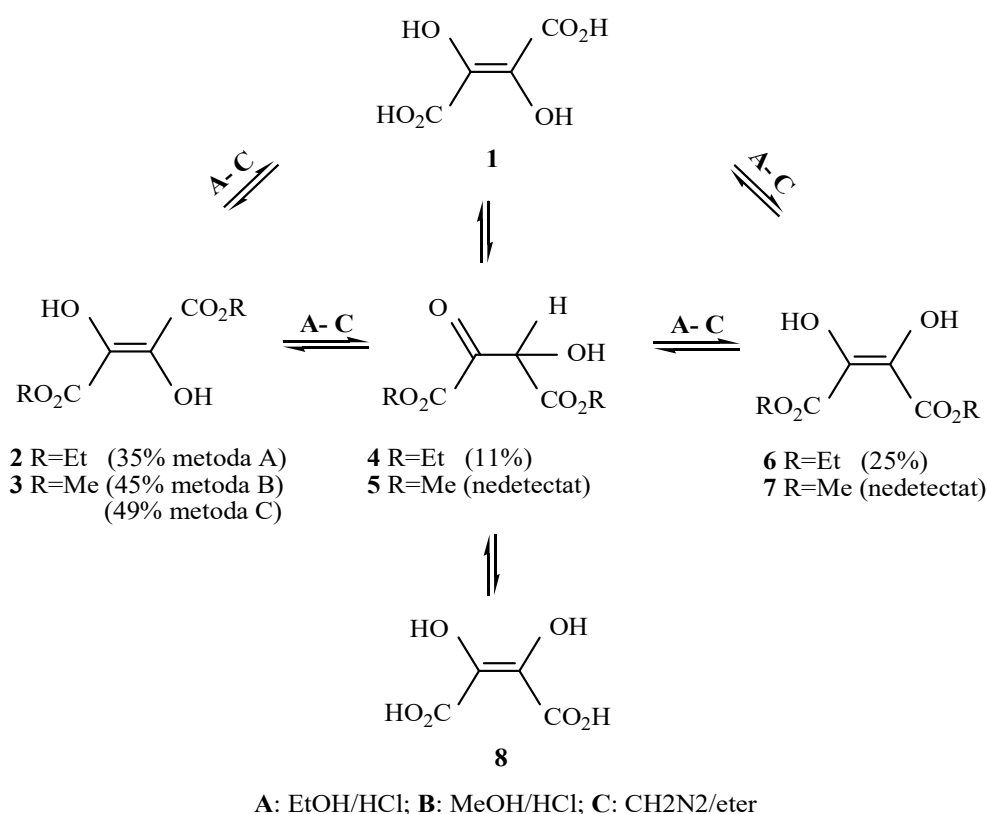


Fig. 1.4. Reprezentarea schematică a transformărilor chimice ale DFH₄ din [16]

Astfel, amestecul de esteri etilici **2**, **4**, **6** a fost sintetizat prin menținerea prelungită a acidului **1** în etanol/HCl. O abordare analogică a fost utilizată pentru omologii **3**, **5** și **7**. Cu toate acestea, a fost izolat numai esterul dimetilic **3**. Alternativ, substanța **3** a fost sintetizată prin metilare cu diazometan [26].

Rezultatele obținute prin compararea constantelor de disociere și a proprietăților chimiotactice ale acidului **1** cu cele ale compușilor cu structură înrudită confirmă structura *trans*-

în soluție apoasă. Formarea culorii gri-marou cu FeCl_3 (violet la alcalinizarea mediului) este în contrast cu culoarea verde obișnuită pentru grupările OH în configurație *cis*- [26].

Faptul că procesele de etilare și metilare, efectuate în condiții foarte asemănătoare cu alcoolii/HCl, duc la formarea produselor cu structuri diferite (Schema 4) se datorează probabil valorilor diferite ale solubilităților esterilor etilici și metilici respectivi în amestecurile de reacție menționate. Astfel, după tratare cu EtOH/HCl, compușii **4** și **6** pot fi izolați, în timp ce după tratarea cu MeOH/HCl, este detectat doar esterul **7** (identic cu cel preparat cu CH_2N_2). Conversia parțială a compusului **2** în **6** are loc în condiții acide de esterificare și faptul că esterul metilic nu este însoțit de alți izomeri după metilare în condiții similare, demonstrează structura *trans*- a produsul inițial **1** [26,28].

Interesul pentru mecanismul de oxidare și izomerizare a *cis*- și *trans*-enediolilor a determinat autorii [39] să încerce prepararea derivaților **8-13** plecând de la acidul **1** (Figura 1.5).

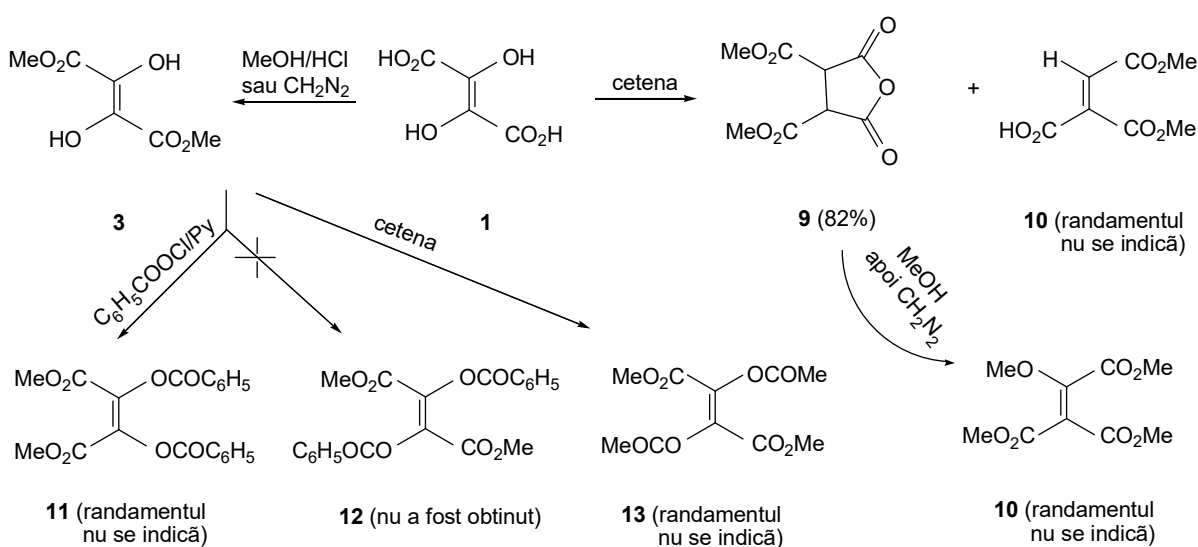


Fig. 1.5. Reprezentarea schematică a transformărilor chimice ale DFH₄ din [40]

Ca rezultat, a fost demonstrat că benzoilarea *trans*- dimetileterului de dihidroxifumarat **7** prin acțiunea BzCl/Py duce la formarea dimetil dibenzoilfumaratului **11** ce posedă centro-simetrie [39]. Formarea *trans*- dimetil dibenzoilfumaratului **12** nu a fost depistată. Reacția *trans*- esterului **3** cu cetena a dus la formarea esterului *trans*- diacetic **13**. Ca produs secundar în prepararea lactonei α , β - nesaturate cu 5 membri **9**, a fost izolat compusul **10**. Astfel, s-a demonstrat că produsul **10** poate avea configurația *trans*- numai dacă în acetilarea *trans*- enediolului **1**, înainte de anhidrizare a avut loc decarboxilarea [39].

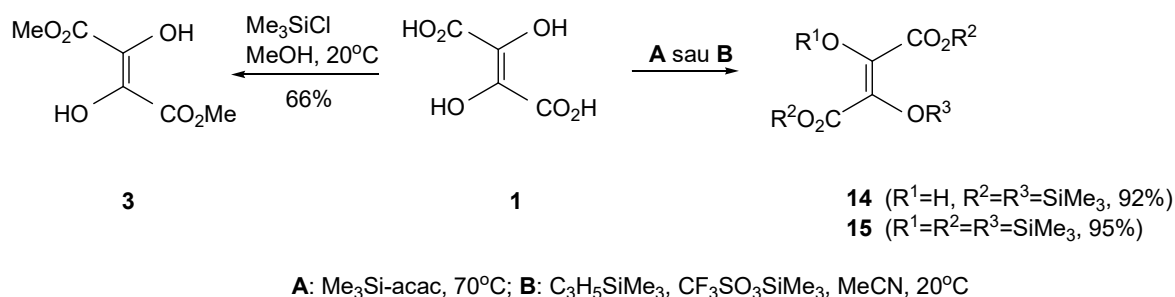


Fig. 1.6. Reprezentarea schematică a transformărilor chimice ale DFH₄ din [41]

O altă direcție cercetată anterior este acțiunea diferitor agenți de sililare asupra acidului **1** [40]. Sub acțiunea eterilor enolici ai trimetilsilil 2,4-pentandionei ($\text{Me}_3\text{Si-acac}$), acidul **1** a fost transformat în mono-acidul **14**. Produsul **15** a fost obținut ca rezultat al sililării acidului **1** cu ariltrimetilsilan și trimetilsilil triflat în acetonitril, la temperatura camerei (Figura 1.6.).

Autorii [35,42] subliniază potențialul semnificativ de aplicare a transformărilor DFH₄ în mediul apos, în reacții de formare a legăturilor carbon-carbon stereoselective, astfel DFH₄ ar putea deveni un bloc important pentru utilizare în sinteza organică.

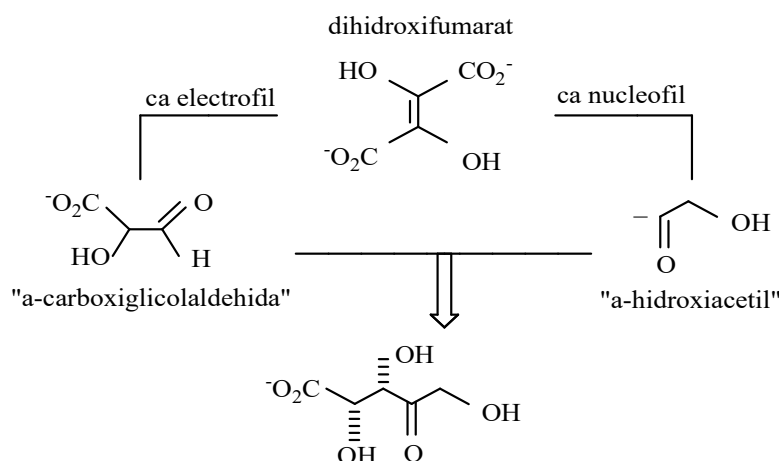


Fig. 1.7. Reactivitatea latentă a DFH₄ ca nucleofil (echivalentul umpolung al α -acetil anionului) și ca electrophil (α -carboxiglicolaldehidă) în mediul apos [35]

În cercetări anterioare s-a arătat că atunci când DFH₄ acționează ca nucleofil, este echivalentul umpolung al α -hidroxiacetil anionului, iar în condițiile în care acționează ca electrophil, este echivalent cu carboxiglicolaldehida (Figura 1.7). Cei doi sintoni mai sus amintiți sunt accesibili prin procedee destul de complicate, în special în condiții apoase, prin urmare, utilizarea DFH₄ ar putea ușura semnificativ unele procedee de sinteză organică [35,42]. Pe lângă aplicații la sinteza de molecule mici, autorii [42] atestă posibilitatea implementării lor în sinteza totală. De exemplu, scheletul dimerului liniar al DFH₄ se regăsește în produse naturale complexe,

cum ar fi acizii zaragozici (squalostatine) [43,44]. Acești acizi sunt inhibitori puternici ai squalen sintetazei, enzima care catalizează prima etapă în mecanismul de biosinteză a colesterolului, inhibă creșterea limfomului transformat cu virusul Rauscher și a carcinomului pulmonar Lewis *in vivo* [45]. Mai mult, acizii zaragozici au fost capabili să potențeze efectele antitumorale ale imunoterapiei active și adoptive prin prelungirea supraviețuirii globale a șoarecilor purtători de tumori, evidențiind potențialul antitumoral al acestor compuși [46].

Se cuvine de a menționa aici că transformările acidului dihidroxifumaric prezintă interes nu doar în experiențe de laborator, dar și în sisteme naturale.

1.3. Acidul dihidroxifumaric în contextul chimiei biotice și prebiotice

1.3.1. Acidul dihidroxifumaric în sistemele biologice

În mod similar cu alți hidroxiacizi, precum acizii malic, lactic, glicolic, citric, tartric, și acidul dihidroxifumaric are un rol important în natura vie, fiind cunoscut ca un intermediar în ciclurile acizilor di- și tricarboxilici. Primele dovezi ale importanței sale biologice au apărut în 1915 atunci când Neuberg [41] a descoperit că DFH₄ este fermentat de drojdie. În 1938 Banga și co-autorii [47,48] au extras din plante o enzimă, numită de către ei *oxidaza acidului dihidroxifumaric*, produsul de oxidare a căreia s-a dovedit a fi, mai târziu, acidul dicetosuccinic. În 1940 Theorell a descoperit o enzimă în unele plante, care a oxidat acidul dihidroxifumaric cu o puternică absorbție de oxigen, și a demonstrat că acea enzimă a fost *peroxidaza* [49].

Cercetările efectuate în anii '80 ai secolului trecut au demonstrat că centrele active ale dihidroxifumarat oxidazei și peroxidazei sunt compuși coordinativi ai cuprului și fierului [50]. Conform celor menționate anterior, aceste enzime catalizează transformarea DFH₄ în acid dicetosuccinic **16** (Figura 1.8).

Prin urmare, s-a sugerat [50] că în sistemul oxigen + DFH₄-oxidază, rolul DFH₄ este similar cu cel al acidului ascorbic **17** în sistemul ascorbat-oxidază, care duce la formarea α -dicetonei **18** (Figura 1.9).

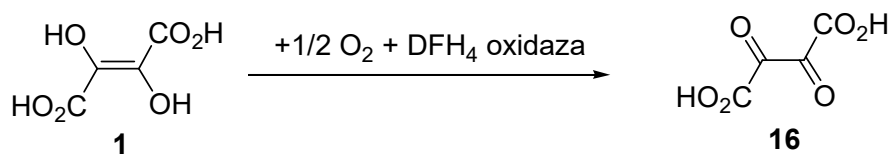


Fig. 1.8. Transformarea DFH₄ în acid dicetosuccinic sub acțiunea DFH₄-oxidazei

Se poate observa din aceste scheme că DFH₄ posedă unele similitudini structurale cu 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 [28].

Funcția oxidazică a peroxidazei a fost demonstrată mai târziu și față de alți compuși, cum sunt: glutationul, hidro- și naftochinona, fluoroglicina și altele [50]. O condiție necesară pentru decurgerea reacției de oxidază s-a demonstrat a fi prezența cofactorilor - ioni de mangan și diferiți compuși fenolici. Mai multe informații referitoare la anumite reacții enzimatiche ale acizilor dihidroxifumaric și dicetosuccinic în țesuturile plantelor au fost obținute de Stafford, Magaldi, și Vennesland în 1954 [51].

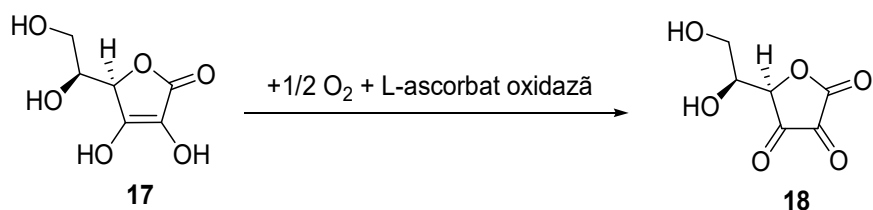


Fig. 1.9. Transformarea acidului ascorbic sub acțiunea L-ascorbat oxidazei

Rolul DFH₄ în metabolismul animalelor a fost evidențiat pentru prima dată în 1934, când s-a constatat creșterea conținutului de glicogen în mușchi după incubare cu DFH₄ [52]. Mai târziu, a fost descoperită o secvență de reacții enzimatiche care s-au dovedit a fi o cale de gliconeogeneză bazată pe probabilitatea ridicată de formare a unei pentoze (sau a unei fosfat pentoze) la adăugarea DFH₄ și gliceraldehidelor (sau fructoză-1,6-difosfat și aldolază ca o sursă de gliceralhid-3-fosfat), în extractul de mușchi de iepure. Secvența de reacții care duce de la DFH₄ la 3-cetopentoza **19** este prezentată în Figura 1.10 [53].

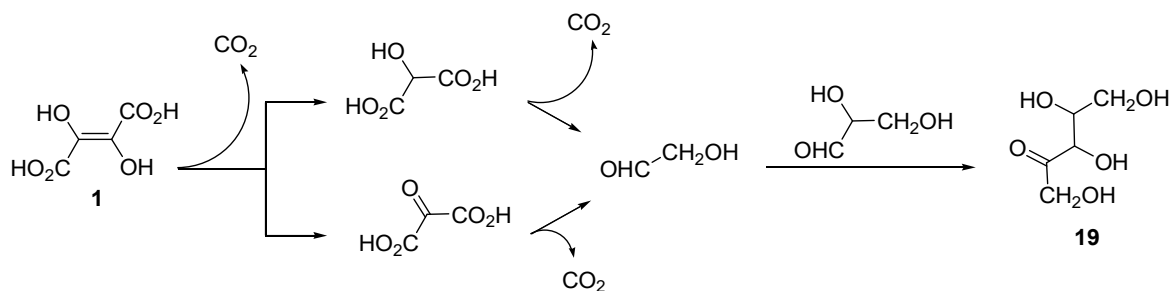


Fig. 1.10. Transformările DFH₄ care duc la formarea 3-cetopentozei

Este binecunoscut faptul că acizii organici di- și tricarboxilici joacă un rol important în metabolismul plantelor și animalelor. Produse ale transformării carbohidraților, aceștia participă la biosinteza alcaloizilor, glicozidelor, aminoacizilor și altor compuși biologic activi.

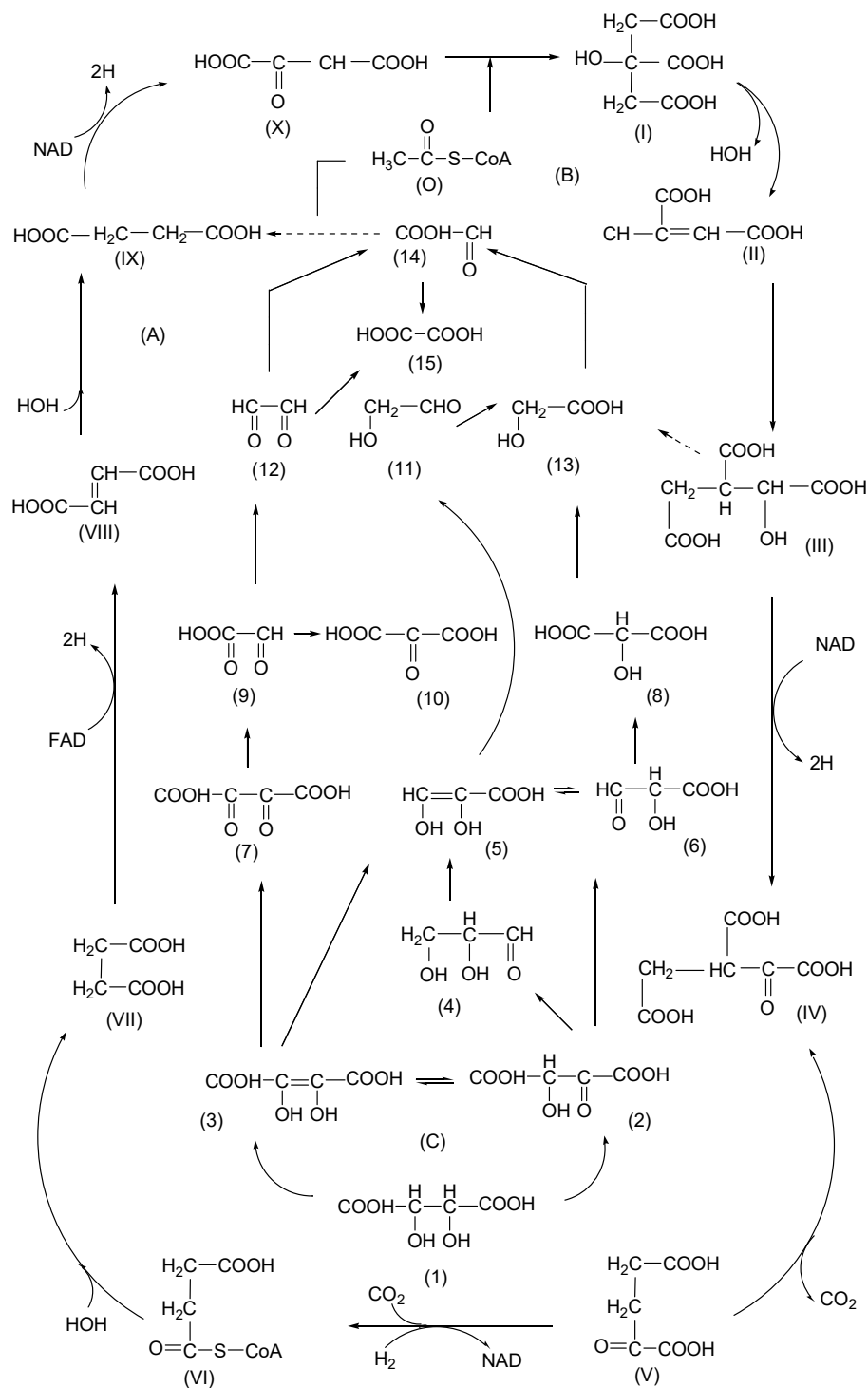


Fig. 1.11. Interrelația ciclurilor metabolice [50]

(A) – ciclul acizilor tricarbonici (Krebs), (B) – ciclul glioxalic, (C) – ciclul acizilor dicarbonici (Baroud). I – acidul citric, II – acidul cis-acinitic, III – acidul iso-citric, IV – acidul oxalo-succinic, V – acidul α -cetoglutaric, VI – succinoxoenzima A, VII – acidul succinic, VIII – acidul fumaric, IX – acidul maleic, X – acidul oxalo-acetic. 0 – acetyl coenzima A; 1 – acidul tartric, 2 – acidul oxaloglicolic, 3 – acidul dihidroxifumaric; 4 – reductona triozei, 5 – acidul dihidroxiacrilic, 6 – semialdehida acidului tartronic; 7 – acidul dicetosuccinic, 8 – acidul tartronic, 9 – acidul glioxilcarbonic, 10 – acidul mezoxalic; 11 – aldehida glicolică, 12 – aldehida oxalică; 13 – acidul glicolic, 14 – acidul glioxalic, 15 – acidul oxalic

Acidul dihidroxifumaric este legat cu ciclul acizilor di- și tricarboxilici, și cu ciclul glioxalic prin ciclul de transformare al acidului tartric, după cum se observă din Figura 1.11 [50].

Trebuie menționat faptul că principala funcție a acestor cicluri constă în faptul că ele descriu etapele finale de oxidare a glucidelor, lipidelor și proteinelor, deoarece în procesele metabolice glucoza, acizii grași și aminoacizii sunt transformați fie în acetyl-CoA, fie în compuși intermediari ai ciclurilor menționate anterior [4,50]. Acidul dihidroxifumaric se formează din acid tartric prin dehidrogenare, în prezența nicotinamid adenin dinucleotidei (NAD), a dehidrogenazei acidului tartric, și a fierului bivalent.

1.3.2. Participarea DFH₄ în formarea supramoleculor în perioada prebiotică

Cercetările privind originea vieții pe Pământ efectuate în cadrul chimiei prebiotice din ultimii decenii, susțin ideea așa-numitului „scenariului glioxalic” postulat de Eschenmoser [36,54,55], conform căruia glioxalul și dimerul acestuia, DFH₄, sunt priviți ca molecule centrale de la care a pornit sinteza moleculelor biogene în „bulionul primordial” din care a apărut viața. Potrivit acestei ipoteze, glucidele, aminoacizii, bazele nucleotidice și alți compuși care participă în ciclul acidului citric s-ar fi putut forma nu doar prin reacția clasică pornind de la aldehida formică [56], ci și prin reacțiile „aqua-oligomerilor ai monoxidului de carbon precum sunt glioxalul și acidul dihidroxifumaric” (Figura 1.12) [42].

Astfel, interesul față de acidul dihidroxifumaric a sporit semnificativ în ultimii ani, în încercarea cercetătorilor de a examina mai detaliat această ipoteză.

Unele secvențe mecanistice ale scenariului glioxalic au fost deja confirmate, de exemplu reacțiile în soluții apoase dintre dihidroxifumarat și câteva aldehide cu lanț scurt au arătat că produsele de reacție (dihidroxiacetona, tetuloza și două pentuloze) s-au format cu o conversie cantitativă practic completă, aldozele fiind nedetectabile, ceea ce confirmă faptul că reacțiile dintre DFH₄ și aldehide ar putea constitui o cale de formare a carbohidraților [32,57]. De asemenea, s-a examinat auto-condensarea DFH₄ (Figura 1.13) cu formarea acidului pentulosonic, un acid glucidic care poate suferi decarboxilare cu formarea eritruulozei [58]. Un alt proces de interes în contextul scenariului glioxalic este bis-decarboxilarea DFH₄ în soluții apoase, cu formarea aldehidei glicolice care poate în continuare să formeze aldoze cu lanț carbonic superior [59].

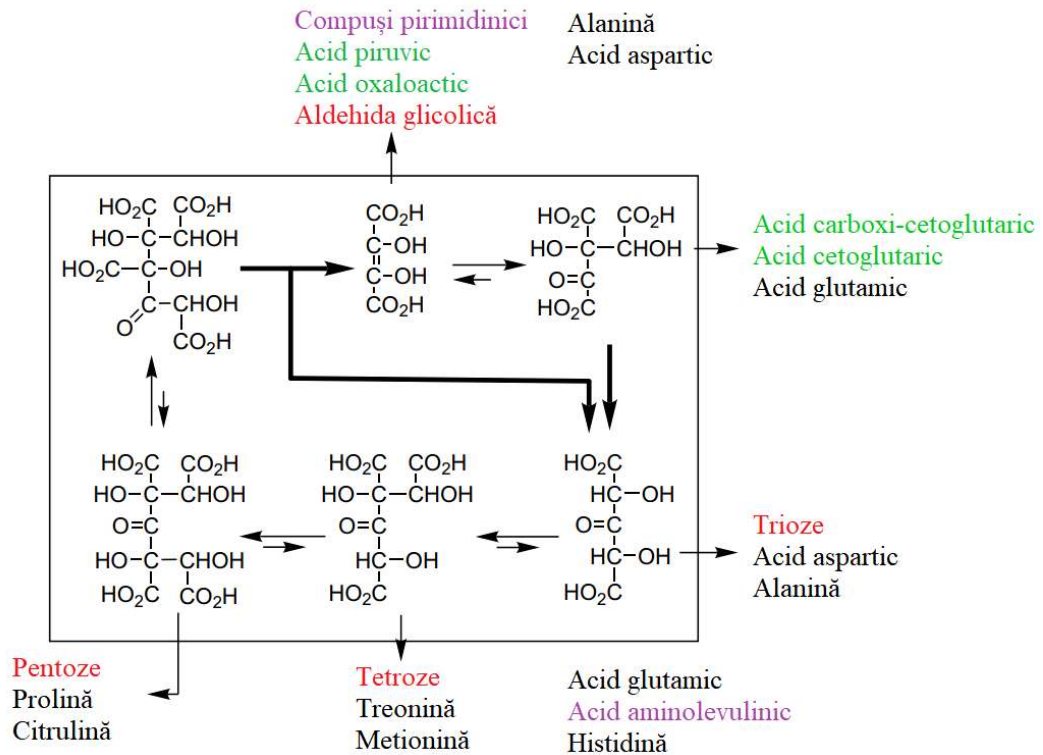


Fig. 1.12. Reprezentarea schematică a scenariului glioxalic: biomoleculele ce se pot forma din constituenții ciclului acidului dihidroxifumaric [36]

În urma sintezelor efectuate, autorii [54] au propus (Figura 1.14) o relație ipotetică între acizii carboxilici identificați de ei, ținând cont de propunerea „scenariului glioxalic” ca punct de plecare. Principalele reacții propuse pentru interconexiunile dintre diferiții acizi carboxilici sunt carboxilarea reductivă, carboxilarea, reducerea grupării carbonil, reducerea alchenelor, deshidratarea, hidratarea, decarboxilarea oxidativă și oxidarea radicalică.

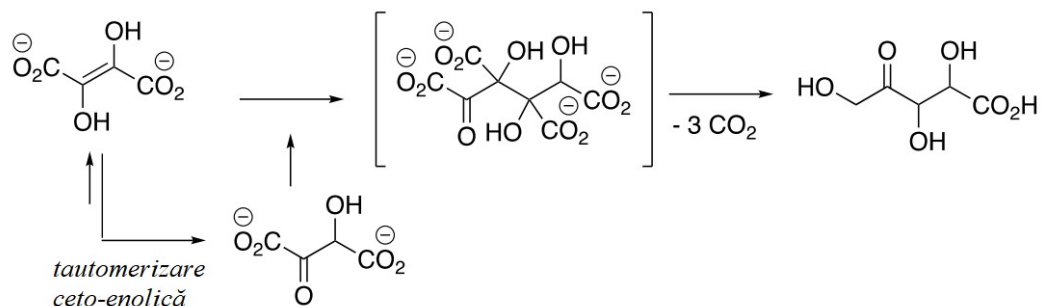


Fig. 1.13. Reprezentarea schematică a procesului de autocondensare a DFH_2^{2-} [58]

Acizii carboxilici implicați în ciclul reductiv al acizilor tricarboxilici (CRATC) sunt prezentați în chenare, iar săgețile roșii indică relația dintre acizi în cadrul teoriei ciclului reductiv al acizilor tricarboxilici, conform [55].

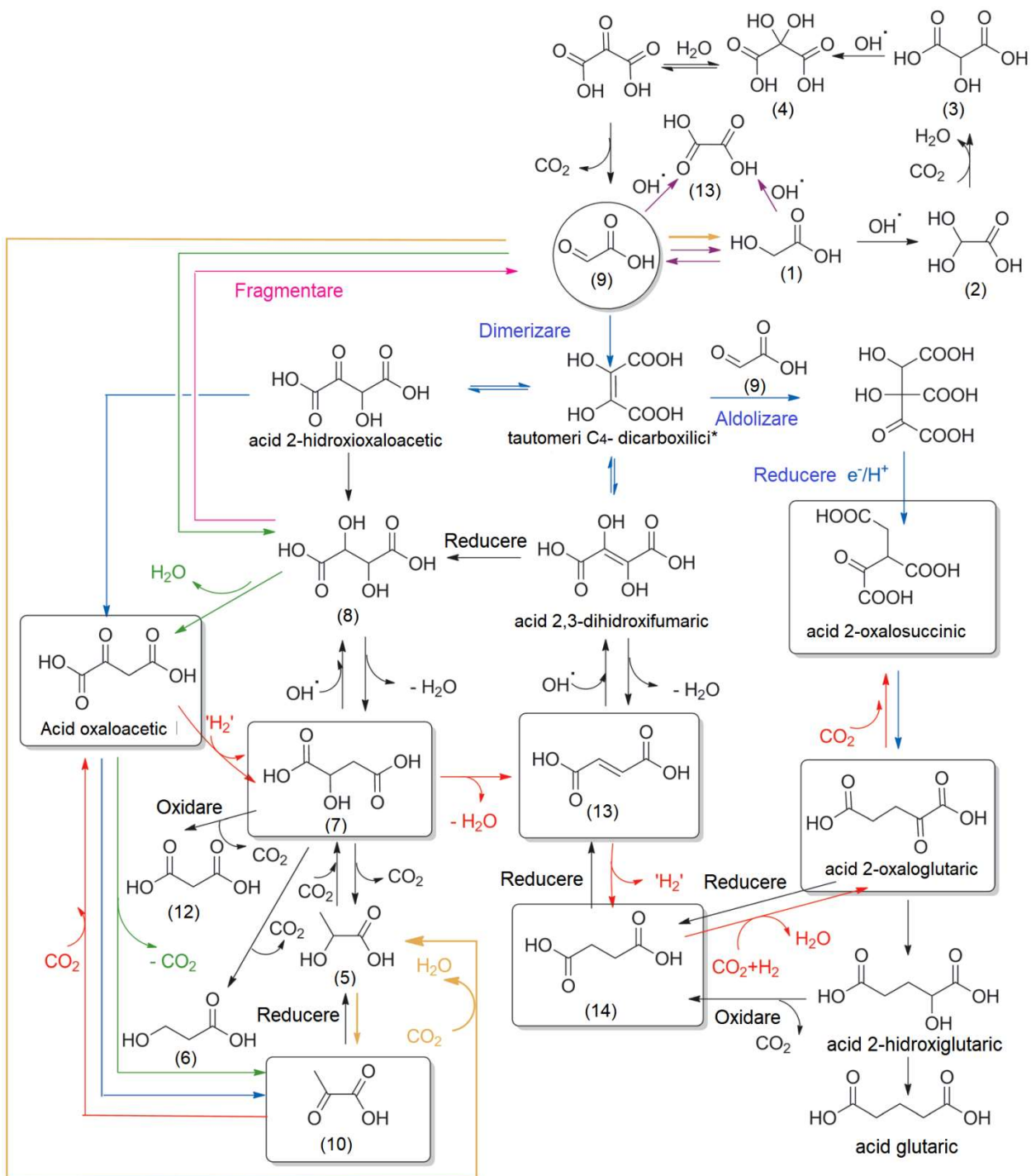


Fig. 1.14. Reprezentarea schematică a relației ipotetice între acizii carboxilici identificați de autorii [55], ținând cont de scenariul glioxalic propus în [36] și de rezultatele obținute ulterior [59,60,61,62]

Sunt prezentați prin numerotare: 1 - acidul glicolic, 2 - acidul 2,2-dihidroxiacetic, 3 - acidul 2-hidroxiimalonic, 4 - acidul 2,2-dihidroxiimalonic, 5 - acidul lactic, 6 - acidul 3-hidroxiopropanoic, 7 - acidul malic, 8 - acidul tartric, 9 - acidul glioxalic, 10 - acidul piruvic, 11 - acidul oxalic, 12 - acidul malonic, 13 - acidul fumaric, 14 - acidul succinic.

* Tautomeri C4-dicarboxilici = acid 2-hidroxiacetic, acid 2,3-dihidroxiacetic și acid 2,3-dihidroxiimalic

Săgețile albastre indică relația dintre glioxilat și constituenții CRATC, așa cum a fost propus inițial de către Eschenmoser [36]. Săgețile verzi sugerează o cale prebiotică plauzibilă, demonstrată experimental de Butch și colab., [58] care oferă o posibilitate de a intra în CRATC. Săgețile violete indică relația propusă de Menor-Salvan and Marin-Yaseli [60]. Săgețile portocalii arată calea propusă de Guzman și Martin de a intra în ciclul CRATC pe baza proprietăților catalitice ale suprafețelor de ZnS [61].

Săgeata roz arată scindarea acidului tartric pentru a produce acid glioxilic, așa cum este propus de Zubarev și colab. [62].

Astfel, grație interesului față de scenariul glioxalic, au fost inițiate un șir de cercetări experimentale pentru a confirma căile de reacție propuse între DFH₄ și acidul glioxalic, căutându-se în special similitudini cu mecanismele biologice bine cunoscute.

Reacția dintre cei doi acizi a fost cercetată la pH 7-8 [42] și a fost demonstrată formarea dihidroxiacetonei și a acidului pentulosonic prin formarea și decarboxilarea ulterioară a 2,3-dihidroxi-oxalosuccinatului. În același timp, reacția dintre cei doi acizi a fost investigată la pH 13-14 [59] și a fost demonstrată formarea mezo-tartratului și a D,L-tartratului în cantități mari, iarăși prin intermediul 2,3-dihidroxi-oxalosuccinatului. Mecanismele propuse sunt redată în Figura 1.13. Pentru comparație, au fost de asemenea studiate reacțiile dintre DFH₄ și aldehida formică la pH 7-8 [42] iar mai târziu și la pH 13-14 [59], care au arătat aceeași diferență mecanistică în formarea produșilor de reacție în dependență de pH-ul mediului de reacție.

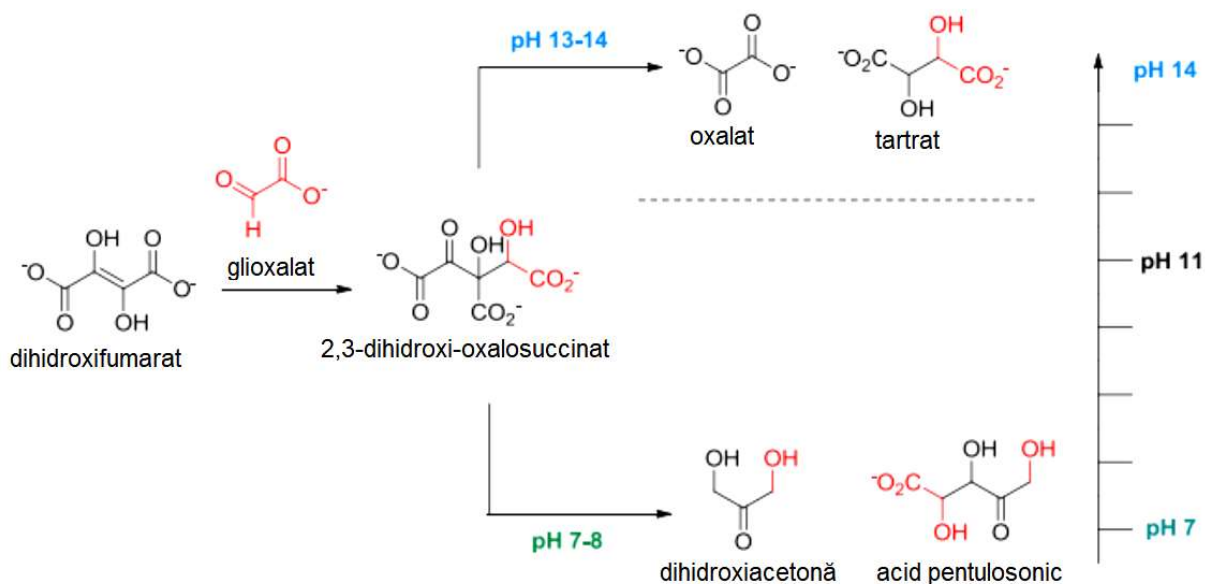


Fig. 1.15. Reprezentarea schematică a divergenței datorate pH-ului pentru reacția dintre dihidroxifumarat și glioxalat [60]

Astfel, în cazul reacției dintre DFH₄ cu acidul glioxalic și cu aldehida formică, s-a arătat în lucrările citate anterior că reacțiile au loc prin formarea compusului intermediar (Figurile 1.15 și 1.16) care, în dependență de pH, suferă o decarboxilare la pH 7-8 [42], sau o reacție de deoxalare la pH 13-14 [59].

În sistemele biologice, o diferență atât de drastică în formarea produșilor de reacție prin același intermediar, însă prin două mecanisme diferite (decarboxilare sau descompunere), în dependență de pH este în special caracteristică proceselor metabolice strict controlate de către enzime [60].

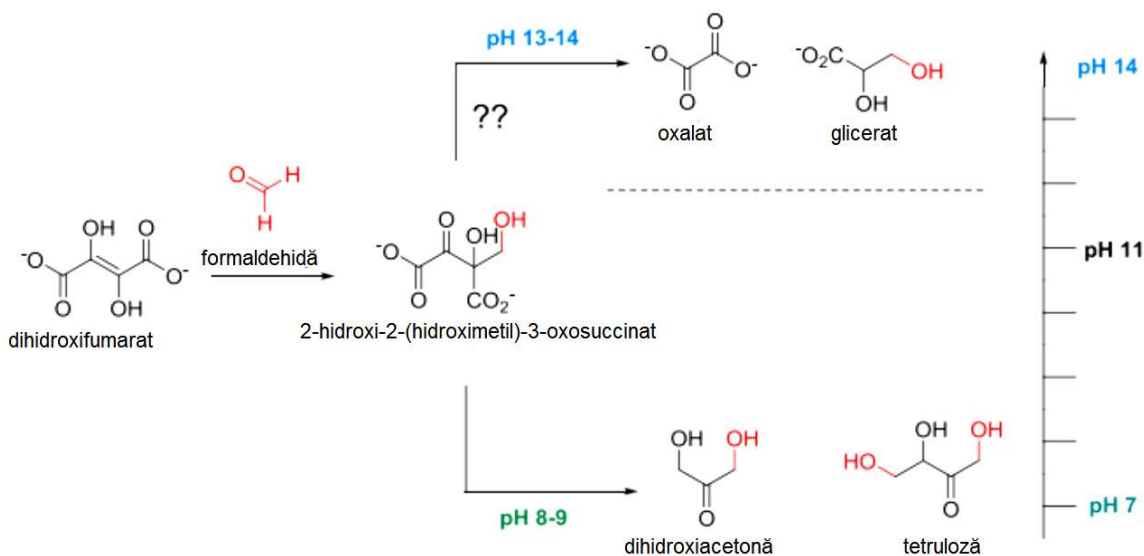


Fig. 1.16. Reprezentarea schematică a divergenței datorate pH-ului pentru reacția dintre dihidroxifumarat și formaldehidă [60]

Într-adevăr, reacțiile de fragmentare (deoxalare) a compusului intermediar, care au loc la pH 13-14, prezentate în Figurile 1.15 și 1.16 au anumite similitudini cu reacțiile ciclurilor metabolice din organismele vii [60]. Astfel, 2,3-dihidroxi-oxalosuccinatul din Figura 1.15 poate fi comparat cu oxalosuccinatul din ciclul acidului citric, care sub acțiunea enzimelor este transformat prin două mecanisme diferite: decarboxilare enzimatică cu formarea glutaratului și descompunere enzimatică cu formarea oxalatului și a succinatului [63,64]. În mod analogic, în reacția dintre DFH₄ și aldehida formică, descompunerea compusului intermediar la pH 13-14 cu formarea gliceratului, posedă similitudini cu formarea a două molecule de 3-fosfoglicerat din 1,5-bisfosoribuloză în mecanismul fosfogluconic (mecanism biochimic care generează NADPH, pentoze și riboză-5-fosfat, precursor în sinteza nucleotidelor) [60,65]. Totuși trebuie menționat

faptul că atât decarboxilarea enzimatică cât și fragmentarea enzimatică au loc în procesele metabolice la pH neutru, ceea ce pare a fi posibil datorită mecanismelor enzimaticice complexe care implică atât prezența metalelor divalente, cât și amplasamentul strategic al reziduurilor de amino acizi, și a buzunarului hidrofob în structura enzimelor, care mențin un mediu puternic nucleofil și permit direcționarea reacției fie spre decarboxilare fie spre descompunere [66].

1.4. Participarea acidului dihidroxifumaric în procesele oenologice

Pe lângă importanța acidului dihidroxifumaric în metabolismul organismelor vii și interesul din perspectiva chimiei prebiotice, trebuie menționată și importanța acestui acid în industria alimentară.

DFH₄ face parte din ciclul metabolic în perioada coacerii strugurilor și are rol de catalizator al reacțiilor redox. DFH₄ este ușor oxidat de către fermentul oxidaza acidului dihidroxifumaric. Prin urmare, strugurii conțin produsele dezintegrării sale: acizii mezoxalic, glicolic, oxalic și glioxalic [50].

DFH₄ are o importanță semnificativă atât în oenologie cât și în industria alimentară. Este bine cunoscut faptul că acizii organici contribuie la formarea acidității în vinuri - una dintre cele mai importante caracteristici ale vinurilor [67]. DFH₄ poate apărea în cantități de 1 mg/L ca urmare a oxidării acidului tartric, și în pofida conținutului mic în vin, DFH₄ joacă un rol important în procesele complexe de oxidoreducere care au loc în vin.

Anterior [67,68] a fost determinat că în cazul în care accesul aerului la materialele de vin este limitat în timpul prelucrării și maturării, și timp de un an vinul absoarbe nu mai mult de 3-5 mg/L de oxigen, atunci acidul tartric este oxidat la DFH₄ determinând un potențial redox scăzut al vinului, și reducții restabilesc substanțele oxidate, care contribuie la formarea și dezvoltarea gustului și aromei caracteristice ale vinurilor de masă. Cu toate acestea, DFH₄ se descompune ușor în condiții aerobe, și din acest motiv determinarea DFH₄ în vinuri este destul de dificilă.

La prelucrarea strugurilor au loc o serie de procese redox complexe, care predetermină calitatea produsului finit. Pentru a influența aceste procese, în industrie se utilizează diverși conservanți care au proprietăți antioxidante și antiseptice [69,70,71]. Pentru a mări stabilitatea vinurilor și a îmbunătăți proprietățile igienice ale acestora, autorii [72] au efectuat o serie de experiențe folosind DFH₄ în calitate de conservant al materialului de struguri din soiul „Aligote”. Cei mai importanți polifenoli ai acestui soi sunt catehinele: (-) catehină, (-) epicatehină, (+) catehină, (-) epigalocatehină, (+)-galocatehină, epicatehingalat etc. [73]. Acidul dihidroxifumaric are proprietăți reducătoare mai puternice decât catehina [72], din acest motiv DFH₄ în băuturile

din struguri se consumă în urma interacțiunii cu formele oxidate ale polifenolilor, fiind oxidat până la acid dicetosuccinic [74] cu decarboxilarea ulterioară a acestuia [75], în timp ce polifenolii naturali revin la formele reduse; deci oxidarea polifenolilor în vinuri este reversibilă. Acest proces reduce posibilitatea formării de particule coloidale în vin, iar DFH₄ poate fi utilizat în anumite cantități în calitate de conservant. Vinul preparat cu adaos de DFH₄ posedă calități gustative superioare în comparație cu vinul produs folosind tehnologia convențională, precum și stabilitate sporită [72].

Autorii [76] au efectuat o serie de experiențe pe materialul de struguri "Onitskansky Belyi" în condiții de micro-vinificație în conformitate cu tehnologia general acceptată, cu utilizarea DFH₄ în loc de SO₂, în calitate de conservant. Rezultatele au demonstrat că indicatorii organoleptici ai materialelor vitivinicole după 12 luni de depozitare în sticle după îndepărtarea acestora din drojdia ce conținea DFH₄, în cantitate de 110-130 mg/L (doză optimă de DFH₄) sunt comparabili celor produse cu utilizarea SO₂, având calități gustative superioare și stabilitate sporită [76]. Conform rezultatelor obținute, conținutul componentelor care determină calitatea produsului depinde atât de cantitatea de DFH₄, cât și de durata de depozitare. Cele mai mici pierderi de alcool pentru procesele oxidative au fost observate la adăugarea de DFH₄ în cantitate de 110-130 mg/L [72].

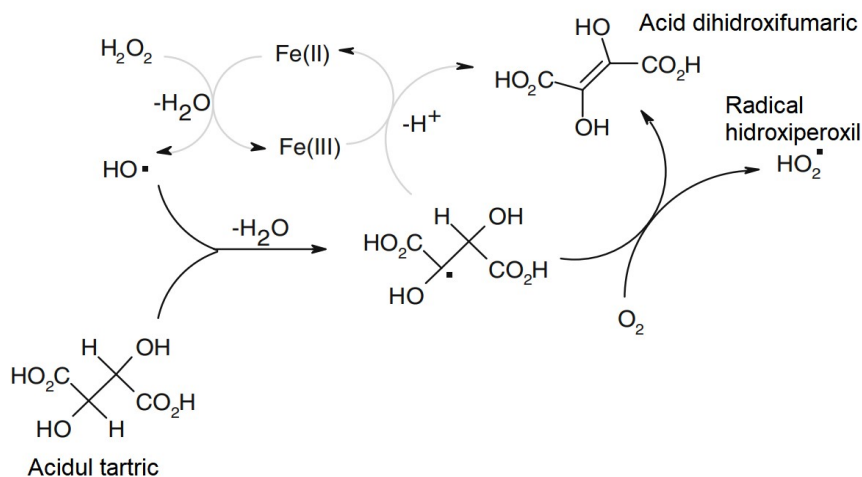


Fig. 1.17. Reprezentarea schematică a obținerii DFH₄ din acidul tartric prin acțiunea fierului(II) și a peroxidului de hidrogen, și prin acțiunea directă a radicalilor hidroxilici

Indicatori importanți ai proceselor oxidative în prepararea materialelor de struguri și în depozitarea acestora sunt modificările care apar cu substanțele de natură fenolică, și anume viteza de modificare a conținutului formelor monomerice și a cantității totale de substanțe fenolice, precum și gradul de polimerizare a substanțelor fenolice [76]. Pentru materialul vinicol

cu adaos de DFH₄ în cantități optime (110-130 mg/L), s-au observat valorile minime ale acestor parametri. În comparație cu materialul vinicol pregătit cu adaos de SO₂, viteza de modificare a conținutului formelor monomerice și a cantității totale de substanțe fenolice a fost de 4-5 ori mai mică; gradul de polimerizare a compușilor fenolici a fost, de asemenea mai mic, de 1.2-1.6 ori. Astfel, utilizarea DFH₄ în vinificație inhibă procesele de oxidare și polimerizarea a polifenolilor, prevenind apariția particulelor coloidale și opacității. Prin urmare, durata de păstrare a băuturilor de struguri în sticle poate fi mărită de 2-4 ori comparativ cu probele obținute prin metoda obișnuită folosind SO₂ [72].

Studiul efectuat de către autorii [77] pe un sistem model de vinuri albe a demonstrat că oxidarea acidului tartric de către peroxidul de hidrogen în prezența ionilor de fier(II) nu este unicul mecanism care are loc în vinuri, ci acidul tartaric poate fi transformat în DFH₄ direct de către radicalii hidroxil (Figura 1.17), care au fost generați în mediul de reacție prin gama-iradiere. La rândul său, DFH₄ intră în reacție cu (+)-catehina și duce la formarea cationilor de xantiliu, care constituie același pigment galben care se formează prin interacțiunea acidului glioxalic sau a glioxalului cu (+)-catehina. Cationii de xantiliu duc la apariția culorii gălbui a vinurilor albe, fenomen considerat nefavorabil [77].

1.4. Utilizarea DFH₄ pentru inhibiția procesului de formare a N-nitrozaminelor în sisteme model, *in vitro* și *in vivo*

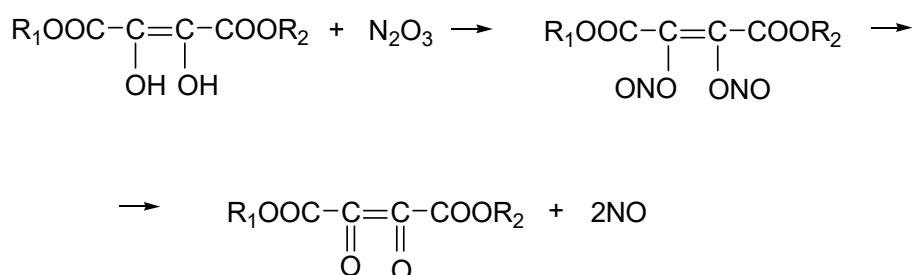
N-Nitrozaminele, substanțe puternic cancerigene, sunt derivați alifatici sau aromatici ai aminelor secundare, care au o grupare nitrozo (-NO) atașată azotului. Acestea se formează prin reacția nitritului cu aminele secundare în timpul fermentării diferitelor alimente și tutunului de țigări, precum și prin reacția *in vivo* a nitriților (utilizați în calitate de conservanți în alimente) cu amine, în condițiile acide din tractul gastro-intestinal. Trebuie remarcat faptul că și nitrații pot contribui la formarea N-nitrozaminelor prin reducerea la nitriți de către salivă sau enzimele tractului gastro-intestinal. Surse importante de N-nitrozamine sunt alimentele preparate din carne, berea, cașcavalurile, peștele preparat, peștele uscat, laptele praf și produsele cosmetice.

Din cauza toxicității nitrozaminelor, producătorii încearcă să limiteze formarea acestora în produse alimentare prin adăugarea substanțelor cu caracter antioxidant/antiradicalic.

Anterior [78] au fost studiate proprietățile antioxidante ale DFH₄ în procesul de inhibiție a nitrozării aminelor secundare alifactice și amidelor. A fost demonstrat că sub acțiunea DFH₄ are loc micșorarea conținutului agenților de nitrozare, ceea ce duce la reducerea conținutului N-nitrozaminelor ce se pot forma în prezența aminelor [78].

Efectul reducerii speciilor de nitrozare este maxim în absența oxigenului, deoarece în acest caz are loc formarea și acumularea de NO, care poate fi eliminat din mediul de reacție. Însă, în prezența O₂, oxidul de azot (II) formează acidul azotos și această reciclare este favorizată de consumarea NO cu formarea agenților de nitrozare. În acest caz, în sistem este necesară o concentrație mare de DFH₄ pentru a preveni procesul de nitrozare [78].

Mecanismul reacției dintre DFH₄, esterul său dimetilic și sarea acidă de natriu, în medii mai puțin acidulate decurge similar procesului de reducere al ionului nitrit cu acidul ascorbic, cu eliminare de NO, care nu este un agent direct de nitrozare (Figura 1.18) [78].



Unde R₁=R₂=H (pentru DFH₄); R₁=R₂=CH₃ (pentru EDM); R₁=H și R₂=Na (pentru DFH₃Na)

Fig. 1.18. Reprezentarea schematică a reacției dintre DFH₄, esterul său dimetilic și sarea acidă de natriu, în medii mai puțin acidulate [78]

O serie de studii experimentale au fost efectuate în colaborare cu Asociația „Carmez” [79] pentru a determina influența diferitor inhibitori asupra concentrației de nitrați și nitriți în diferite tipuri de salamuri fierte, semiafumate și afumate, concentrația reducătorilor variind între 0.2 – 1.2 g/kg de salam. Rezultatele experimentale au demonstrat că pentru DFH₃Na are loc o micșorare a concentrației de NaNO₂ de 5 ori, precum și o micșorare a NaNO₃ de 3 ori [78].

Activitatea inhibitoare a DFH₄ și a dihidroxifumaratului acid de sodiu a fost investigată în procesul de nitrozare a metaboliților formați în suc gastric (sistem model și real). S-a constatat că în cursul proteolizei albuminei și cazeinei de către enzimele proteolitice, acești reactivi inhibă formarea N-nitrozocompușilor fără a avea vreo influență asupra conținutului substratului de proteine nehidrolizate, asupra concentrației de aminoacizi formați sau asupra activității enzimelor specifice [77].

De asemenea, s-a constatat [80] că sarea acidă de sodiu a DFH₄ contribuie la micșorarea vitezei de formare a methemoglobinei în reacția de oxidare a hemoglobinei cu nitriți, influențând

asupra procesului de ramificare a lanțului de oxidare a HbO₂, și micșorând viteza procesului de autoaccelerare în mediul reactant.

Cercetările referitoare la formarea endogenă a N'-nitrozonornicotinei (unul dintre cei mai puternici compuși cancerigeni din tutunul nears și fumul de țigară) la șobolani au demonstrat eficiența inhibării (86%) acestui proces cu ajutorul DFH₄ [81,82]. La fel, s-a constatat că utilizarea DFH₄ și acidului tartric în dieta alimentară diminuează conținutul de N-nitrozonornicotină, care se formează la nitrozarea nornicotinei cu ioni nitriți *in vivo* [77].

DFH₄ și esterul dimetilic al acestuia au fost cu succes utilizați într-un studiu pe sistem model ca inhibitori ai procesului de nitrozare al aminei hidroclorotiazida, care este folosită ca medicament cu o înaltă activitate diuretică și hipotensivă [77].

Astfel, rezultatele prezentate în acest capitol demonstrează importanța direcției de cercetare legată de acidul dihidroxifumaric, în special ținând cont de faptul că în ultimii ani, un accent deosebit se pune pe dezvoltarea durabilă și asigurarea sănătății populației, inclusiv prin siguranța medicamentelor și a alimentelor, astfel că obținerea substanțelor noi cu caracter antioxidant/antiradicalic pe baza compușilor naturali este o direcție de mare interes și potențial aplicativ.

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. Acidul dihidroxifumaric este un compus cu un rol biologic semnificativ în natura vie, fiind un intermediar între ciclurile acizilor di- și tri- carboxilici, în mod similar cu alți hidroxiacizi, precum acizii malic, lactic, glicolic, citric, tartric.
2. În cadrul teoriilor chimiei prebiotice, se presupune că acidul dihidroxifumaric, prin reacțiile sale cu glioxalul, a servit la formarea macromoleculilor biogene, cum sunt glucidele, aminoacizii și bazele nucleotidice, în “bulionul primordial”.
3. Grație interesului față de scenariul glioxalic, au fost inițiate un șir de cercetări experimentale pentru a confirma căile de reacție propuse între DFH₄ și acidul glioxalic, găsindu-se similitudini cu mecanismele biologice bine cunoscute (divergența în funcție de pH).
4. Acidul dihidroxifumaric s-a dovedit a fi un puternic antioxidant cu aplicare practică în procesul tehnologic de vinificație și în industria alimentară.
5. DFH₄, hidrogenodihidroxifumaratul de sodiu și esterul dimetilic al acidului dihidroxifumaric au fost cu succes utilizați în inhibiția formării N-nitrozaminelor în sistemele model, *in vitro* și *in vivo*.

2. MATERIALE, ECHIPAMENT, METODE ȘI SINTEZA ORGANICĂ

2.1. Materiale și echipament

Reactivi

Toți solvenții utilizați au fost de puritate înaltă, și toți reactivii comerciali au fost utilizați fără purificare ulterioară. Eliminarea solvenților s-a efectuat sub presiune redusă. Reactivii chimici au fost procurați de la Sigma Aldrich: acidul 2,3-dihidroxifumaric, anilina, piridin-2-amina, 2-aminoetanol, 3-aminopropan-1-ol, 2-amino-2-metilpropan-1-ol, 2-amino-2-(hidroximetil)propan-1,3-diol și 2-metilpropan-2-amina.

Echipament utilizat

Plăcile analitice pentru cromatografia în strat subțire au fost de marca Silufol® UV-254 (Cehoslovacia). Spectrele IR au fost înregistrate utilizând spectrometrul Spectrul 100 FT-IR (Perkin-Elmer) cu accesoriul universal ATR de analiză a probelor. Punctele de topire (fără corecție) au fost determinate cu aparatul Boetius. Spectrele de masă au fost determinate utilizând spectrometrul de masă Thermo Scientific Exactive cu sistemul automat de injectare Advion TriVersa NanoMate. Spectrele RMN ^1H și ^{13}C au fost înregistrate utilizând soluția $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ de 2% pe "Bruker -Avance III" (400.13 și 100.61 MHz). Spectrele UV/Vis au fost înregistrate utilizând spectrofotometrul UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer).

2.2. Metode experimentale de determinare a activității antioxidante/antiradicalice

*Metoda cu DPPH**

Metoda menționată este recunoscută pe larg și poate fi cu succes aplicată pentru a determina activitatea antioxidantă a multor compuși de interes. Radicalul 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH*, Figura 2.1) este un radical liber stabil, centrat pe atomul de azot. Astfel, datorită delocalizării electronului de rezervă peste moleculă ca întreg, moleculele de DPPH* nu se dimerizează, cum se întâmplă pentru oricare alte substanțe [83].

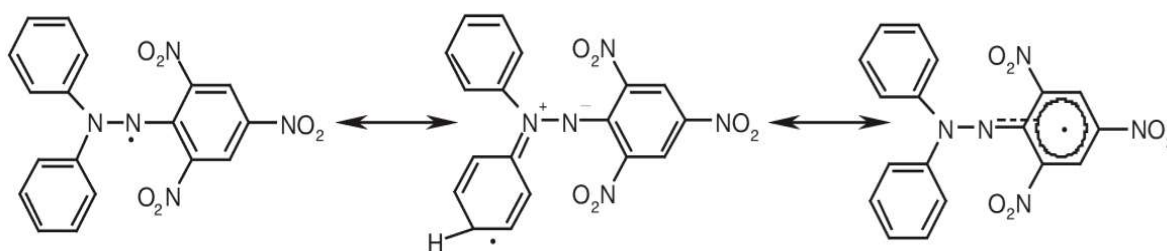


Fig. 2.1. Structura moleculară a radicalului stabil de DPPH*

O analiză cantitativă a reacției de transfer a atomului de H de la un anumit antioxidant la DPPH• oferă o modalitate destul de simplă de a caracteriza cinetica reacției. Reacțiile de transfer de hidrogen sunt monitorizate prin înregistrarea schimbării benzii de absorbție vizibile DPPH• ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$ în 70% metanol la pH 4,0), care reflectă transformarea radicalului DPPH• în hidrazina corespunzătoare (DPPH-H) de către compusul antioxidant. Astfel, la interacțiunea radicalului DPPH• cu un antioxidant, se produce o decolorare a soluției de la violet la galben (Figura 2.2). A fost utilizată metoda descrisă de W. Brand-Williams [84,85] cu unele modificări. La 2 ml de soluție metanolică ($\approx 70\%$) de DPPH• cu concentrație cunoscută au fost adăugați 2 ml de soluție metanolică ($\approx 70\%$) de reducător de diferite concentrații cunoscute. Densitatea optică la 520 nm a fost măsurată la 1; 5; 10; 20; 30; și 60 min, cu spectrofotometrul UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer), în chiuvete de cuarț cu lățimea de 1 cm. Toate experiențele au fost efectuate în triplicat.

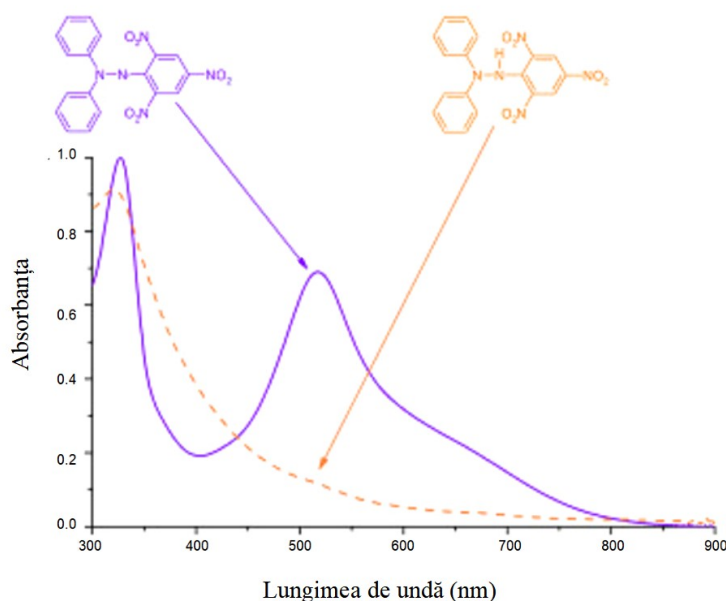


Fig. 2.2. Spectrele UV/VIS pentru radicalul stabil DPPH• și hidrazina redusă DPPH-H

Reagenții utilizați: acidul dihidroxifumaric, metanolul - marca Sigma Aldrich (Germania), derivații DFH₄ au fost sintetizați în laborator, conform metodelor descrise în § 2.1.

Metoda cu ABTS^{•+}

Activitatea de scindare a radicalului ABTS^{•+} a compușilor studiați a fost determinată utilizând procedura raportată în [86] cu unele modificări. Soluția de ABTS^{•+} a fost preparată prin

amestecarea a 8 mM acid 2,2'-Azinobis-(3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonic) (ABTS) cu 3 mM persulfat de potasiu în 25 ml apă distilată, și a fost menținută la temperatura camerei în întuneric timp de 16 ore înainte de utilizare. Soluția ABTS^{•+} a fost diluată cu etanol 95%, pentru a obține o absorbantă între 0.8 și 0.9 la 734 nm. O soluție proaspătă de ABTS^{•+} a fost preparată pentru fiecare analiză. Soluțiile antioxidante sau standard, 20 μl, au fost amestecate cu 1 ml soluție ABTS^{•+} diluată și incubate la 30 °C. Absorbanta cation radicalului de ABTS (Figura 2.2) la 734 nm a fost determinată la 1 min, 4 min și 6 min. Soluția de etanol (95%) a fost utilizată în calitate de etalon.

Pentru a determina capacitatea scindare a radicalului ABTS^{•+} a compușilor studiați în raport cu standardul Trolox, a fost trasat graficul de calibrare al acestuia (concentrațiile au variat între 0-15 mM și au fost diluate în etanol 95%), densitatea optică a fost măsurată la 734 nm exact la 1 min, 4 min și 6 min după amestecare. Toate experiențele au fost efectuate de trei ori.

Reagenții utilizați: ABTS, persulfat de potasiu, etanolul - marca Sigma Aldrich (Germania), derivații DFH₄ au fost sintetizați în laborator, conform metodelor descrise în 2.1.

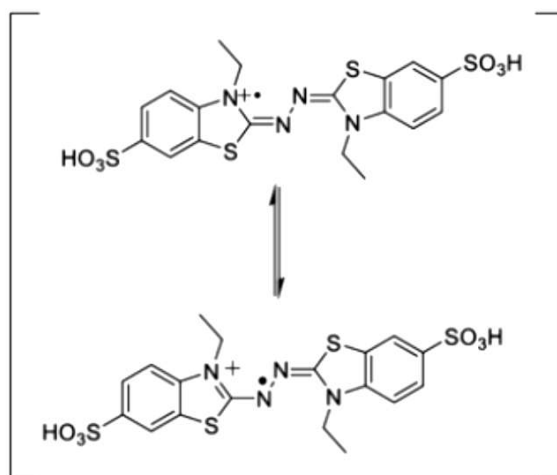


Fig. 2.3. Structura moleculară a radicalului ABTS^{•+}

În testul de decolorare ABTS^{•+}, capacitatea antioxidantă este definită ca fiind diferența dintre absorbanta acestui cation radical ($\lambda = 734$ nm) la timpul $t = 0$ min și la timpul $t = 1$ min, împărțită la absorbanta soluției inițiale. Corecția se efectuează utilizând soluția etalon. Prin urmare, activitatea antioxidantă totală (TAA) este determinată conform ecuației 1:

$$\text{TAA} = \left(\frac{T0_a - T1_a}{T0_a} \right) - \left(\frac{T0_b - T1_b}{T0_b} \right) \quad (2.1.)$$

unde T_{0a} și T_{1a} sunt absorbanțele optice ale soluției testate la 0 și 1 min, iar T_{0b} și T_{1b} sunt absorbțiile optice ale soluției etalon la 0 și 1 min. Pentru activitatea antioxidantă totală, a fost trasat graficul de calibrare pentru Trolox permițând determinarea capacității antioxidante în echivalenți Trolox (TEAC).

2.3. Metoda stopped-flow de determinare a cineticii reacțiilor rapide în soluție

Metoda *stopped-flow* (sau *stop-flow*) este o tehnică importantă utilizată în studiul reacțiilor rapide în soluție, care au loc cu formare de produși în timpuri foarte scurte, de la 0,005 secunde până la 1 minut. Tehnica a fost dezvoltată în anii 1940 prin modificarea metodei cu flux continuu, având avantajul principal al utilizării mai economice a reactivilor [87].

Astfel, în loc să se monitorizeze reacția pe lungimea tubului de reacție, sistemul de detecție a fost plasat într-un punct fix aproape de camera de amestec pentru a avea posibilitatea de a urmări reacția în timp real după oprirea bruscă a seringilor de propulsare a reagenților (Figura 2.4). Într-un timp foarte scurt, celula spectroscopică este umplută grație mișcării unui piston, conectat de un comutator care declanșează dispozitivul de măsurare a absorbției și fluxul este oprit brusc [88].

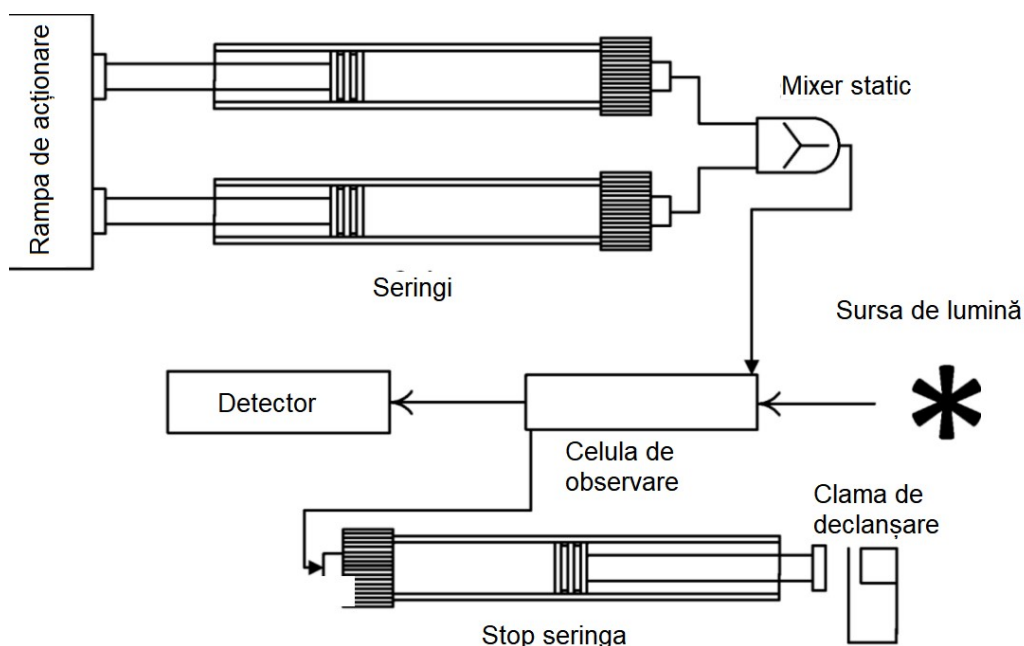


Fig. 2.4. Reprezentarea grafică a principiului de lucru al aparatului stopped-flow

Celula spectroscopică are un volum de aproximativ 40 mL cu dimensiuni de 2 x 2 x 10 mm, având astfel o bună sensibilitate pentru măsurătorile de absorbție cu o lungime de 10 mm. O

astfel de celulă are *timpul mort* de aproximativ 1–2 ms, ceea ce reprezintă timpul la care poate fi începută monitorizarea reacțiilor. Reducerea dimensiunilor celulei scade timpul mort, dar influențează negativ sensibilitatea. Seringile de antrenare (propulsare) a reagenților au volum egal și sunt acționate cu ajutorul aerului aflat sub presiune (5 atm), astfel încât să asigure o mișcare foarte rapidă, însă sub limita în care cavitația ar putea deveni o problemă. Cavitația apare din zonele locale de presiune scăzută care provoacă formarea de bule de vid care interferează cu amestecarea și înregistrarea optică.

În progresia reacției *stop-flow* (cu flux oprit) pot fi identificate trei faze (Figura 2.5). În primul rând, are loc spălarea soluției din reacția anterioară; în al doilea rând, există o scurtă fază de curgere continuă pe măsură ce noua soluție trece prin celulă; și în al treilea rând, curgerea este oprită și începe măsurarea profilului de reacție [87]. Aparatul stop-flow este configurat astfel încât dispozitivul de monitorizare să fie declanșat la începutul celei de-a treia faze. Cu toate acestea, uneori este util de a verifica întregul profil pentru a optimiza volumul total de reactivi care se utilizează la fiecare apăsare (de obicei, de două ori volumul celulei spectroscopice) [88].

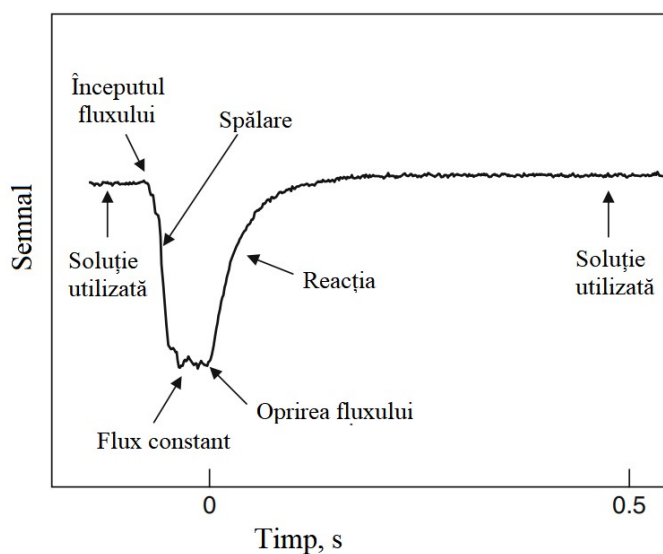


Fig. 2.5. Etapele de înregistrare a unei reacții stop-flow [87]

Timpul de detecție al aparatului stop-flow este timpul dintre sfârșitul amestecării celor două soluții și începutul înregistrării absorbției pentru observarea cineticii reacției. Aparatul utilizat în această lucrare este marca KinTek Corp. (SUA), modelul SF E-100, cu timpul de detecție de 0.1 s.

În cadrul experimentelor, seringă I conținea soluție de DPPH• și seringă II conținea soluție de compus cercetat de diferite concentrații. Solventul utilizat în cadrul experiențelor a

fost soluția metanol:apă (70:30, v/v). Dispariția radicalului a fost urmărită prin înregistrarea absorbției la 520 nm, la temperatura camerei. Cel puțin trei determinări independente au fost efectuate pentru fiecare din concentrațiile studiate ale compușilor cercetați, luându-se în calcule ulterioare media matematică a lor.

2.4. Calcule cuanto-chimice efectuate prin metoda DFT

Studiile teoretice au fost efectuate cu ajutorul programului ORCA [89,90], care este un sistem de determinare a structurii electronice de uz general. Statistica disponibilă a citărilor indică faptul că ORCA a devenit unul dintre cele mai utilizate programe din comunitatea chimică computațională. Avantajele față de alte programe similare constau în faptul că acest soft este gratuit pentru cercetătorii universitari, include o gamă largă de metode teoretice implementate, este robust, eficient și oferă posibilitate de a studia, pe lângă altele, și metalele de tranziție și proprietățile spectroscopice [89]. Un alt avantaj îl constituie faptul că ORCA este scris în limbajul de programare C++ de la zero și nu se bazează pe niciun alt pachet anterior de programe de structură electronică. Softul este creat la Institutul Max Planck pentru Conversia Energiei Chimice din Mülheim, Germania, în grupul de cercetare condus de Prof. Frank Neese. Teoria funcțională a densității (DFT) în ORCA este dezvoltată în mare parte de grupul Prof. Grimme de la Universitatea din Bonn, Germania.

Unele caracteristici ale programului ORCA care au fost utilizate în cadrul acestei teze sunt prezentate mai jos:

1. Posibilitatea de a calcula funcțiile moleculare prin metoda SCF în aproximațiile RKS și UKS;
2. Optimizarea geometriei structurilor de interes în mod automat, calculul profilului vibrațional și a parametrilor termodinamici;
3. Găsirea stărilor de tranziție prin scanarea energiei potențiale de-a lungul lungimii legăturii chimice sau prin rotirea unghiurilor de interes;
4. Identificarea stărilor de tranziție prin metoda NEB (Nudged Elastic Band) complet implementată;
5. Soluționarea problemei vibraționale – calculul frecvențelor de vibrație IR și spectrul Raman;
6. Calculul proprietăților moleculare, cum ar fi momentul dipol, potențialul electrostatic, densitatea electronică și de spin, analiza populării după Mulliken, Lowdin, Hirschfield;
7. Posibilitatea de a studia influența solventului utilizând modelul universal de solvatare SMD (Solvation Model based on Density) implementat în soft.

2.5. Sinteza organică a derivaților DFH₄

Sinteza organică a derivaților a fost efectuată de către autoare în colaborare cu Laboratorul de Sinteza Organică al Institutului de Chimie.

Sinteza dimetil 2,3-dihidroxifumaratului 2

Amestecul de acid 2,3-dihidroxifumaric **1** (1.48 g, 0.01 mol), Me₃SiCl (0.324 g, 0.03 mol) și 5 ml de MeOH a fost agitat timp de 3 zile. Excesul de Me₃SiCl și MeOH a fost evacuat prin vacuum. Compusul **2** a fost separat sub formă de cristale albe prin precipitare cu amestec de hexan/Et₂O și filtrare. Randament: 1.16 g, 60%. Spectrul ¹H RMN: 3.94 s (6H, 2CH₃), 9.36 s (2H, 2OH). MS *m/z* 231.0472 (M⁺+Na).

Sinteza (*E*)-metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoatului 5

Amestecul esterului **2** (1.76 g, 0.01 mol) și 2 ml de anilină a fost agitat la temperatura de 75-80 °C timp de 3 ore. Excesul de amină a fost evacuat cu ajutorul vidului. Compusul **5** a fost separat prin cromatografia în coloană. Randament: 1.90 g, 66%. Spectrul ¹H RMN: 3.62 s (3H, CH₃), 7.82 s (2H, 2OH), 6.48-7.87 m (5H, arom).

Sinteza 2,3-dihidroxi-N¹,N⁴-di(piridin-2-il)fumaramidei 6

Amestecul esterului **2** (1.76 g, 0.01 mol) și piridin-2-aminei (0.940 g, 0.01 mol) a fost agitat la temperatura camerei timp de 8 ore. După finalizare (analiză cromatografie în strat subțire), amestecul de reacție a fost introdus pe coloana de silicagel și eluat cu hexan-etilacetat pentru a separa produsul **6**. Randament: 2.31 g, 77%. Spectrul ¹H RMN: 7.69 br s (2H, 2OH), 6.67-7.92 m (8H, arom). Spectrul ¹³C RMN: 157.32, 148.81, 141.76, 141.20, 138.87, 113.41, 112.36.

Sinteza 2,3-dihidroxi-N¹,N⁴-bis(2-hidroxietyl)fumaramidei 7

Amestecul esterului **2** (1.76 g, 0.01 mol) și 2-aminoetanolului (2 ml) a fost agitat la temperatura camerei timp de 6 ore. După finalizare (analiză cromatografie în strat subțire), excesul de 2-aminoetanol a fost eliminat în vid. Compusul **7** a fost separat sub formă de cristale albe prin cristalizare din EtOH și filtrare. Randament: 1.64 g, 70%. Spectrul ¹H RMN: 3.25 t (4H, 2CH₂N, *J* = 6.0), 3.44 t (4H, 2CH₂N, *J* = 6.0), 4.5-4.85 s (2H, 2C=OH), 8.57 t (2H, 2 NH, *J*=4.0). Spectrul ¹³C RMN: 160.49, 154.9, 59.68, 42.13. MS *m/z* 257.0711 (M⁺+Na).

Sinteza 2,3-dihidroxi-N¹,N⁴-bis(2-hidroxi-propil)fumaramidei 8

Amestecul de ester **2** (1.76 g, 0.01 mol) și 2 ml de 3-aminopropan-1-ol a fost agitat la temperatura camerei timp de 6 ore. După finalizare (analiză cromatografie în strat subțire), excesul de 3-aminopropan-1-ol a fost eliminat cu ajutorul vidului. Compusul **8** a fost separat sub formă de cristale albe prin cristalizare din EtOH și filtrare. Randament: 1.57 g, 60%. Spectrul ¹H RMN: 1.56-1.62 m (4H, 2 CH₂CH₂CH₂), 3.16-3.25 m (4H, 2CH₂N), 3.39-3.42 m (2H, 2CH₂OH), 3.5-4.0 br s (4H, 4 OH), 8.7 t (2H, 2 NH, *J*=4.0). Spectrul ¹³C RMN: 172.18, 160.47, 59.18, 37.01, 32.77. MS *m/z* 285.1041(M⁺+Na).

Sinteza 2,3-dihidroxi-N¹,N⁴-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramidei 9

Amestecul esterului **2** (1.76 g, 0.01 mol) și 2-amino-2-metilpropan-1-olului (0.890 g, 0.01 mol) a fost agitat la temperatura camerei timp de 12 ore. După finalizare (analiză cromatografie în strat subțire), amestecul de reacție a fost introdus pe coloana de silicagel și eluat cu hexan-etil acetat pentru obținerea produsului **9**. Randament: 2.18 g, 75%. Spectrul ¹H RMN: 1.06 s (12H, 4 CH₃), 3.25 s (4H, 2CH₂), 4.7-5.2 br s (4H, 4 OH), 7.81 s (2H, 2 NH). Spectrul ¹³C RMN: 164.76, 159.86, 69.29, 53.83, 24.82.

Sinteza N¹,N⁴-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxi-fumaramidei 10

Amestecul format din esterul **2** (1.76 g, 0.01 mol) și 2-amino-2-(hidroximetil)propan-1,3-diol (1.21 g, 0.01 mol) a fost agitat la temperatura de 50-55 °C timp de 12 ore. După finalizare (analiză cromatografie în strat subțire), compusul **10** a fost separat sub formă de cristale albe prin cristalizare din MeOH și filtrare. Randament: 2.44 g, 69%. Spectrul ¹H RMN: 3.29-3.62 m (12H, 6CH₂), 4.0-5.3 br s (8H, 8 OH), 7.79 s (2H, 2 NH). Spectrul ¹³C RMN: 175.3, 159.90, 65.37, 56.50.

Sinteza N¹,N⁴-di-tert-butil-2,3-dihidroxi-fumaramidei 11

Amestecul format din esterul **2** (1.76 g, 0.01 mol) și 2-metilpropan-2-amină (0.73 g, 0.01 mol) a fost agitat la temperatura camerei timp de 8 ore. După finalizare (analiză cromatografie în strat subțire), compusul **11** a fost separat sub formă de cristale albe prin cristalizare din EtOAc și filtrare. Randament: 1.81 g, 70%. Spectrul ¹H RMN: 1.23 s (18H, 6CH₃), 5.0-6.3 br s (2H, 2 OH), 7.61 s (2H, 2 NH). Spectrul ¹³C RMN: 173.5, 160.60, 50.89, 28.76.

Sinteza acidului (*E*)-3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic 12

Amestecul format din acidul **1** (1.48 g, 0.01 mol) și *o*-fenilenediaminei (1.08 g, 0.01 mol) a fost refluxat timp de 18 ore în 20 ml de acid clorhidric 4*N*. Amestecul de reacție a fost răcit, dihidroclorura cristalină a fost separată prin filtrare. Produsul a fost tratat cu NH₄OH, soluție apoasă de 20% și spălat sub apă. Acidificarea filtratului amoniacal cu AcOH au dus la formarea monobenzimidazolului corespunzător. Încercările de a recrystaliza produsul din EtOH au produs o rășină **12**, care s-a solidificat la aer. Randament: 1.07 g, 49%. Se descompune la 250 °C. Spectrul ¹H RMN: 5.0-6.3 br s (3H, 2OH, NH), 7.15-7.6 m (2H, arom), 7.7-7.81 m (2H, arom), 10.06 s (1H, CO₂H).

Sinteza (*E*)-1,2-di(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etene-1,2-diolului 13

Amestecul format din acidul **1** (1.48 g, 0.01 mol) și *o*-fenilendiamină (2.16 g, 0.02 mol) a fost refluxat timp de 36 ore în 50 ml de acid clorhidric 5*N* pe baia de ulei la 135 °C în atmosfera de N₂. Amestecul a fost răcit pe baia de gheață pentru a separa sărurile hidroclorice de bisbenzimidazolul **13**. În acest caz, produsul obținut a fost tratat cu o soluție fierbinte de bicarbonat de sodiu în loc de soluția amoniacală. Recrystalizarea produsului din etilen glicol sau EtOH au dus la obținerea, în ambele cazuri, a rășinii **13**, care s-a solidificat la aer. Randament: 0.876 g, 30%. Se descompune la temperatura de 250 °C. Spectrul ¹H RMN: 4.7-6.9 br s (6H, 4OH, 2NH), 7.16-7.68 m (8H, arom).

2.6. Concluzii la capitolul 2

1. În cadrul tezei a fost utilizat un spectru larg de metode moderne de cercetare, atât experimentale cât și teoretice. Toate metodele au fost preluate din surse științifice, iar unele au fost adaptate la specificul cercetării (metoda cu DPPH).
2. Au fost sintetizați 10 derivați stabili ai DFH₄.
3. Pentru identificarea compoziției, structurilor și purității substanțelor obținute au fost utilizate următoarele metode de cercetare: identificarea punctelor de topire, cromatografia în strat subțire, spectroscopia UV/Vis, FT-IR, RMN ¹H și ¹³C, analiza elementală.

3. STUDIUL EXPERIMENTAL AL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A DFH₄ ȘI A DERIVAȚILOR OBTINUȚI CU RADICALII DPPH[•] ȘI ABTS^{•+}

3.1. Obținerea și caracterizarea derivaților sintetizați din DFH₄

În capitolul 1 s-a arătat că DFH₄ **1** posedă o stabilitate scăzută din cauza proceselor de oxidare, decarboxilare și auto-condensare care au loc în soluție, prin urmare un obiectiv important care va fi discutat în acest capitol se referă la sinteza unor derivați ai DFH₄ **1**, cu scopul de a obține structuri stabile care să stabilizeze fragmentul enediolic, menținând astfel și activitatea antioxidantă.

Având în structura sa fragmente carboxil-, hidroxil- și olefină, DFH₄ poate fi utilizat pentru a crea macrocicluri porfirinici sau pirimidinici [91,92]. Totuși, în pofida progreselor evidente în această direcție, chimia acidului dihidroxifumaric **1**, rămâne a fi un domeniu slab studiat în multe aspecte. Printre lucrările ce țin de modificarea acidului **1** există date limitate cu privire la sinteza derivaților aminici, inclusiv a celor cu un fragment heterociclic [28,93].

Crearea a noi compuși pe bază de acid dihidroxifumaric **1**, căutarea a noi sintoni pentru sinteza dirijată și studiul relației "structură-proprietate" este o sarcină actuală, de mare interes practic, cărei îi este dedicată o parte din acest capitol.

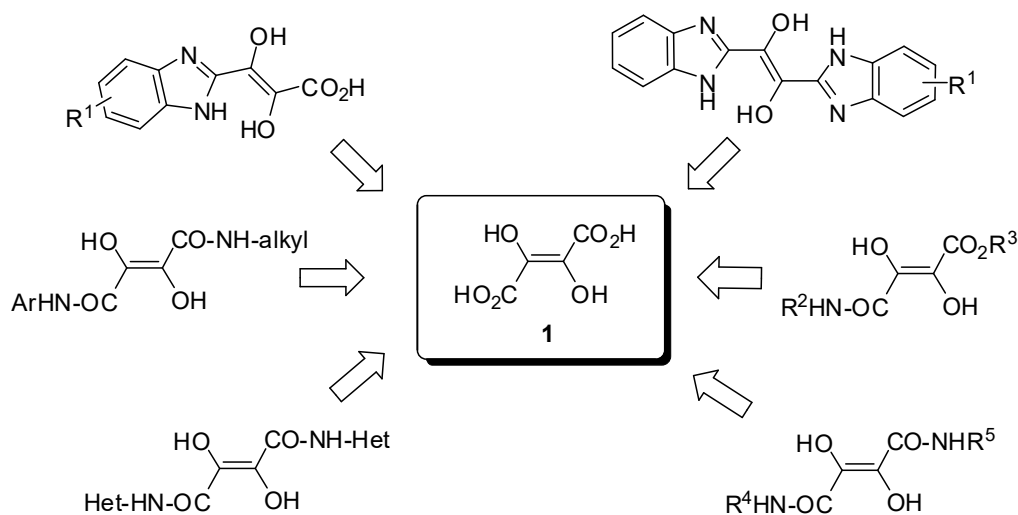


Fig. 3.1. Prezentarea schematică a unor derivați ce conțin azot ce pot fi obținuți din DFH₄

În elaborarea abordărilor sintetice pentru obținerea substanțelor noi, s-a ținut cont de progresele în ceea ce privește transformarea acidului dihidroxifumaric **1**, printre care nu a fost

menționată sinteza benzimidazolilor (Figura 3.1.). Aceștia pot fi obținuți ca rezultat al interacțiunii o-fenilendiaminei cu acidul **1**. Prin ajustarea raportului reactanților este posibilă sintetiza a mono- și bisbenzimidazolilor. O abordare alternativă pentru congenerii simetrici și asimetrici poate fi reacția de amidare selectivă a acidului **1**. Alegerea substraturilor depinde, în primul rând, de interesul practic, care se manifestă în elaborarea metodelor pentru sinteza derivaților corespunzători ai acidului **1**, precum și de interesul față de procesele chimice care au loc în cursul formării produselor dorite.

Derivații ce conțin azot ai acidului **1** pot deschide noi posibilități în sinteza organică: selectarea combinațiilor adecvate de substituenți va permite adaptarea polarității în limite largi, a capacității de solvatare, a proprietăților catalitice și, prin urmare, poate influența profunzimea și selectivitatea reacției.

Interesul față de mecanismul de oxidare și izomerizare a *trans*-**1** și *cis*-enediolilor **4** ne-a determinat să încercăm pregătirea diferitor izomeri din această serie, conform Figura 3.2 [94].

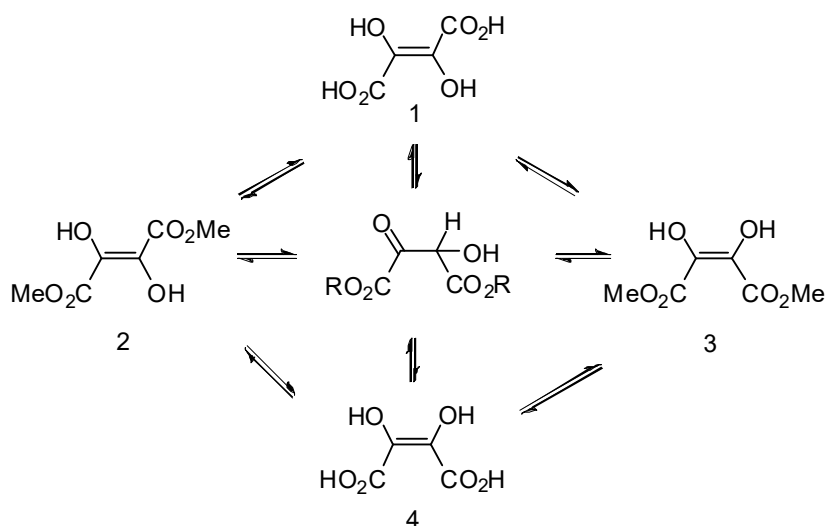


Fig. 3.2. Transformările formelor izomerice ale DFH₄

Este cunoscut faptul că metilarea acidului dihidroxifumaric **1** poate fi realizată prin acțiunea MeOH/acizi sau diazometan. În ambele cazuri, configurația esterilor **2** este *trans* [26,39].

În cadrul acestui capitol este descrisă o esterificare nouă a DFH₄ cu metanol sub acțiunea clorurii de trimetilsilan.

În acest caz, esterul are p.t. la 149 °C, deși autorii [26,39] au obținut valoarea de 173 °C. Spectrele IR înregistrate sunt foarte similare cu datele din literatură pentru compusul **2**. Trebuie

menționată o diferență importantă în deplasarea benzii esterului (*trans*- la 1677.8 cm⁻¹ *cis* – la 1670.7 cm⁻¹), absența oricăror diferențe în benzile C=C și o mică diferență în deplasarea benzii OH la 3164.5 cm⁻¹ și la 3168.2 cm⁻¹, respectiv.

În spectrul ¹H RMN al compusului **2** semnalele ambelor grupări metilice sunt localizate în regiunea caracteristică pentru esterii metilici (la 3.94 ppm), iar semnalul grupărilor hidroxilice a fost observat ca singlet la 9.36 ppm. În spectrul de masă al compusului investigat, masa ionului molecular *M*⁺ este de 176.03. Aceste date, împreună cu datele analizei elementale sugerează structura esterului **2**.

Transformarea esterilor în amide este o reacție utilă, care permite prepararea unei serii largi de amide, în dependență de amina inițială. Reacția este deosebit de utilă deoarece esterul **2** poate fi ușor sintetizat, chiar și în cazurile când nu se poate spune același lucru despre acilhalidele sau anhidridele respective. Deși mai multe cercetări au fost consacrate mecanismului acilării aminelor cu esteri decât cu alți reactivi, detaliile mecanistice nu sunt încă în totalitate clare. În cadrul lucrării de față au fost sintetizați un șir de derivați noi ai acidului dihidroxifumaric, în colaborare cu Laboratorul de Sinteză Organică al Institutului de Chimie.

În condiții alcaline obișnuite, reacția este catalizată de bază, indicând asupra faptului că un proton este transferat în cadrul etapei determinante de viteză, și sunt implicate două molecule de amină.

Încălzirea esterului **2** în soluția de anilină timp de două ore duce la formarea unui singur produs, a cărui structură a fost determinată din datele spectrale. Caracteristica specifică a spectrului ¹H RMN a compusului investigat, în comparație cu cel al compusului **2**, este prezența a două semnale singlet la 3.62 ppm (OMe), 7.82 ppm (OH) și semnale ale grupărilor aromate în regiunea 6.48-7.88 ppm. Aceste date sunt susținute de benzile caracteristice din spectrul IR, la 1474, 1496, 1595 cm⁻¹ (Ar), 1568 cm⁻¹ (CONH), 1665 cm⁻¹ (CO₂). Aceste date, împreună cu rezultatele analizei elementale, confirmă structura **5** (Figura 3.3).

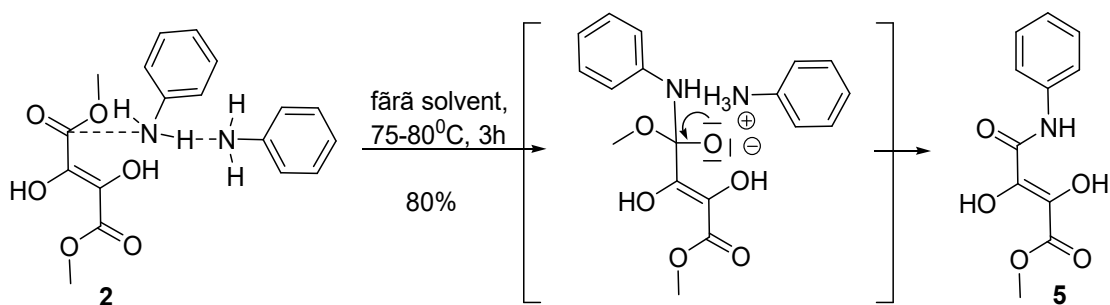


Fig. 3.3. Schema de sinteză a (*E*)-metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoatului **5**

Prin mărirea timpului de reacție și a temperaturii până la punctul de fierbere al anilinei nu s-a putut ajunge la formarea bis-anilidei. Ar trebui menționat faptul că tentativa de sinteză a amidei mixte prin încălzirea eterului **5** cu monoetanolamina de asemenea nu a avut succes.

Un rezultat interesant în reacția de amidare a esterului **2** a fost obținut la înlocuirea anilinei cu analogul ei ce conține azot - 2-aminopiridina (Figura 3.4).

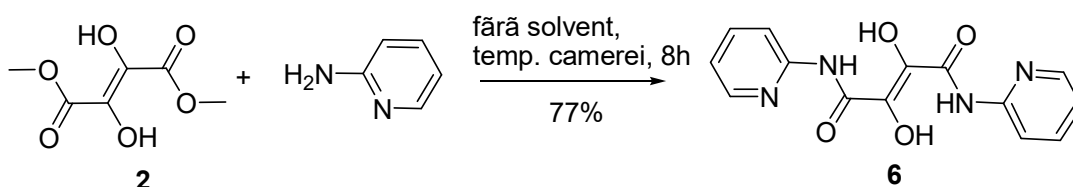


Fig. 3.4. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-di(piridin-2-il)fumaramidei 6

În urma reacției, a fost separată o substanță cristalină cu temperatura de topire de 145 °C, i.e. cu patru grade mai joasă decât a compusului inițial **2**. În spectrul IR al compusului cercetat apar benzile caracteristice pentru Py, -CO-NH- și grupările OH. În comparație cu spectrul ¹H RMN al compusului **5**, semnalul grupării CO₂Me nu a fost observat. În domeniul slab al spectrului său ¹³C RMN, sunt prezente șapte semnale ale atomilor de carbon la 57.32, 148.81, 141.76, 141.20, 138.87, 113.41 și 112.36 ppm. Aceste rezultate, împreună cu datele analizei elementale, sugerează structura **6**.

Astfel, înlocuirea atomului de carbon în inelul benzenic cu atomul de azot din amina inițială a avut o influență semnificativă asupra caracterului compusului format.

S-a menționat anterior că încercările de a sintetiza amide mixte cu utilizarea monoetanolaminei și a esterului **5** s-au dovedit a fi fără succes.

În cazul în care procesul de amidare are loc la temperatura camerei cu utilizarea esterului **2** și a monoetanolaminei, produsul de reacție este bis-amidoalcoolul **7** (Figura 3.5).

În spectrul IR al acestui compus există benzi caracteristice amidei și grupărilor hidroxilice (a se vedea în Cap. 2). Spectrul ¹H RMN al compusului **7** conține semnale ale grupărilor hidroxilice primare și terțiare (în regiunea 3.3-3.45 și 4.5-5.0 ppm, respectiv), semnale cuartet (la 3.2 ppm) și triplet (la 3.44 ppm) ale grupărilor metilenice, care sunt complementate de semnalul protonului amidei la 8.57 ppm. În regiunea înaltă a spectrului ¹³C RMN se evidențiază două semnale ale atomilor de carbon (a se vedea în Cap. 2), care sunt completate de două semnale în regiunea slabă la 154.9 și 160.49 ppm. În spectrul de masă a compusului cercetat, masa ionului molecular *M*⁺ este de 234.08.

În cadrul lucrării, a fost cercetată influența naturii omologilor monoetanolaminei asupra vitezei de reacție și a proprietăților fizico-chimice ale amidelor acidului DFH4.

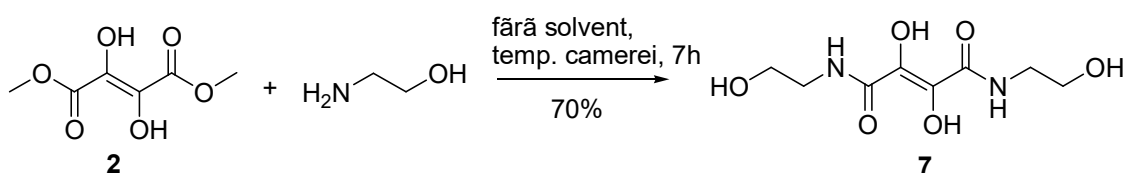


Fig. 3.5. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(2-hidroxietyl)fumaramidei 7

Mărirea catenei radicalului alchil cu un fragment metilenic în aminoalcoolul inițial a dus la micșorarea randamentului total al reacției, precum și a punctului de topire, de la 158-160 °C la 142-143 °C.

A fost sintetizat și caracterizat spectral omologul **8** (Figura 3.6). Prezența unei grupări metilenice adiționale în structura compusului **8**, în comparație cu structura **7**, este demonstrată de semnalul caracteristic în spectrul său ^1H RMN (în regiunea 1.5-1.61 ppm), care este în concordanță cu semnalul din spectrul său ^{13}C RMN la 32.77 ppm. În spectrul de masă a compusului cercetat, masa ionului molecular M^+ este de 262.11.

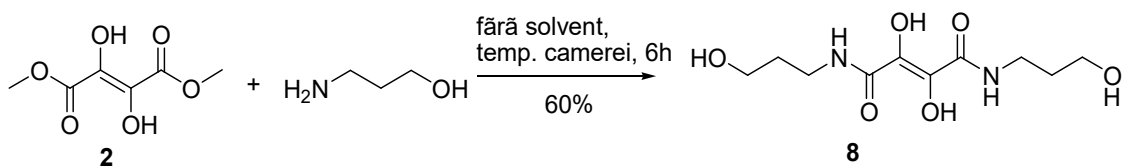


Fig. 3.6. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(2-hidroxiopropil)fumaramidei 8

Prezența a două grupări metilice în poziție α față de gruparea amină în 2-amino-2-metilpropan-1-olul inițial nu a micșorat randamentul diamidei preconizate **9** (Figura 3.7). Analogic cu sinteza anterioară, această reacție a fost realizată la temperatura camerei.

Reacția cu utilizarea 2-amino-2-(hidroximetil)propan-1,3-diolului (Figura 3.7) a micșorat reactivitatea aminei. Conform datelor cromatografiei în strat subțire, numai în cazul fuzionării reactivilor inițiali la 50 °C s-a observat formarea unui singur produs. Ca rezultat al reacției, care a avut loc cu un randament de 69%, a fost separată N^1,N^4 -bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxi-fumaramida **10**, iar structura acesteia a fost confirmată prin metode spectrale și fizico-chimice.

Astfel, în spectrul său ^1H RMN există semnale multiplu ce aparțin celor șase grupări metilenice în regiunea 3.37-3.62 ppm. Semnalele celor șase grupări hidroxilice sunt înregistrate în regiunea de la 3.62 până la 5.3 ppm.

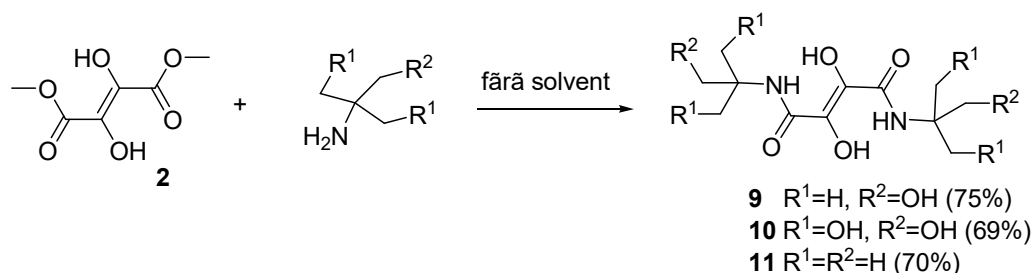


Fig. 3.7. Schema de sinteză a 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramidei **9**, N1,N4-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxifumaramidei **10** și N1,N4-di-tert-butil-2,3-dihidroxifumaramidei **11**

Trebuie menționat faptul că omologul **11** (Figura 3.7) poate fi sintetizat la temperatura camerei prin amestecarea tert-butilaminei cu esterul **2**. În acest caz, randamentul reacției este practic egal cu cel menționat mai sus. Spre deosebire de omologul **9**, produsul separat **11**, analogic cu compusul **10** reprezintă o substanță cristalină.

După sineza unei serii de amide ale acidului **1**, a urmat obținerea derivaților heterociclici.

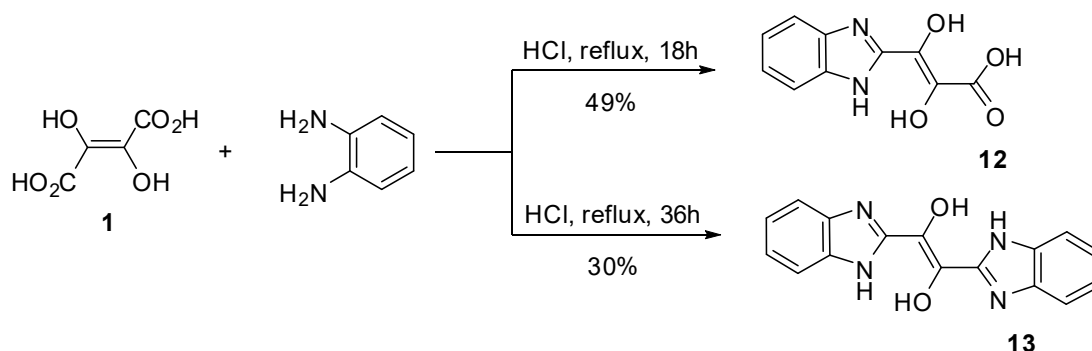


Fig. 3.8. Schema de sinteză a acidul (E)-3-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic **12** și a (E)-1,2-di(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etene-1,2-diolului **13**

Nucleul benzimidazolic s-a bucurat de un interes științific considerabil odată ce s-a constatat că benzimidazolul inhibă creșterea drojdiilor și anumitor bacterii. De asemenea, derivații benzimidazolici cu diferite efecte farmacologice (antihistaminic [95], antiulcer [96], antihipertensiv [97], anticancer, antimicrobial, antivirals antiparazitic [98]) sunt pe larg utilizați în tratamentul clinic.

Tabelul 3.1. Rezultatele analizei compușilor sintetizați

Compus/ Formula moleculară	Starea de agregare/ Culoare/ T.t. °C	Metoda ^a / randament (%)	IR (Nujol) v, cm ⁻¹	Analiza elementală		
				Calculat /Determinat C	H	N
2 C ₆ H ₈ O ₆	Solid/ alb/ 149 °C	A/66	691, 771, 879, 893, 1021, 1184, 1213, 1243, 1300, 1396, 1442, 1460, 1516, 1671, 2822, 2887, 2963, 3168, 3376.	40.92/ 40.79	4.58/ 4.98	-
5 C ₁₁ H ₁₁ NO ₅	Solid/ galben/ 202-203 °C	C/80	778, 794, 868, 902, 958, 1003, 1029, 1078, 1143, 1162, 1193, 1223, 1240, 1317, 1330, 1437, 1475, 1497, 1558, 1595, 1665, 1729, 3301, 3337.	55.70/ 55.56	4.67/ 4.88	5.90/ 6.04
6 C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₄	ulei/ galben	A/77	724, 770, 848, 867, 938, 989, 1022, 1051, 1100, 1151, 1162, 1242, 1299, 1329, 1382, 1434, 1485, 1522, 1547, 1572, 1589, 1629, 1668, 2011, 2712, 3081, 3147, 3310.	56.00/ 56.20	4.03/ 4.16	18.66 / 16.78
7 C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₆	Solid/ incolor/ 158-160 °C	A/70	660, 745, 761, 825, 1013, 1035, 1055, 1106, 1205, 1240, 1299, 1315, 1391, 1445, 1476, 1534, 1651, 2824, 2881, 2941, 2985, 3287.	41.03/ 41.22	6.03/ 5.95	11.96 / 13.79
8 C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₆	Solid/ incolor / 142-143 °C	A/60	745, 761, 822, 862, 913, 943, 1029, 1046, 1072, 1113, 1201, 1241, 1252, 1300, 1312, 1324, 1361, 1441, 1476, 1532, 1650, 1740, 2859, 2893, 2933, 2952, 2981, 3067, 3300, 3336, 3400.	45.80/ 45.99	6.92/ 6.73	10.68 / 10.49
9 C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₆	ulei/galben	A/75	739, 761, 769, 791, 846, 860, 901, 934, 977, 1011, 1080, 1121, 1183, 1206, 1228, 1228, 1259, 1294, 1319, 1374, 1403, 1454, 1487, 1511, 1546, 1560, 1588, 1637, 1678, 1742, 2115, 2316, 2428, 2559, 2647, 2738, 2839, 2909, 2974, 3375.	49.65/ 49.85	7.64/ 7.77	9.65/ 9.61
10 C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₁₀	Solid/ incolor/ 142-143 °C	B/69	683, 773, 825, 870, 909, 984, 1023, 1042, 1119, 1179, 1227, 1262, 1279, 1368, 1383, 1425, 1461, 1515, 1663, 1735, 2887, 2944, 3252, 3336.	40.68/ 40.49	6.26/ 6.41	7.91/ 8.02
11 C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₄	Solid/ incolor/ 120-122 °C	A/70	777, 873, 906, 1023, 1049, 1110, 1169, 1231, 1268, 1369, 1381, 1419, 1515, 1669, 1723, 2899, 2935, 3248, 3330.	55.80/ 55.96	8.58/ 8.77	10.84 / 11.03
12 C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₄	Solid/ maro/ 250 °C dec.	C/49	672, 754, 831, 952, 1048, 1135, 1310, 1463, 1490, 1525, 1610, 1677, 2299, 2577, 2791, 3341, 3737.	54.55/ 54.38	3.66/ 3.78	12.72 / 12.71
13 C ₁₆ H ₁₂ N ₄ O ₂	Solid/ maro/ 250 °C dec.	C/30	726, 754, 838, 893, 953, 1049, 1079, 1132, 1149, 1238, 1260, 1368, 1396, 1449, 1480, 1527, 1570, 1618, 1643, 1686, 1777, 2803, 2989, 3031, 3118, 3306.	65.75/ 65.91	4.14/ 4.13	19.17 / 18.88

^aMetoda: **A** – Reacția la temperatura camerei; **B** – Reacția la 50-55 °C; **C** - Reacția la 75-80 °C; **D** – Reacția la 125-135 °C.

Astfel de sisteme heterociclice pot fi modificate nu numai prin schimbarea naturii și numărului de atomi de legătură, ci și prin schimbarea naturii substituenților în nucleele benzimidazolice. Cercetarea literaturii de specialitate a relevat faptul că, deși s-a raportat sinteza unui număr anumit de bis-benzimidazoli, nici unul dintre aceștia nu a fost sintetizat din acidul **1**.

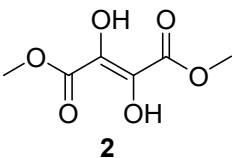
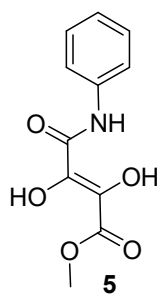
Prezenta lucrare descrie metodele elaborate pentru sinteza noilor mono- și bis-benzimidazoli, în care amândouă nucleee benzimidazolice sunt conectate prin pozițiile 2-, sau prin eten-1,2-dioli.

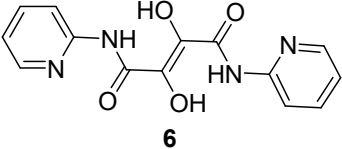
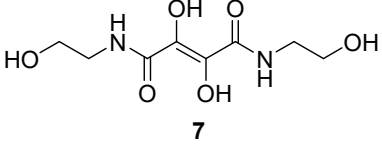
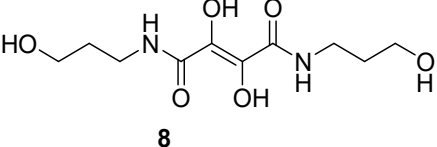
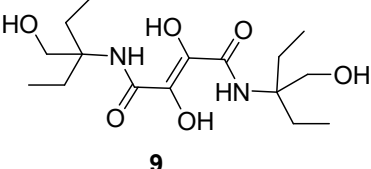
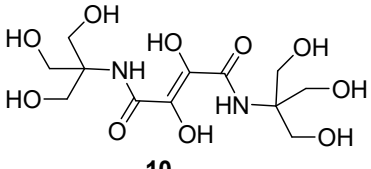
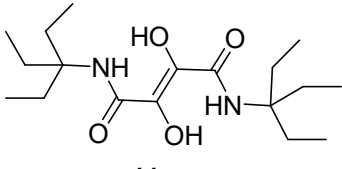
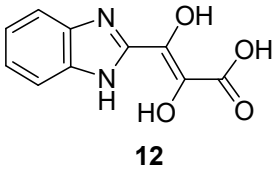
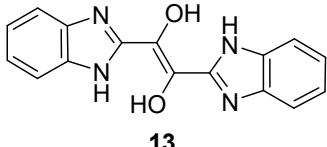
Derivatul monobenzimidazolic **12** a fost sintetizat prin condensarea catalizată de acid clorhidric (Figura 3.8) a *o*-fenilenediaminei cu acidul **1** în baia de ulei la 135 °C în atmosferă de N₂. Aceeași procedură poate fi utilizată pentru prepararea derivatului bis-benzimidazolic prin refluxarea a doi moli de diamină cu un mol de acid **1** în acid clorhidric de 4 *N*.

Rezultatele analizei compușilor sintetizați (starea de agregare, culoarea, temperatura de topire, frecvențele caracteristice în spectrul IR, și analiza elementală) sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Datorită faptului că acidul dihidroxifumaric inițial posedă maximul de absorbție la 295 nm ($\epsilon = 7100$ în metanol de 70%), caracteristic grupării enediolice, au fost înregistrate spectrele compușilor sintetizați în metanol de 70%, pentru determinarea ulterioară a corelației dintre absorbția UV, structura moleculei și activitatea antioxidantă (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Structurile, coeficienții de absorbție ϵ și valoarea maximului de absorbție λ_{max} (nm) a compușilor sintetizați, în soluție de metanol (70%)

No.	Compusul	Denumirea	λ_{max} , nm	ϵ
1	 <p style="text-align: center;">2</p>	dimetil 2,3-dihidroxi-fumarat	300	3500
2	 <p style="text-align: center;">5</p>	(<i>E</i>)-metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoat	285	10365

No.	Compusul	Denumirea	λ_{\max} , nm	ϵ
3		2,3-dihidroxi-N ¹ ,N ⁴ -di(piridin-2-il)fumaramida	299	9825
4		2,3-dihidroxi-N ¹ ,N ⁴ -bis(2-hidroxietyl)fumaramida	215	18900
5		2,3-dihidroxi-N ¹ ,N ⁴ -bis(2-hidroxiopropil)fumaramida	214	9965
6		2,3-dihidroxi-N ¹ ,N ⁴ -bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramida	211	6245
7		N ¹ ,N ⁴ -bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxi-fumaramida	210	7305
8		N ¹ ,N ⁴ -di-tert-butyl-2,3-dihidroxi-fumaramida	296	315
9		acidul (<i>E</i>)-3-(1H-benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic	267	7960
10		(<i>E</i>)-1,2-di(1H-benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etene-1,2-diol	261	17880

Substituirea grupării carboxilice cu cea esterică deplasează absorbția spre lungimi de undă mai scurte. Deplasarea batocromică este înregistrată pentru toate amidele și benzimidazoli. Valoarea λ_{\max} pentru terț-butilamidele **11** este cea mai apropiată de valoarea pentru acidul

dihidroxifumaric **1**, în timp ce diferențele structurale ale acestor substanțe produc o schimbare de circa 20 de ori în valoarea pentru ϵ_{\max} : de la 7100 la 315. Substituenții saturați, care includ heteroatomi, precum oxigenul și azotul, conțin electroni de non-legătură, în afară de σ -electroni. Amidele **7-10** cu o grupare hidroxilică liberă, absorb la lungimi de undă mai mici decât esterul inițial **2**. Mărirea lungimii catenei carbonice, sau substituirea a doi atomi de hidrogen pe gruparea metilică sau carbinolică în compusul **7** duce la valori mai mici ale lungimilor de undă, conform șirului **7** → **8** → **9** → **10**. Valorile medii ale λ_{\max} ale acestor trei tipuri de compuși prezentați în tabelul 3 se micșorează în același șir.

Conform așteptărilor, absorbțiile compușilor aromatici și heterociclici din seria cercetată sunt diferite de cele ale derivaților saturați de structură liniară. Valorile λ_{\max} ale compușilor **5**, **6**, **12** și **13** sunt mai înalte decât cele ale substanțelor discutate anterior, cu excepția compusului **11**.

3.2. Determinarea activității antioxidante prin utilizarea radicalului DPPH[•]

Următoarea etapă de cercetare a constat în determinarea activității antioxidante a compușilor sintetizați în etapa precedentă, precum și a acizilor ascorbic și dihidroxifumaric, utilizând două metode foarte răspândite în cercetările de acest fel: metoda cu radical cationul ABTS^{•+} și radicalul DPPH[•], rezultatele fiind prezentate în continuare.

Curbele cinetice pentru toți compușii studiați au fost construite prin urmărirea cantității remanente a DPPH[•] (în %) în funcție de timpul de reacție [99,100]. Concentrația inițială a DPPH[•] a fost calculată conform ecuației 3.1, determinată din curba de calibrare a DPPH[•] în soluția de metanol (70%), iar concentrația inițială a DFH₄ a fost calculată conform ecuației 3.2, determinată din curba de calibrare a DFH₄ în soluția de metanol (70%), conform Figurii 3.9:

$$[\text{DPPH}^{\bullet}]_0 = 9,6 \cdot 10^{-3} \cdot A \quad (3.1)$$

$$[\text{DFH}_4]_0 = 7,1 \cdot 10^{-3} \cdot A \quad (3.2)$$

unde: $[\text{DPPH}^{\bullet}]_0$ – concentrația inițială a DPPH[•]; $[\text{DFH}_4]_0$ – concentrația inițială a DFH₄;

A – densitatea optică a reagentului (DPPH[•] sau DFH₄, respectiv) la t = 0 min.

Curbele cinetice de consum a DPPH[•] la interacțiunea cu substanțele studiate (Figurile 3.10-3.13) demonstrează existența a trei tipuri de comportamente cinetice: rapid, mixt (etapa rapidă este urmată de o etapă mai lentă, ce poate fi vizual observată) și comportament cinetic lent. Legitatea cinetică este determinată atât de structura moleculară a compusului studiat, cât și de stabilitatea radicalului de antioxidant format în urma reacției cu DPPH[•].

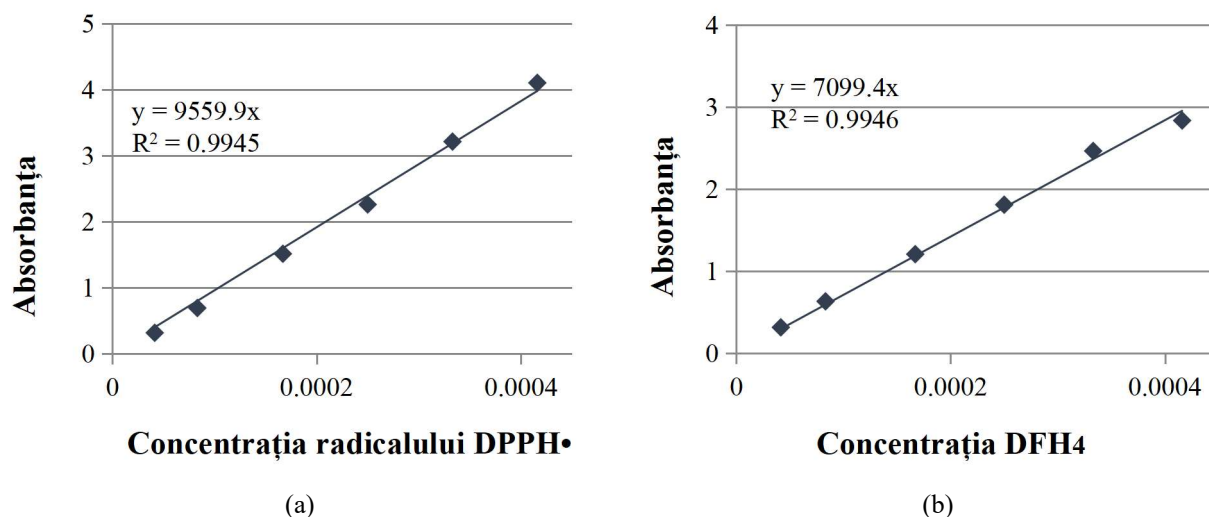


Fig. 3.9. Curbele de calibrare pentru DPPH• (a) și DFH4 (b) în soluție metanolică (70%)

Cinetica reacției rapide dintre antioxidant (AH) și radical este determinată de prezența grupelor funcționale active, care permit transferul rapid al atomilor de hidrogen. Activitatea antiradicalică a acestor compuși este destul de înaltă, realizându-se o reacție ireversibilă cu DPPH•, astfel se urmărește o scădere bruscă a concentrației de DPPH• și reacția se finalizează în decurs de câteva secunde, în dependență de concentrația inițială a AH. Din șirul compușilor studiați, doar acidul ascorbic (AAs) face parte din acest grup (Figura 3.10).

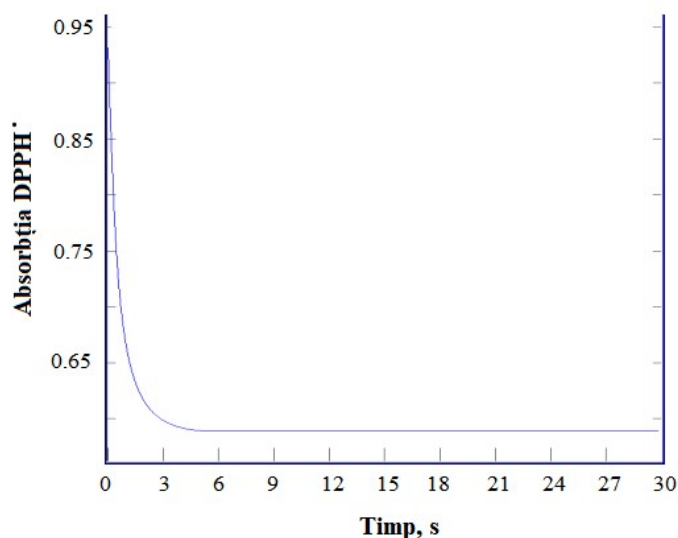


Fig. 3.10. Curba cinetică de consum a DPPH• la interacțiunea cu acidul ascorbic, $[AAs]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[DPPH•]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t = 30 \text{ s}$

O parte din compușii studiați au demonstrat o legitate cinetică mixtă, compusă dintr-o etapă rapidă, similară comportamentului acidului ascorbic, în care concentrația radicalului scade semnificativ, urmată de o etapă mai lentă. Astfel de compuși participă la un transfer rapid de atomi de hidrogen, iar intermediarul format participă într-un transfer lent de hidrogen. Analizând

curbele cinetice obținute, constatăm că DFH₄ **1**, esterul EMD **2**, acidul MBD **12** și diolul BBD **13** prezintă o legitate cinetică mixtă (Figurile 3.11, 3.12). La interacțiunea acestora cu DPPH[•], în prima etapă se observă o diminuare rapidă a concentrației radicalului (câteva secunde pentru DFH₄ **1**, acidul MBD **12** și câteva zeci de secunde pentru esterul EMD **2**, și diolul BBD **13**), însă starea de echilibru se atinge într-un timp mai îndelungat, în comparație cu AAs (Tabelul 3.3).

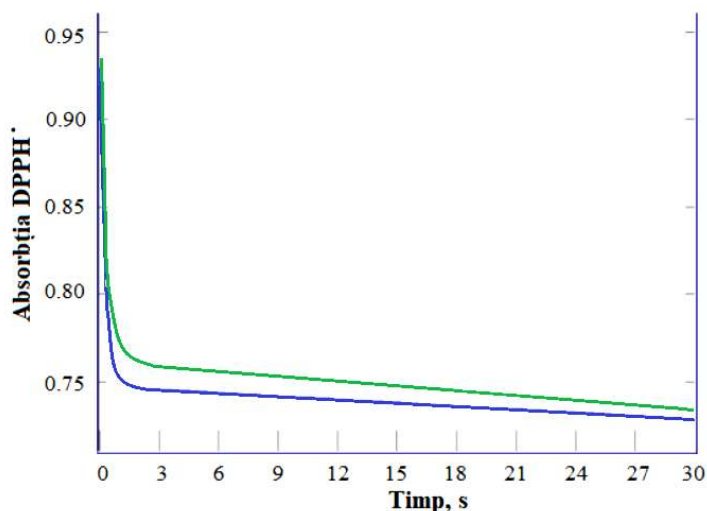


Fig. 3.11. Curbele cinetice de consum a DPPH[•] la interacțiunea cu DFH₄ **1 (albastru) și acidul MBD **12** (verde) în condițiile: [DFH₄]₀ = [MBD]₀ = 2·10⁻⁵ M; [DPPH[•]]₀ = 1·10⁻⁴ M, t = 30 s**

Forma curbelor cinetice este determinată de structura moleculară a compusului studiat, de reactivitatea globală și locală, care implică stabilitatea radicalului de antioxidant.

Diferența în activitatea antioxidantă a dimetil 2,3-dihidroxifumaratului **2** ar putea fi explicată prin delocalizarea diferită a electronilor comparativ cu DFH₄, respectiv, și un transfer de atomi de hidrogen mai lent. În același timp, trebuie luată în considerație și stabilitatea radicalilor formați de antioxidanți. Studii anterioare [101] au arătat prin intermediul metodei RES că concentrația radicalului ascorbic crește odată cu creșterea concentrației ascorbatului (forma disociată a acidului ascorbic).

În același mod, forma disociată a acidului dihidroxifumaric duce la stabilizarea radicalului, datorită perechii de electroni liberi în atomul de oxigen carboxilic. Și odată ce radicalul format este mai stabil, compusul cercetat are o activitate antioxidantă mai mare. Însă esterul dimetilic al DFH₄ nu disociază, deoarece oxigenul din legătura esterică –O–CH₃ nu are perechea de electroni liberă, astfel, stabilitatea radicalului esterului dimetilic va fi mai mică decât a radicalului format din DFH₄.

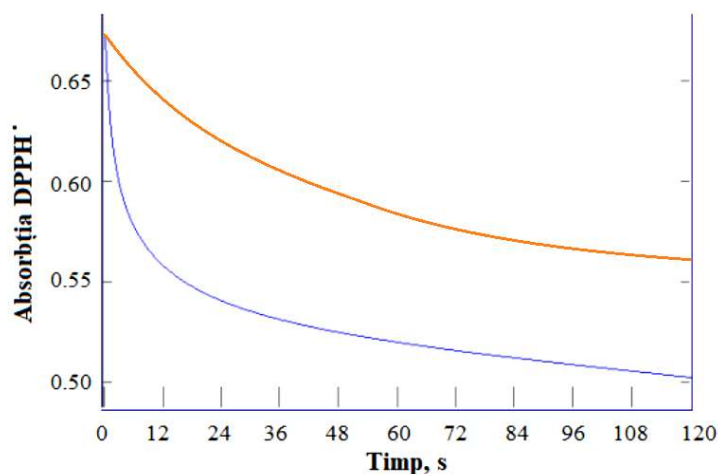


Fig. 3.12. Curbele cinetice de consum a DPPH' la interacțiunea cu diolul BBD 13 (albastru) și esterul 2 (oranj) în condițiile: $[BBD]_0 = [EMD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[DPPH']_0 = 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $t = 120 \text{ s}$

În grupa compușilor cu o legitate cinetică lentă intră acei compuși, care au proprietatea de a participa doar la un transfer lent de hidrogen, și starea de echilibru se atinge într-un timp mai îndelungat, în comparație cu DFH₄, în dependență de concentrația inițială a compusului. În această grupă intră anilida 5 și fumaramida 6 (Figura 3.13).

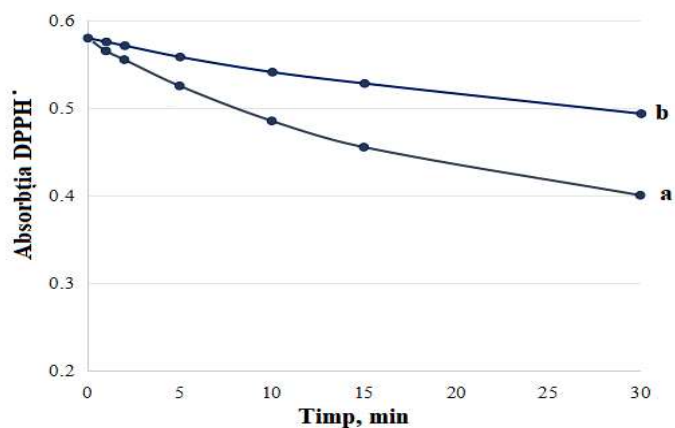


Fig. 3.13. Curbele cinetice de consum a DPPH' la interacțiunea cu: (a) anilida 5, $[anilida]_0 = 2,26 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[DPPH']_0 = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $t = 30 \text{ min}$ și (b) fumaramida 6, $[fumaramida]_0 = 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[DPPH']_0 = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $t = 30 \text{ min}$

O serie de compuși sintetizați au demonstrat activitate foarte redusă în testul DPPH', scindând mai puțin de 10% de radical la o concentrație inițială a reagentului de până la 5 ori mai mare decât a radicalului DPPH', în decurs de o oră. Aceasta se datorează alterării structurii electronice inițiale a fragmentului enediolic, respectiv a indicilor de reactivitate globală și locală,

datorită atașării anumitor fragmente structurale. Derivații cu activitate antioxidantă nesemnificativă sunt fumaramidele 7, 8, 9, 10, 11.

Activitatea antioxidantă, stoichiometria și molaritatea reacțiilor

Trebuie subliniat faptul că forma curbei cinetice nu indică direct asupra activității antioxidante a compusului. Activitatea antioxidantă/antiradicalică este definită ca fiind cantitatea de antioxidant necesară pentru diminuarea concentrației inițiale de DPPH• cu 50%, numită concentrația eficientă la 50% (EC_{50}). Pentru simplitate, deseori se utilizează valoarea $1/EC_{50}$, numită putere antiradicalică (PAR). Astfel, cu cât PAR este mai mare, cu atât antioxidantul este mai eficient.

Pentru a determina activitatea antiradicalică a compușilor studiați, au fost testate o serie de rapoarte molare, exprimate ca moli de antioxidant per mol de DPPH•, în diapazonul de la 0,1 până la 1. Pentru fiecare raport molar, concentrația remanentă de DPPH• la echilibru a fost determinată și reprezentată grafic, permițând determinarea ulterioară din grafic a raportului molar care reduce jumătate din concentrația inițială de DPPH• (EC_{50}).

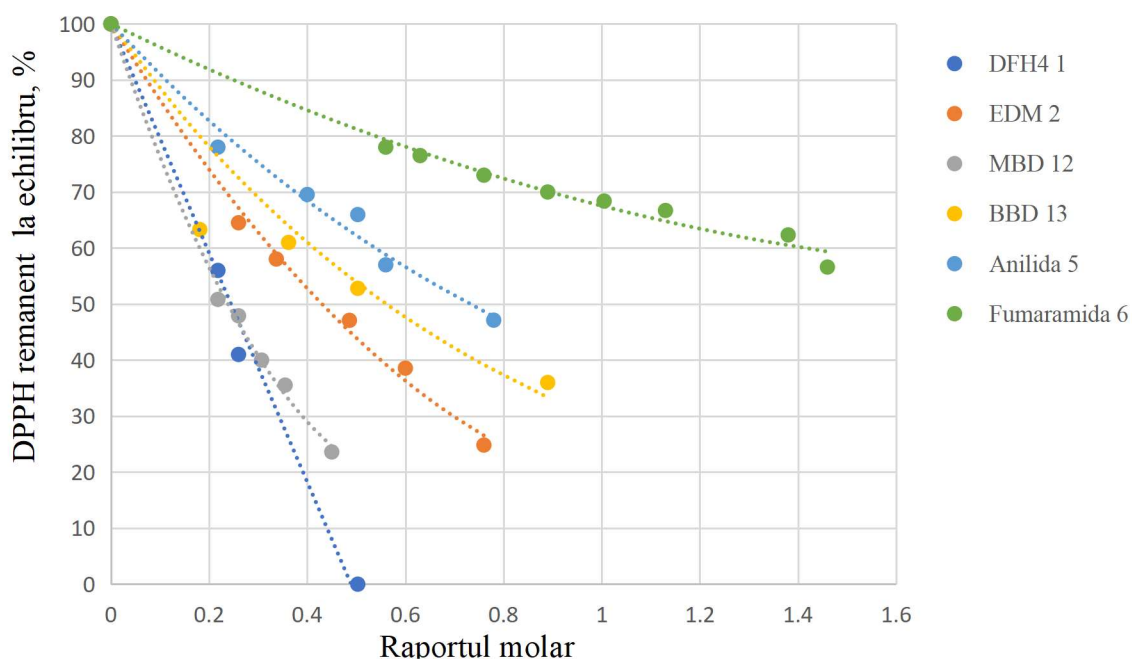


Fig. 3.14. Determinarea constantelor stoichiometrice pentru reacția dintre DPPH• și derivații cercetați

În Figura 3.14 este prezentată modalitatea de determinare a EC_{50} pentru DFH₄ și derivații care au manifestat activitate antiradicalică.

Constanta stoichiometrică a fost definită ca numărul de molecule de DPPH• reduse de către o moleculă de antioxidant în decurs de o reacție completă, și notată cu $\sigma = 1/(2 \times EC_{50})$, conform reacției:



În Tabelul 3.3 se prezintă PAR, EC₅₀, relația stoechiometrică a antioxidanților supuși testării, și timpul de reacție necesar stabilirii echilibrului. Acizii ascorbic și dihidroxifumaric precum și acidul MBD **12** posedă cea mai mare constantă stoichiometrică, fiecare mol de acești compuși scindează câte 2 moli de radical DPPH[•]. Reacția dintre radical și AAs decurge timp de câteva secunde, în cazul reacției cu DFH₄ - până la 2 minute, iar în cazul MBD **12**, reacția atinge echilibrul timp de până la 10 minute [102].

Tabelul 3.3. Clasificarea compușilor testați în dependență de legitatea cinetică în reacția cu DPPH[•], cu valorile respective ale PAR, EC₅₀ și constantei stoichiometrice

	Compusul	EC ₅₀	PAR	σ, numărul de moli de DPPH [•] scindați de 1 mol de AH	Timpul de reacție până la echilibru
<i>Legitate cinetică rapidă</i>	AAs	0,25	4	2	< 10-15 sec
<i>Legitate cinetică mixtă (rapidă+lentă)</i>	DFH ₄ 1	0,25	4	2	< 2 min
	Acidul MBD 12	0,25	4	2	< 10 min
	Diolul BBD 13	0,5	2	1	< 10 min
	EMD 2	0,5	2	1	≈ 20-30 min
<i>Legitate cinetică lentă</i>	Anilida 5	0,7	1.4	0,7	≈ 45-60 min
	Fumaramida 6	2	0.5	0,25	≈ 45-60 min
	MEAD 7	25	0.04	0,02	-
<i>Activitate antioxidantă neglijabilă</i>	MPAD 8	10	0.1	0,05	-
	Fumaramida 9	16,6	0.06	0,03	-
	Fumaramida 10	8,3	0.12	0,06	-
	Fumaramida 11	55,5	0.018	0,009	-

Referitor la ecuația (3.3) a prezentat interes determinarea particularităților structurale ale hidrazinei DPPH-H, iar recristalizarea acesteia din etanol cu analiza ulterioară a monocristalelor prin metoda difracției cu raze X a permis elucidarea, pentru prima dată, a structurii complexului DPPH-H pur. Rezultatele respective sunt în afara scopului acestui capitol, doritorii sunt încurajați să acceseze [103] pentru mai multe detalii.

3.3. Studiul legităților cinetice ce descriu reacțiile dintre acidul dihidroxifumaric și derivații acestuia cu radicalul DPPH[•]

Legitățile cinetice care descriu reacțiile dintre compușii cercetați și radicalul DPPH[•] au fost studiate utilizând metoda spectrofotometrică clasică și metoda stop-flow, în dependență de timpul de reacție, în fiecare caz în parte.

Stoichiometria reacțiilor

Valorile constantelor stoichiometrice pentru fiecare antioxidant au fost determinate anterior, și sunt prezentate în Tabelul 3.3. Pentru DFH₄ a fost posibilă determinarea constantelor stoichiometrice pentru cele două etape mecanistice.

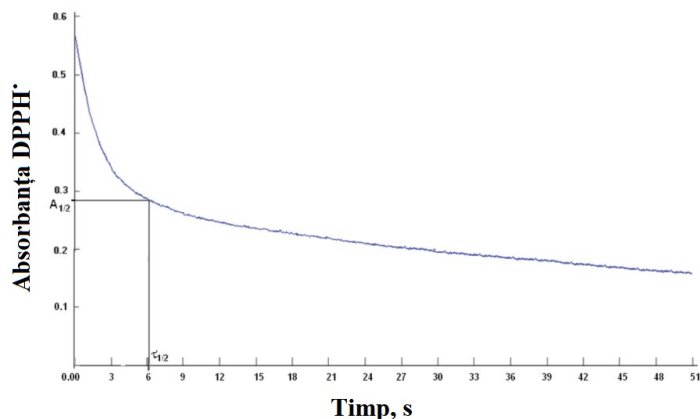


Fig. 3.15. Micșorarea concentrației de DPPH• la reducerea acestuia cu DFH₄, atunci când inițial $[DFH_4]_0 = ([DPPH•]_0/\sigma)$, unde $\sigma = 2$

Figura 3.15 prezintă curba de micșorare a concentrației DPPH• la reducerea acestuia cu DFH₄, atunci când inițial se iau concentrațiile $[DFH_4]_0 = [DPPH•]_0/\sigma$. Datele obținute au permis determinarea constantelor stoichiometrice pentru etapa rapidă și cea lentă, obținându-se valorile $\sigma_{\text{rapid}} \sim 1$ și $\sigma_{\text{lent}} \sim 1$. Acest fapt sugerează că în etapa rapidă tot acidul dihidroxifumaric reacționează în raport de 1:1 cu DPPH•, după care radicalul format de DFH₄ se transformă într-un intermediar activ care interacționează cu radicalul rămas de DPPH• în raport de 1:1, însă mult mai lent. Trebuie menționat faptul că deși pentru DFH₄ **1**, constanta stoichiometrică σ corespunde cu numărul grupărilor OH, cercetările RMN nu au confirmat mecanismul propus anterior [104], dat de schema de mai jos (Figura 3.16), deoarece în urma reacției rapide molecula este scindată într-un șir de substanțe ce urmează a fi determinate în studiile viitoare.

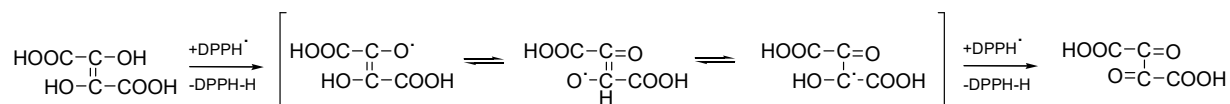


Fig. 3.16. Mecanismul presupus al reacției dintre DFH₄ și DPPH care nu a fost confirmat prin cercetări RMN

În cazul esterului **2**, a acidului MBD **12** și a diolului BBD **13**, reacția cărora cu DPPH• de asemenea prezintă două etape ce pot fi vizual deosebite pe grafic, valoarea constantei

stoichiometrice σ pentru etapa rapidă este mai mică decât 1, ceea ce sugerează o mai mare complexitate a mecanismelor de reacție.

Determinarea ordinelor de reacție față de reactanți și a constantelor de viteză

În reacția antioxidantilor cu radicalul DPPH \cdot , viteza (v) reacției complete dintre σ moli de DPPH \cdot și un mol de antioxidant (AH), în funcție de timp, poate fi definită conform ecuației:

$$v = \frac{-dC_{DPPH}}{\sigma \times dt} = k \times [DPPH\cdot]_0^x \times [AH]_0^y \quad (3.4)$$

unde k este constanta de viteză a reacției; $[DPPH\cdot]_0$ și $[AH]_0$ sunt concentrațiile inițiale a radicalului și, respectiv, a antioxidantului; σ este constanta stoichiometrică totală a reacției; x și y sunt ordinele de reacție față de DPPH \cdot și AH, respectiv.

În cazul antioxidantilor ce prezintă un mecanism secvențial, etapele pot fi delimitate:

$$v = \frac{-dC_{DPPH}}{\sigma \times dt} = k_1 \times [DPPH\cdot]_0^{x_1} \times [AH]_0^{y_1} + k_2 \times [DPPH\cdot]_0^{x_2} \times [AH]_0^{y_2} \quad (3.5)$$

unde k_1 este constanta de viteză a reacției rapide; k_2 este constanta de viteză a reacției mai lente; $[DPPH\cdot]_0$ și $[AH]_0$ sunt concentrațiile inițiale a radicalului sau antioxidantului, respectiv; σ este constanta stoichiometrică totală a reacției; x_1, y_1 și x_2, y_2 sunt ordinele de reacție față de DPPH \cdot și AH, respectiv pentru etapele rapidă și lentă. Trebuie menționat faptul că stoichiometria, molaritatea și ordinul de reacție coincid în mod necesar numai în reacții elementare, adică, acele reacții care au loc într-o singură etapă, deoarece ecuația reacției pentru reacții elementare coincide cu procesul la nivel molecular. În cazul mecanismelor de reacție mai complexe, indicii menționați pot și de regulă au valori diferite.

Luând în considerație complexitatea mecanismului de reacție în cazul compușilor ce prezintă cinetică mixtă, în cadrul cercetărilor de față, pentru acești compuși a fost investigată doar etapa rapidă a reacției, care corespunde transferului primului atom de hidrogen de la antioxidant către radical.

Pentru determinarea ordinelor parțiale de reacție a fost utilizată metoda vitezelor inițiale. Astfel, pentru determinarea ordinului de reacție pentru DPPH \cdot , a fost calculată viteza inițială pentru câteva concentrații inițiale ale DPPH \cdot , menținând constantă concentrația antioxidantului. Deși aplicarea acestei metode este limitată în cazul reacțiilor rapide, în cadrul studiilor de față a fost posibilă datorită utilizării metodei stop-flow (a se vedea Cap. 2), care a permis înregistrarea absorbției soluției de DPPH \cdot din primele secunde ale reacției.

Ecuația (3.4) în forma logaritmică permite reprezentarea grafică a dependenței $\log(v)$ în funcție de $\log([DPPH\cdot]_0)$, iar ordinul parțial de reacție x poate fi determinat din panta dreptei. În

mod analogic poate fi determinat ordinul parțial de reacție y pentru antioxidant, menținând constantă concentrația inițială de DPPH•, și variind concentrația inițială de antioxidant. Din ecuația dreptei, poate fi calculată valoarea constantei observate de viteză, care este produsul dintre constanta reală și concentrația substanței menținută neschimbată. O altă metodă de determinare a ordinului de reacție față de antioxidant devine posibilă prin utilizarea ecuației (3.4) cu condiția inițială $[AH]_0 = [DPPH•]_0/\sigma$, iar prin conversia logaritmică ulterioară se ajunge la forma:

$$\log(v) = \log\left(\frac{k}{\sigma^y}\right) + (x + y) \times \log([DPPH•]_0) \quad (3.6)$$

Astfel, y poate fi determinat din panta dreptei, deoarece x a fost determinat anterior.

Pentru antioxidanții care prezintă legitate cinetică lentă, a fost studiată în cadrul acestei cercetări doar anilida **5**, deoarece derivații MEAD **7**, MPAD **8**, precum și fumaramidele **9**, **10**, **11** au demonstrat activitate antioxidantă foarte scăzută, practic nesemnificativă.

În scopuri comparative a fost studiată reacția dintre DPPH• și acidul ascorbic, care este pe larg utilizat ca substanță de referință în studii similare.

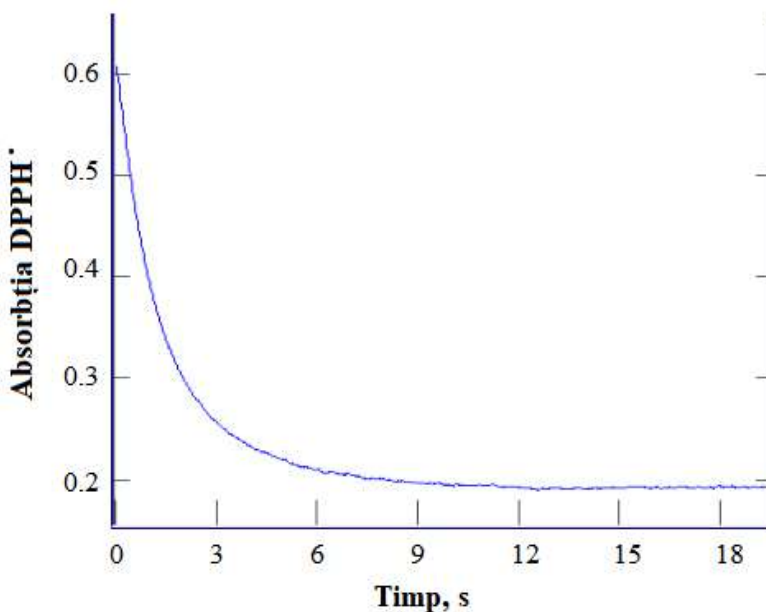


Fig. 3.17. Scăderea absorbției radicalului DPPH• în timp, la interacțiunea cu AAs, în primele 18 secunde de reacție, pentru condiția $[AAs]_0 = [DPPH•]_0/\sigma$, unde $\sigma = 2$

În Figura 3.17 este prezentată scăderea absorbției radicalului DPPH• în timp, în funcție de concentrația inițială a AAs, în primele secunde de reacție, pentru condiția $[DFH_4]_0 =$

$[DPPH^*]_0/\sigma$, unde $\sigma = 2$. Reacția decurge foarte rapid și echilibrul se atinge în primele 10 secunde de reacție.

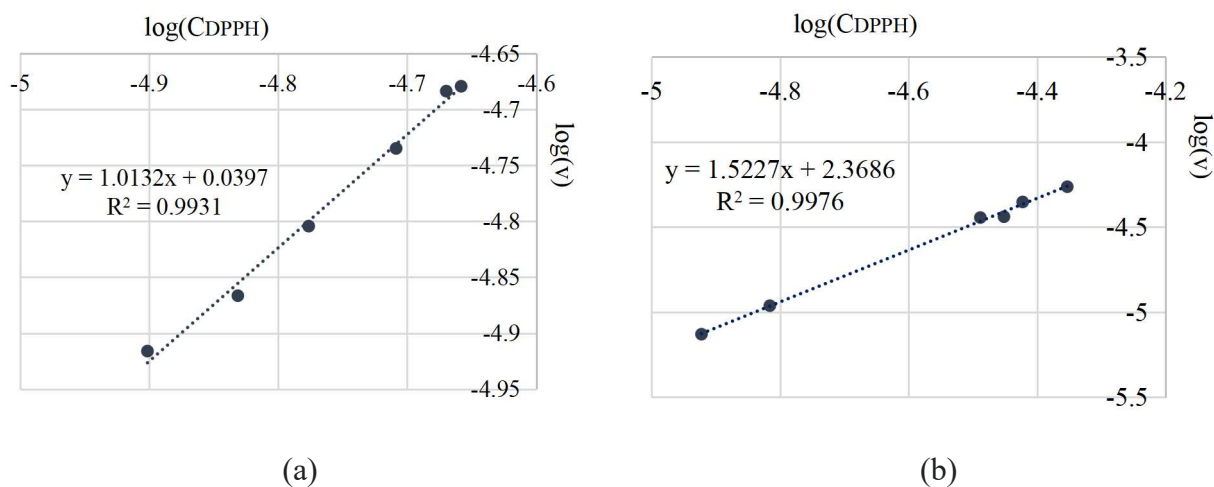


Fig. 3.18. Determinarea ordinului de reacție x față de $DPPH^*$ (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului $DPPH^*$ cu AAs, unde $[AAs]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M (a) și $[AAs]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$ (b), la timpul de reacție $t = 0.2$ s

Ecuțiile dreptelor din Figura 3.18 permit determinarea ordinelor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de $DPPH^*$ este $x = 1$, și ordinul de reacție față de AAs este $y = 0.5$. Luând în considerație $[AAs]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M și $\log(k_{obs}) = -0,0397$, calculăm valoarea constantei de viteză $k = 45,6 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

În concluzie, se poate spune că reacția dintre $DPPH^*$ și acidul ascorbic este o reacție de ordinul 1,5 și este descrisă de relația $v = 45,6 \cdot 10^3 \times [DPPH^*]_0 \times [AAs]_0^{0.5}$ unde $[DPPH^*]_0$ și $[AAs]_0$ sunt concentrațiile inițiale ale reactanților respectivi.

În rezultatul experiențelor ulterioare, s-au efectuat calcule cinetice pentru antioxidanții ce prezintă cinetică mixtă (etapa rapidă + etapa lentă): DFH₄ **1**, esterul **2**, acidul MBD **12** și diolul BBD **13**. Pentru antioxidanții cu legitate cinetică mixtă, a fost utilizată relația (3.4) pentru descrierea etapei rapide, care corespunde cu transferul primului hidrogen de la antioxidant la radical. În Figura 3.19 este prezentată scăderea absorbției radicalului $DPPH^*$ în timp, pentru condiția $[DFH_4]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$, în primele secunde de reacție.

Ecuțiile dreptelor din Figura 3.20 permit determinarea ordinelor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de $DPPH^*$ este $x = 1$, și ordinul de reacție față de DFH₄ **1** este $y = 0,5$. Luând în considerație $[DFH_4]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M și $\log(k_{obs}) = -0,5181$, găsim valoarea constantei de viteză $k = 15.2 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

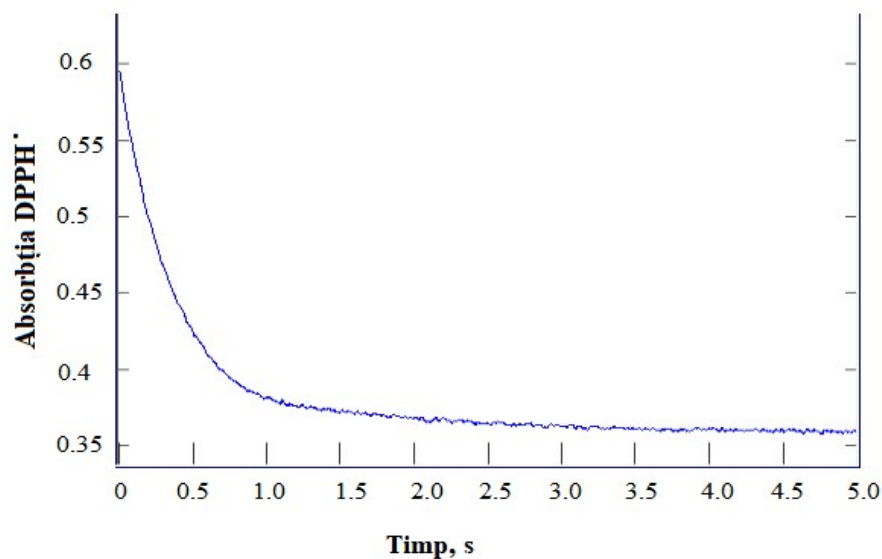


Fig. 3.19. Scăderea absorbății radicalului DPPH• în timp, la interacțiunea cu DFH₄ 1, în primele 5 secunde de reacție, pentru condiția $[DFH_4]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$, unde $\sigma = 2$

În concluzie, se poate spune că reacția dintre DPPH• și acidul 1 este o reacție de ordinul 1,5 descrisă de relația $v = 15,2 \cdot 10^3 \times [DPPH^*]_0 \times [DFH_4]_0^{0.5}$ unde $[DPPH^*]_0$ și $[DFH_4]_0$ sunt concentrațiile inițiale ale reactanților respectivi.

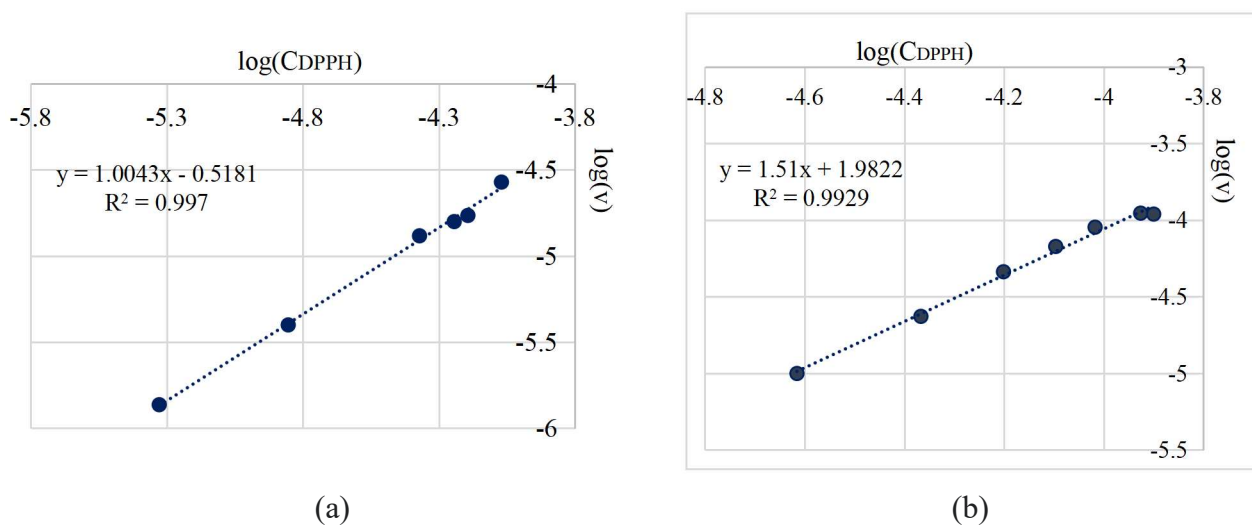


Fig. 3.20. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH• (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului DPPH• cu DFH₄ 1, unde $[DFH_4]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$ M (a) și $[DFH_4]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$ (b), la timpul de reacție $t = 0.3$ s

În Figura 3.21 este prezentată scăderea absorbției radicalului DPPH• în timp, în funcție de concentrația inițială de acid MBD 12, în primele secunde de reacție, pentru condiția $[MBD]_0 = [DPPH^*]_0/\sigma$.

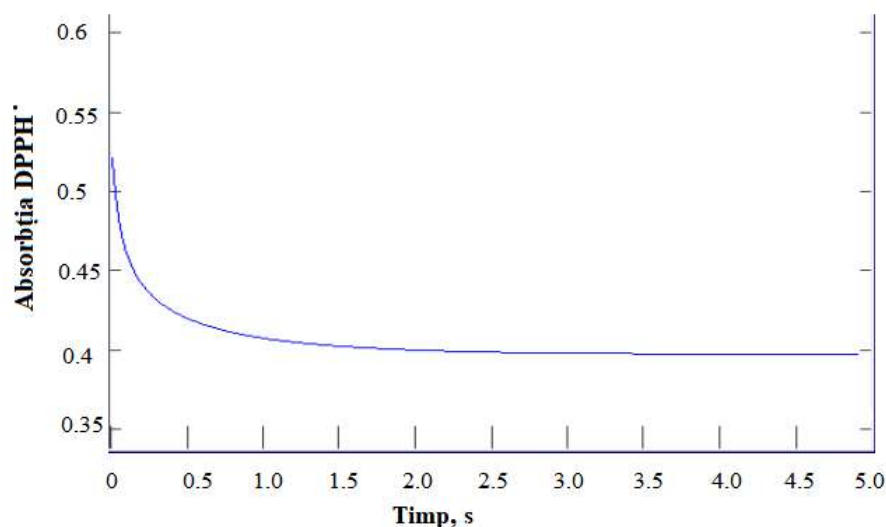


Fig. 3.21. Scăderea absorbății radicalului DPPH• în timp, la interacțiunea cu MBD 12, în primele 5 secunde de reacție, pentru condiția $[MBD]_0 = [DPPH•]_0/\sigma$, unde $\sigma = 2$

Ecuatiile dreptelor din Figura 3.22 permit determinarea ordinelor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de DPPH• este $x = 1$, și ordinul de reacție față de BMD 12 este $y = 1$. Luând în considerație $[MBD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ și $\log(k_{\text{obs}}) = 0,7686$, găsim valoarea constantei de viteză $k = 29,3 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

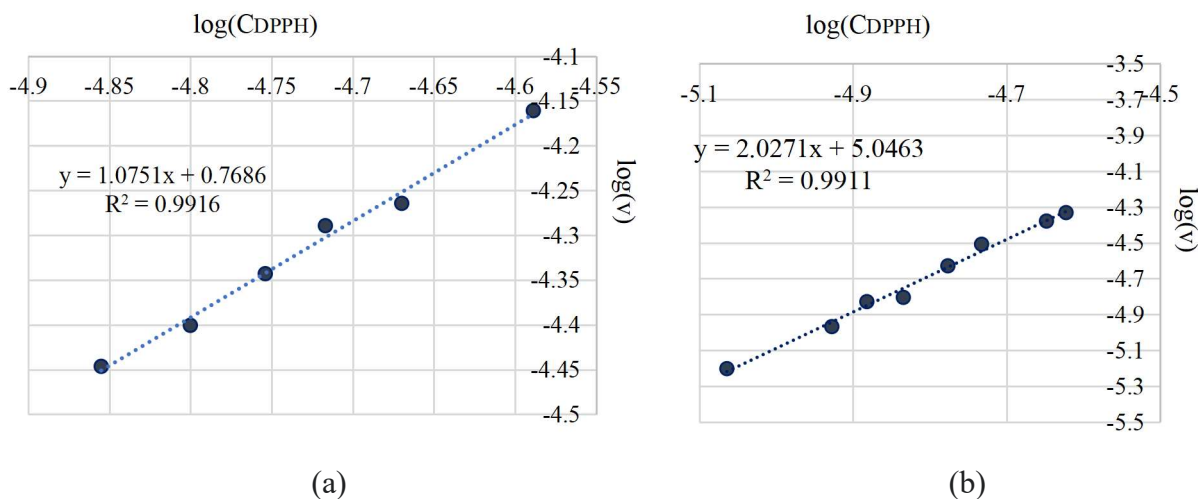


Fig. 3.22. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH• (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului DPPH• cu MBD 12, unde $[MBD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (a) și $[MBD]_0 = [DPPH•]_0/\sigma$, unde $\sigma = 2$ (b), la timpul de reacție $t = 0.2 \text{ s}$

În concluzie, se poate constata că reacția dintre DPPH• și acidul 1 este o reacție de ordinul doi, descrisă de relația $v = 29,3 \cdot 10^3 \times [DPPH•]_0 \times [MBD]_0$ unde $[DPPH•]_0$ și $[MBD]_0$ sunt concentrațiile inițiale ale reactanților respectivi.

În Figura 3.23 este prezentată scăderea absorbției radicalului DPPH' în timp, în funcție de concentrația inițială a diolului BBD 13, în primele secunde de reacție, pentru condiția $[BBD]_0 = [DPPH']_0/\sigma$.

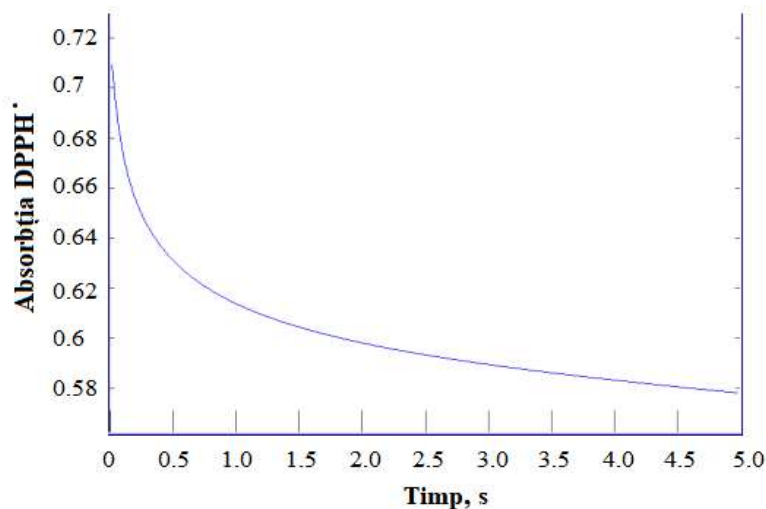


Fig. 3.23. Scăderea absorbției radicalului DPPH' în timp, la interacțiunea cu BBD 13, în primele 5 secunde de reacție, pentru condiția $[BBD]_0 = [DPPH']_0/\sigma$, unde $\sigma = 1$

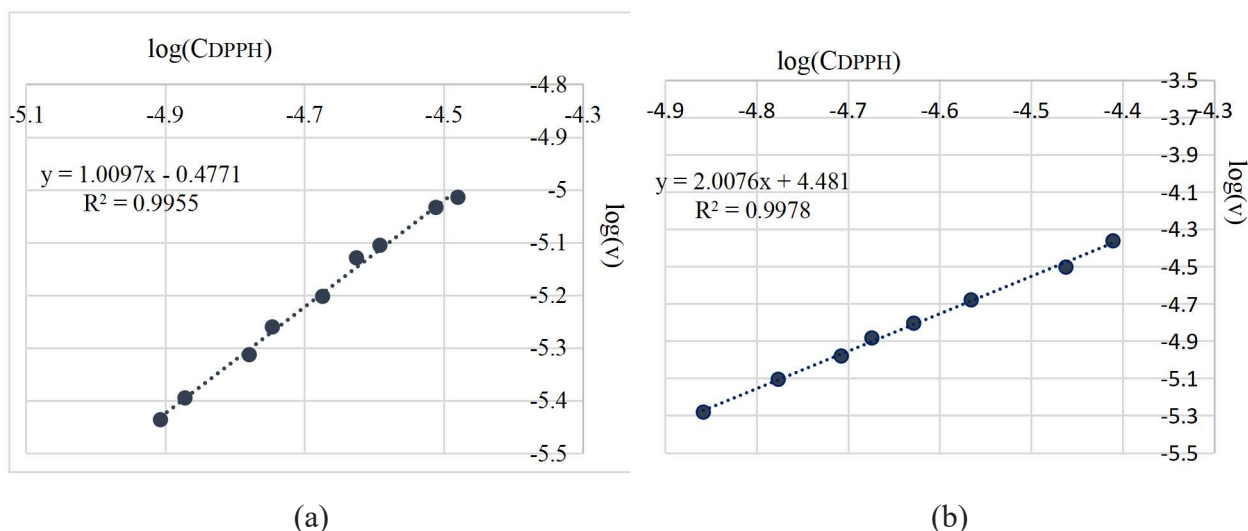


Fig. 3.24. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH' (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului DPPH' cu BBD 13, unde $[BBD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (a) și $[BBD]_0 = [DPPH']_0/\sigma$, unde $\sigma = 1$ (b), la timpul de reacție $t = 0.2 \text{ s}$

Ecuțiile dreptelor din Figura 3.24 permit determinarea ordinelor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de DPPH' este $x = 1$, și ordinul de reacție față de BBD 13 este $y = 1$. Luând în considerație $[BBD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ și $\log(k_{\text{obs}}) = -0,4771$ găsim valoarea constantei de viteză $k = 16,7 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

În Figura 3.25 este prezentată scăderea absorbției radicalului DPPH[•] în timp, la interacțiunea cu esterul **2**, în primele 60 de secunde de reacție, atunci când $[EMD]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0/\sigma$.

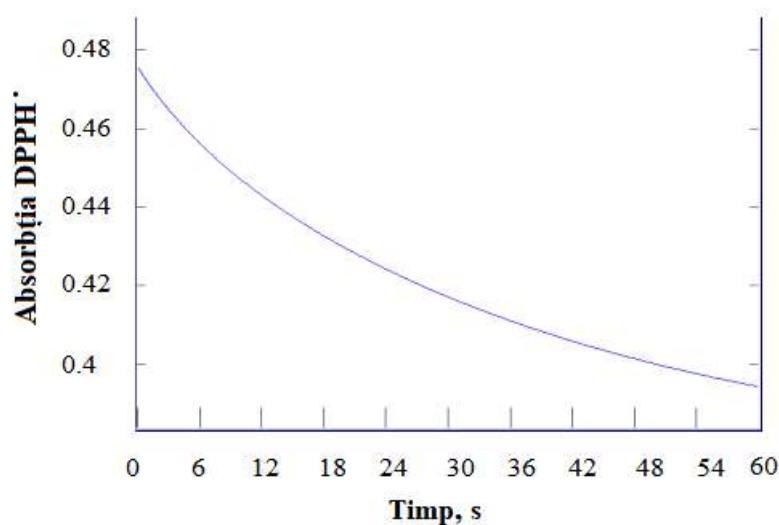


Fig. 3.25. Scăderea absorbției radicalului DPPH[•] în timp, la interacțiunea cu esterul **2**, în primele 60 de secunde de reacție, pentru condiția $[EMD]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0/\sigma$, unde $\sigma = 0.7$

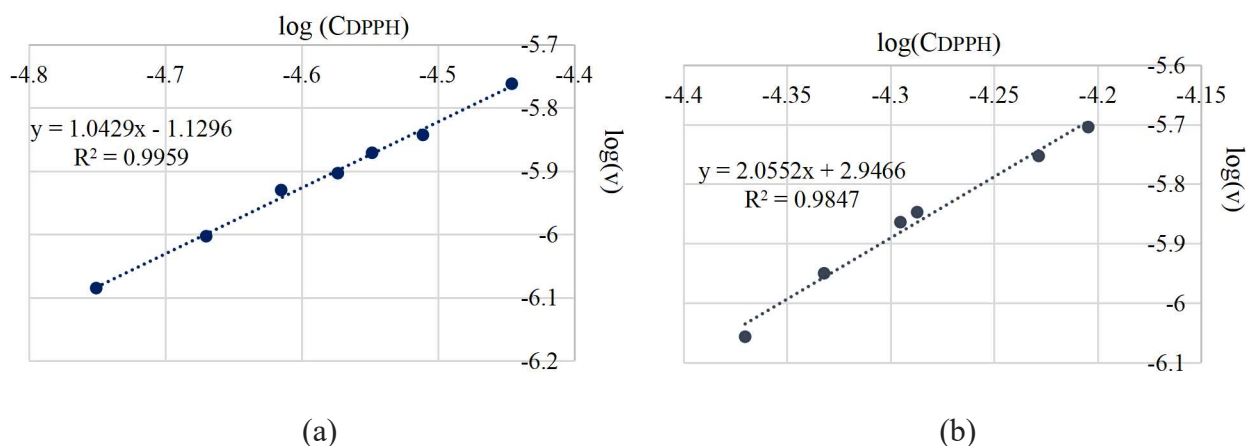


Fig. 3.26. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH[•] (a), și a ordinului total de reacție $x+y$ (b) în reacția radicalului DPPH[•] cu esterul EMD **2**, unde $[EMD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (a) și $[EMD]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0$ (b), timpul de reacție $t = 1 \text{ s}$

Ecuțiile dreptelor din Figura 3.26 permit determinarea ordinelor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de DPPH[•] este $x = 1$, și ordinul de reacție față de dimetil 2,3-dihidroxifumaratul **2** este $y = 1$. Fiind cunoscute valorile $[EMD]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ și $\log(k_{\text{obs}}) = -1.1296$, este posibil calculul constantei de viteză $k = 3.7 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

În concluzie se poate spune că reacția dintre DPPH[•] și esterul **2** este o reacție de ordinul doi, descrisă de relația $v = 3,7 \cdot 10^3 \times [DPPH^{\bullet}]_0 \times [EMD]_0$ unde $[DPPH^{\bullet}]_0$ și $[EMD]_0$ sunt concentrațiile inițiale ale reactanților respectivi.

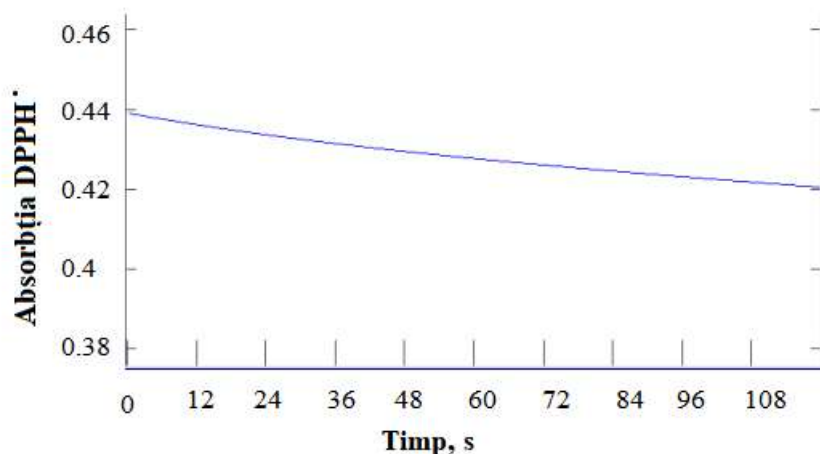


Fig. 3.27. Scăderea absorbției radicalului DPPH[•] în timp, la interacțiunea cu anilida **5**, în primele 120 secunde de reacție, pentru condiția $[anilida]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0/\sigma$

În Figura 3.27 este prezentată scăderea absorbției radicalului DPPH[•] în timp, la interacțiunea cu anilida **5**, în primele 120 secunde de reacție, pentru condiția $[anilida]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0/\sigma$. Anilida **5** face parte din antioxidanții ce au demonstrat o cinetică lentă în reacția cu DPPH[•].

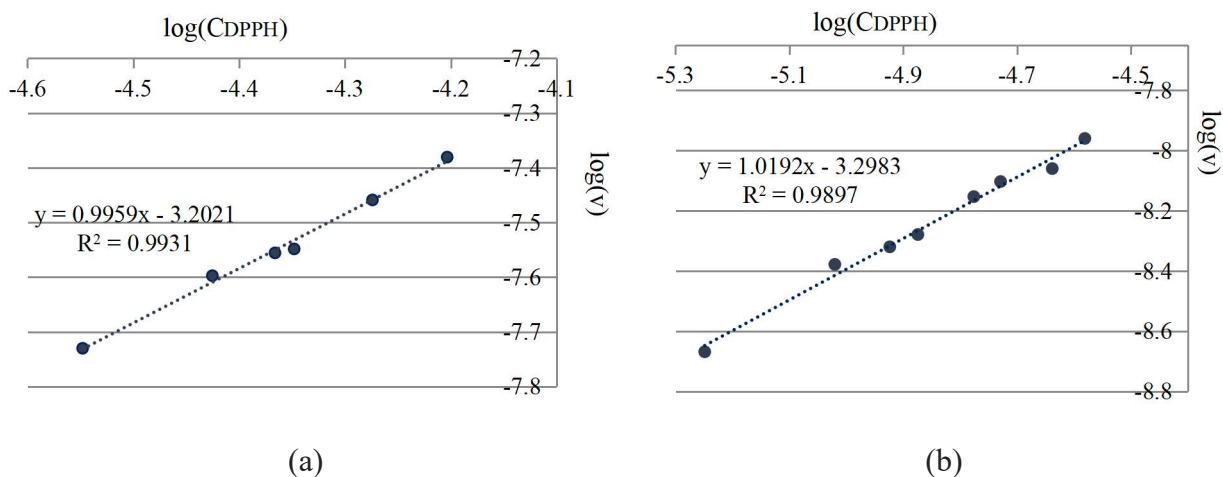


Fig. 3.28. Determinarea ordinului de reacție x față de DPPH[•] (a), și a ordinului de reacție y (b) față de anilida **5**, unde $[anilida]_0 = 2,26 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (a) și $[DPPH^{\bullet}]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (b), timpul de reacție $t = 10 \text{ min}$

Ecuatiile dreptelor din Figura 3.28 permit determinarea ordinelor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de DPPH[•] este

$x = 1$, și ordinul de reacție față de anilida **5** este $y = 1$. Luând în considerație $[anilida]_0 = 2,26 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ și $\log(k_{obs}) = -3,2021$, găsim valoarea constantei de viteză $k = 27,8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pentru experimentele efectuate cu menținerea constantă a concentrației anilidei **5**. Analogic, luând în considerație $[DPPH^*]_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ și $\log(k_{obs}) = -3,3604$, găsim valoarea constantei de viteză $k = 25,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pentru experimentele efectuate cu menținerea constantă a concentrației radicalului. Astfel, valoarea medie a constantei de viteză va fi $26,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

În concluzie se poate spune că reacția dintre DPPH* și anilida **5** este o reacție de ordinul doi, descrisă de relația $v = 26,5 \times [DPPH^*]_0 \times [anilida]_0$ unde $[DPPH^*]_0$ și $[anilida]_0$ sunt concentrațiile inițiale ale reactanților respectivi.

Rezultatele sumarizate ale calculelor cinetice sunt prezentate în Tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. Ordinele de reacție parțiale și constantele de viteză ale compușilor studiați

Legitate cinetică	Compusul	Ordinul de reacție față de antioxidant	Ordinul de reacție față de DPPH*	Constanta de reacție (din viteza inițială)	Constanta stoichiometrică (nr. de moli de DPPH* scindați)
<i>rapidă</i>	AAs	0,5	1	$45,6 \cdot 10^3$	2
	DFH ₄ 1	0,5	1	$15,2 \cdot 10^3$	2
<i>mixtă</i>	MBD 12	1	1	$29,3 \cdot 10^3$	2
<i>(rapidă+lentă)</i>	BBD 13	1	1	$16,7 \cdot 10^3$	1
	EMD 2	1	1	$3,7 \cdot 10^3$	1
<i>lentă</i>	Anilida 5	1	1	26,5	0,7

Conform rezultatelor obținute, doar în cazul a trei compuși, un mol de antioxidant scindează doi moli de radical DPPH* (acidul ascorbic, acidul dihidroxifumaric **1** și acidul MBD **12**). Un mol de ester dimetilic **2** și diol BBD **13** scindează câte un singur mol de radical, iar anilida **5** - 0,7 moli de DPPH*. Reacțiile antioxidantilor cu radicalul DPPH* decurg cu viteze diferite, și după mecanisme diferite, fiind reacții de ordinul 1,5 doar pentru acidul ascorbic și dihidroxifumaric, și de ordinul 2 pentru ceilalți antioxidanți.

3.4. Determinarea activității antioxidante prin utilizarea radical-cationului ABTS^{•+}

Activitatea de captare a radicalilor ABTS^{•+} a compușilor studiați a fost determinată prin procedura descrisă în [86] cu unele modificări. Soluția de ABTS^{•+} a fost preparată prin amestecarea a 8 mM de sare de ABTS cu 3 mM de persulfat de potasiu în 25 ml de apă distilată. Soluția a fost ținută la temperatura camerei în întuneric timp de 16 ore înainte de utilizare. Soluția de ABTS^{•+} a fost diluată cu etanol 95%, pentru a obține o absorbantă între 0.8 și 0.9 la 734 nm. Pentru fiecare analiză a fost preparată o soluție proaspătă de ABTS^{•+}. Soluțiile

antioxidante și cele standard (după caz), în volum de 20 μ l, au fost amestecate cu 1 ml de soluție ABTS^{•+} diluată și incubate la 30 °C. Absorbanța la 734 nm a fost citită la 1 min, 4 min și 6 min. Etanolul (95%) a fost utilizat în calitate de martor.

Graficul de calibrare a fost trasat față de standardul Trolox (concentrațiile au variat între 0-15 mM și au fost diluate în etanol 95%), densitatea optică a fost măsurată la 734 nm exact la 1 min și 6 min după amestecare. Toate determinările au fost efectuate în trei exemplare. Curba dependenței TAA de concentrația soluției de Trolox este prezentată în Figura 3.29.

Pentru activitatea antioxidantă totală, s-a trasat graficul de calibrare pentru Trolox permițând determinarea capacității antioxidante în echivalenți Trolox (TEAC).

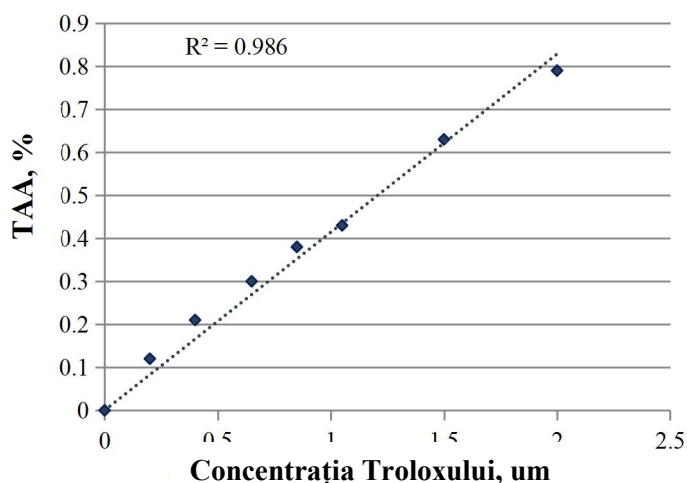


Fig. 3.29. Activitatea antioxidantă totală a soluției de Trolox, în funcție de [Trolox]₀, determinată prin metoda ABTS^{•+}

Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) pentru determinarea activității antioxidante reflectă capacitatea antioxidantilor de a dona atomi de hidrogen pentru captarea cationului radical ABTS^{•+}, cu maximele de absorbție la 645, 734 și 815 nm, comparativ cu Troloxul, un analog hidrosolubil al vitaminei E. Valoarea TEAC este definită ca fiind concentrația soluției de Trolox (mmol/L sau mg/L) cu un potențial antioxidant echivalent cu 1 mM de compus studiat.

În testul ABTS^{•+} au fost folosiți următorii reducători: DFH₄ **1** și derivații acestuia, obținuți anterior: esterul **2**, anilida **5**, fumaramida **6**, MEAD **7**, MPAD **8**, compușii **9**, **10**, **11**, acidul MBD **12**, și diolul BBD **13** [104].

În Figura 3.30 este reprezentată scăderea densității optice a soluției de ABTS^{•+} în prezența antioxidantilor de aceeași concentrație (25 μ M) [105,106].

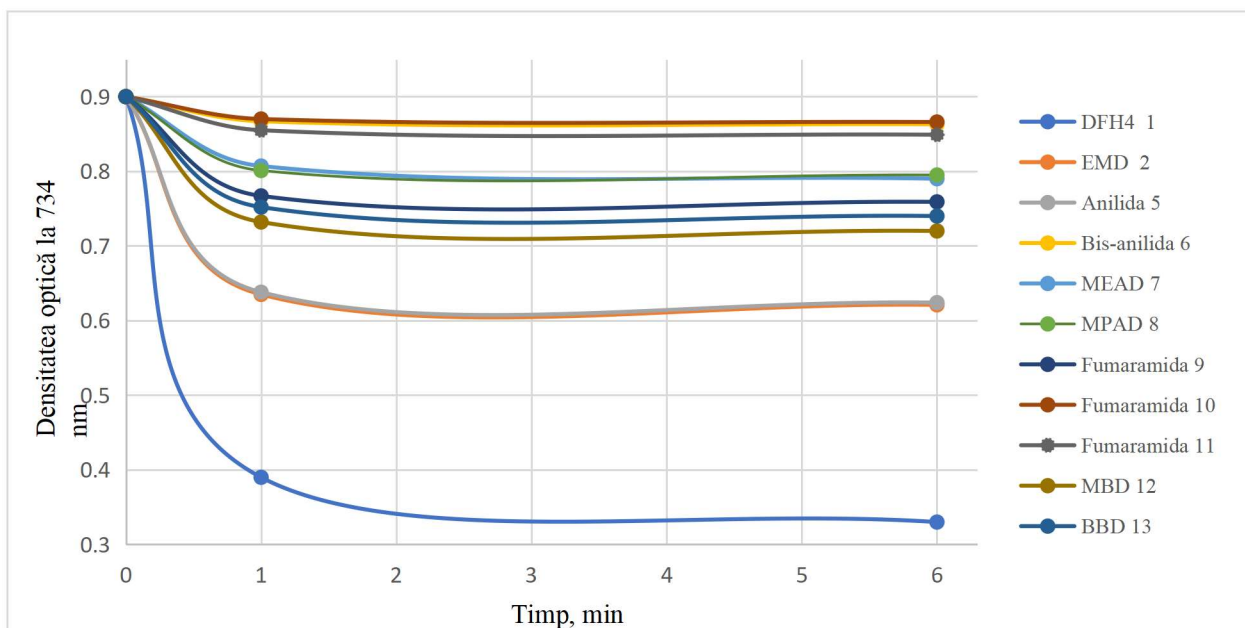


Fig. 3.30. Descreșterea absorbției soluțiilor de ABTS⁺⁺ în funcție de natura reducătorilor, pentru [Red]₀= 25 μM

Din datele obținute (Figura 3.31), putem constata că la concentrația maximă testată, 25 μM, eficiența antioxidantilor scade în șirul: DFH₄ **1** > EMD **2** ≈ anilida **5** > acidul MBD **12** > diolul BBD **13** > fumaramida **9** > MPAD **8** ≈ MEAD **7** > fumaramida **11** ≈ fumaramida **6** ≈ fumaramida **10**.

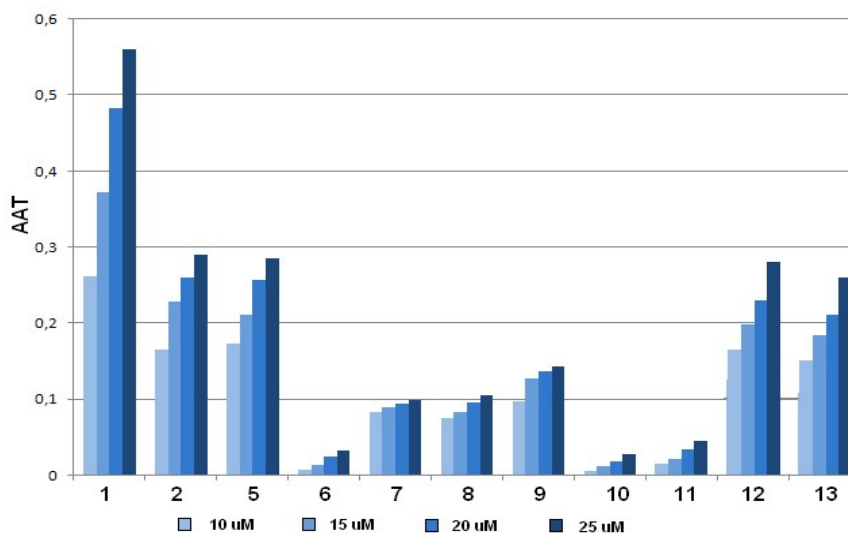


Fig. 3.31. Dependența AAT de natura și concentrația reducătorilor

Pentru reducătorii utilizați, a fost calculată activitatea antioxidantă totală (AAT) și capacitatea antioxidantă în echivalenți trolox (TEAC). Datele sunt prezentate în Tabelul 3.5.

Tabelul 3.5. Activitatea antioxidantă totală și TEAC pentru diferiți reducători

Compusul	C _{red} , μM	AAT	TEAC, μM Trolox
DFH ₄ 1	10	0,261	0,627
	15	0,372	0,894
	20	0,483	1,161
	25	0,561	1,348
EMD 2	10	0,165	0,395
	15	0,228	0,547
	20	0,259	0,622
	25	0,289	0,695
Anilida 5	10	0,172	0,414
	15	0,211	0,507
	20	0,256	0,617
	25	0,285	0,686
fumaramida 6	10	0,0067	0,016
	15	0,013	0,032
	20	0,023	0,056
	25	0,031	0,075
MEAD 7	10	0,082	0,198
	15	0,088	0,211
	20	0,093	0,225
	25	0,098	0,235
MPAD 8	10	0,075	0,179
	15	0,083	0,200
	20	0,0945	0,227
	25	0,105	0,251
Fumaramida 9	10	0,097	0,232
	15	0,127	0,305
	20	0,136	0,326
	25	0,142	0,342
Fumaramida 10	10	0,005	0,013
	15	0,011	0,027
	20	0,017	0,04
	25	0,027	0,067
Fumaramida 11	10	0,015	0,037
	15	0,02	0,048
	20	0,033	0,08
	25	0,044	0,107
Acidul MBD 12	10	0,165	0,396
	15	0,198	0,475
	20	0,23	0,552
	25	0,28	0,672
Diolul BBD 13	10	0,15	0,36
	15	0,183	0,44
	20	0,21	0,504
	25	0,26	0,624

Rezultatele demonstrează că cea mai mare activitate antioxidantă o posedă acidul dihidroxifumaric **1**, fiind urmat de către esterul său dimetilic **2** și anilida **5**, care posedă activitate

antioxidantă echivalentă. Derivații mono- **12** și bis- **13** benzimidazolici ai acidului DFH₄ urmează în acest șir, situându-se înaintea amidelor **7**, **8** și **9**. Cea mai mică activitate antioxidantă în acest test o posedă compușii **6**, **10** și **11**.

În general, rezultatele obținute în testele cu DPPH[•] și ABTS^{•+} au o corelație bună, în sensul că au fost identificați compușii cu cea mai puternică activitate antiradicalică: **1**, **2**, **5**, **12** și **13**. Totuși, există și câteva diferențe, cum ar fi de exemplu, faptul că derivatul **6** are activitate ne semnificativă în testul cu ABTS^{•+} iar derivații **7**, **8** și **9**, posedă dimpotrivă, o activitate semnificativ mai mare decât în testul cu DPPH[•]. Acest lucru demonstrează încă o dată specificitatea metodelor utilizate și necesitatea utilizării metodelor cât mai diverse pentru obținerea rezultatelor exhaustive.

3.5. Concluzii la capitolul 3

1. Au fost elaborate și descrise metodele noi de sinteză a unui șir de derivați noi ai DFH₄. Pentru substanțele obținute s-a investigat corelația dintre structura moleculelor, absorbanta UV și activitatea antioxidantă.
2. S-au studiat curbele cinetice de consum a DPPH[•] la interacțiunea cu substanțele noi obținute și s-a arătat existența a trei tipuri de comportamente cinetice: rapid, mixt și lent.
3. S-au determinat constantele stoichiometrice, timpul de reacție până la echilibru, valorile PAR și EC₅₀ pentru reacțiile dintre DPPH[•] cu DFH₄ și derivații sintetizați.
4. S-au determinat ordinele de reacții, constantele de viteză și s-au întocmit legăturile vitezei de reacție pentru interacțiunea dintre DPPH[•] cu DFH₄ și derivații acestuia.
5. S-au construit curbele cinetice de consum a ABTS^{•+} la interacțiunea cu substanțele noi obținute, și s-a stabilit că activitatea antioxidantă scade în șirul DFH₄ **1** > EMD **2** ≈ anilida **5** > acidul MBD **12** > diolul BBD **13** > fumaramida **9** > MPAD **8** ≈ MEAD **7** > fumaramida **11** ≈ fumaramida **6** ≈ fumaramida **10**.
6. Au fost identificați o serie de compuși sintetizați care au demonstrat activitate foarte redusă în testele cu DPPH[•] și ABTS^{•+}.

4. STUDIUL TEORETIC AL INTERACȚIUNII DFH₄ ȘI A DERIVAȚILOR SĂI CU RADICALUL DPPH*

4.1. Identificarea izomerilor enediolici și cetonici ai DFH₄ *in vacuo* și în apă

În capitolele anterioare a fost descrisă sinteza unui șir de derivați prin modificarea acidului dihidroxifumaric și a esterului său dimetilic, în căutarea de noi sintoni pentru sinteza țintită, cât și pentru a studia relația „structură-proprietate”. Activitatea antioxidantă/antiradicală a compușilor a fost investigată utilizând testele cu radicalul DPPH* și cationul radical ABTS⁺⁺ și s-a constatat că unele substanțe sintetizate au prezentat o activitate antioxidantă/antiradicală scăzută, deși structura fragmentului ene–diolic a fost păstrată [28,105,106].

Înțelegerea și prezicerea reactivității chimice este esențială pentru sinteza de noi derivați cu proprietăți antioxidante/antiradicalice, prin urmare, în acest capitol va fi prezentată informația despre studiile teoretice ale reactivității chimice, inclusiv descriptorii de reactivitate globală și locală, care a fost dobândită prin aplicarea conceptelor derivate din Teoria Funcțională a Densității.

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.

În pofida interesului de care se bucură recent DFH₄ 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 DFH₄. Deși există dovezi că tautomerismul ceto-enolic este una dintre cele mai studiate forme de prototropie [107], studiile moleculei DFH₄ sunt foarte rare: tautomerizarea ceto-enolică a acidului DFH₄ a fost studiată experimental de către Fleury și Souchay [25] în anii 1960, de către Souza *și colab.* în anii 1980, în timpul investigațiilor efectuate asupra decarboxilării DFH₄ [26], și de către Travin *și colab.* în anii 1980, în timpul unei investigații cinetice a complexului ionului uranil-DFH₄ [108]. În acest context, cercetarea de față are menirea de a oferi rezultate valoroase pentru utilizare ulterioară atât în domenii teoretice, cât și practice.

Grație structurii sale, în cazul DFH₄, sunt posibile diferite conformații pentru cele două forme tautomerice, datorită rotațiilor intramoleculare de-a lungul legăturilor simple C–C și datorită posibilei orientări *sin–* și *anti–* periplanare a hidroxil hidrogenului față de ceto-oxigen.

Structurile geometrice ale tuturor tautomerilor-rotamerilor posibili ai DFH₄ și stările de tranziție (ST) corespunzătoare au fost optimizate fără constrângeri de simetrie la nivelul teoriei B3LYP, separat. Metoda cu aplicarea teoriei funcționalei de densitate (density functional theory - DFT) oferă posibilitatea de a calcula fiabil parametrii termodinamici pentru molecule și sisteme cu legături de hidrogen, în cazul utilizării unui set de bază rezonabil de mare [109]. Prin urmare, pentru efectuarea acestor calcule a fost aleasă funcționala B3LYP cu setul de bază 6–311++G (2df,2p) cu polarizare și funcții difuze pentru atomii de hidrogen și non-hidrogen. Toate calculele au fost efectuate folosind pachetul de chimie cuantică ORCA (a se vedea Cap. 2).

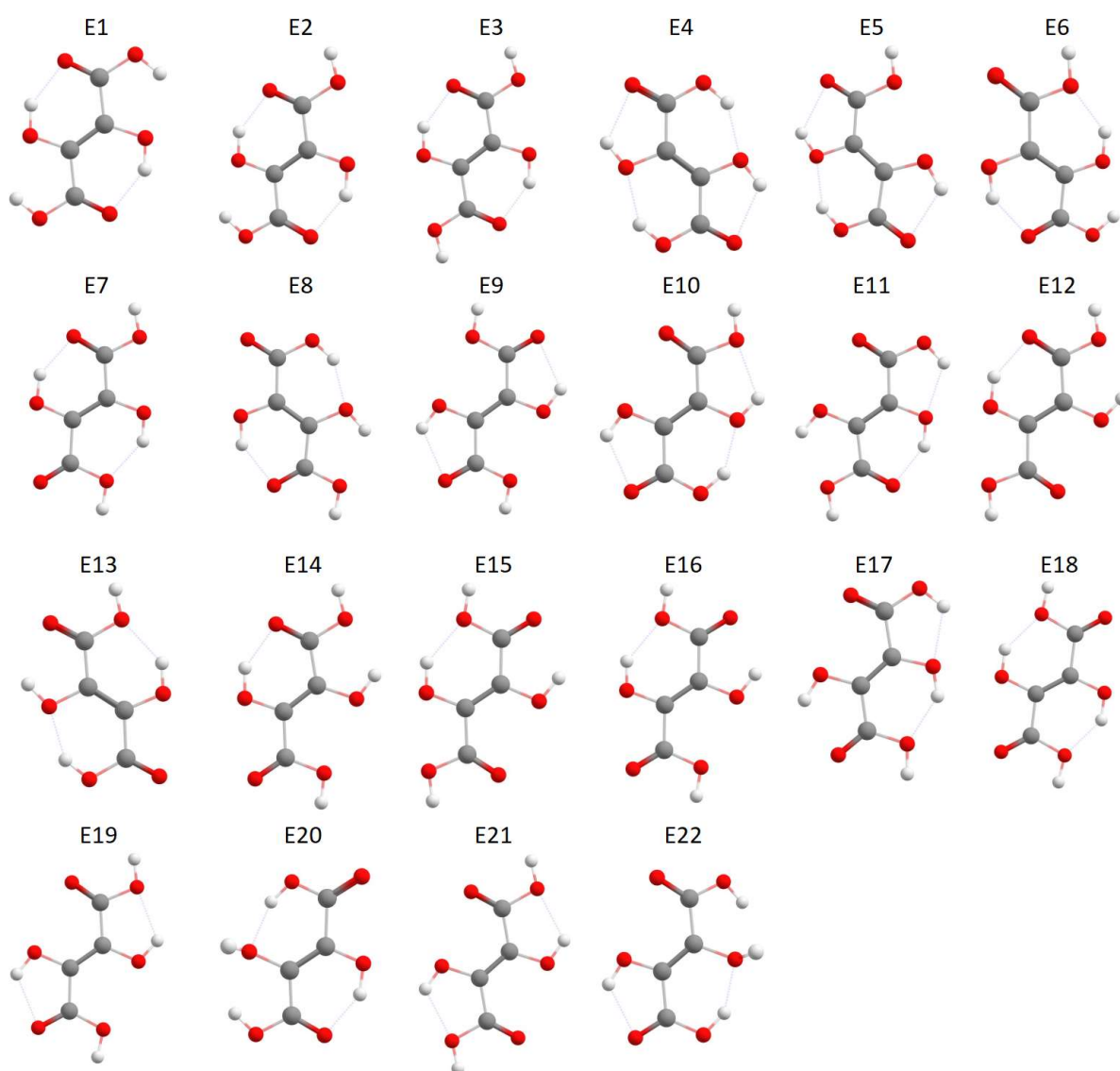


Fig. 4.1. Structurile geometrice optimizate ale izomerilor enediolici ai DFH₄

Stările de tranziție au fost determinate prin metoda NEB (Nudged Elastic Band), implementată în softul ORCA, după care acestea au fost optimizate și studiate în continuare la

nivelul B3LYP/6-311++G(2df,2p), conform celor menționate anterior. Calculele frecvențelor armonice au fost efectuate la același nivel de teorie și au fost utilizate pentru a confirma natura tuturor structurilor staționare și a stărilor de tranziție. Punctele staționare nu au frecvențe imaginare, în timp ce toate stările de tranziție sunt caracterizate de existența unei singure frecvențe imaginare pentru mișcarea de-a lungul coordonatei de reacție.

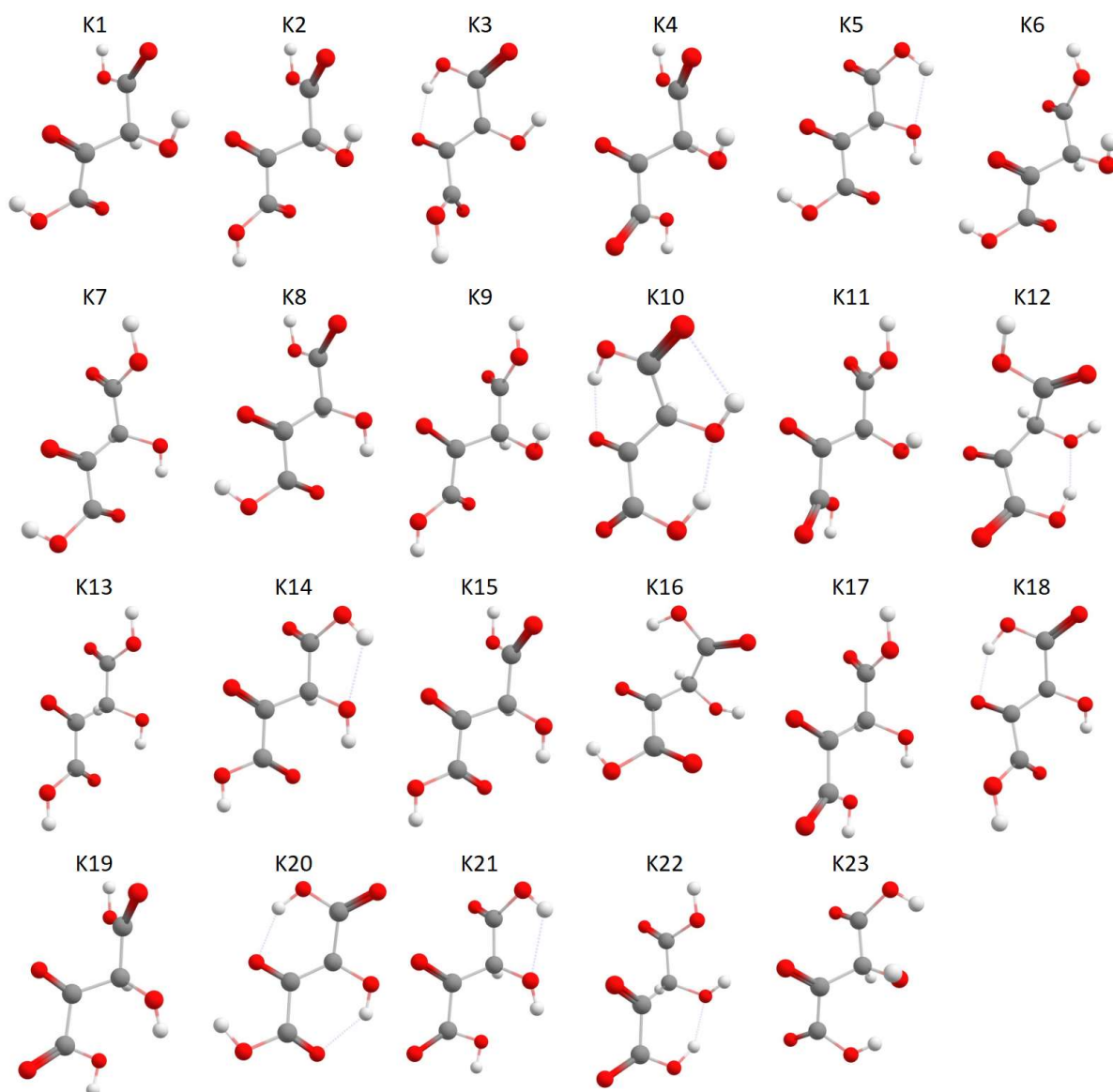


Fig. 4.2. Structurile geometrice optimizate ale izomerilor cetonici ai DFH₄

Frecvențele vibraționale armonice calculate au arătat existența a 22 de structuri enediolice și 23 de structuri cetonice ale DFH₄ în punctele staționare în faza gazoasă. Structurile enediolice și cetonice sunt prezentate în Figurile 4.1 și 4.2, respectiv. Izomerii sunt nominalizați

și aranjați începând cu izomerul cel mai stabil spre cel mai puțin stabil (conform calculelor de energie liberă Gibbs *in vacuo*). Izomerii enediolici au fost notați prin E1–E22 (Figura 4.1) iar formele cetonice prin K1–K23 (Figura 4.2) [110,111].

Energia electronică (E), entalpia (H) și energia Gibbs (G) ale fiecărui conformer au fost calculate la 298.15 K. Folosind energia lui E1 ca punct de referință, toate valorile ΔE , ΔH și ΔG sunt prezentate în Tabelul 4.1 pentru comparație, pentru calcule efectuate *in vacuo* și în apă.

Rezultatele arată că formele enediolice ale DFH₄ sunt mai stabile în fază gazoasă decât formele cetonice. Structura enediolului E1 a DFH₄ este cea mai stabilă formă și reprezintă minimumul global în curba de energie potențială a acidului DFH₄. Trebuie menționat aici că energia liberă Gibbs a celui mai stabil enediol este mai mică decât energia liberă Gibbs a celei mai stabile structuri cetonice K1 cu 46.7 kJ·mol⁻¹ la nivelul B3LYP/6–311++G(2df,2p) [110,111].

Tabelul 4.1. Energiile relative (kJ mol⁻¹) față de cel mai stabil enediol (E1), a izomerilor enediolici (E1–E22) și cetonici (K1–K23) ai DFH₄ la 298.15 K

Izomerii enediolici	ΔE		ΔH		ΔG		Izomerii cetonici	ΔE		ΔH		ΔG	
	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă		Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă
E1	0.00	0.59	0.00	0.53	0.00	0.48	K1	54.34	34.66	53.13	37.51	46.70	32.52
E2	5.18	0.00	5.26	0.00	5.07	0.00	K2	58.64	35.61	56.85	38.70	49.52	33.92
E3	10.42	0.01	10.54	0.58	10.05	1.24	K3	58.32	39.02	55.89	40.65	50.63	36.63
E4	15.46	10.54	15.89	10.62	14.90	7.59	K4	63.37	37.36	61.15	40.60	53.27	35.28
E5	24.33	16.07	24.74	121.6	22.99	12.41	K5	60.67	36.20	59.55	40.97	54.84	39.55
E6	26.66	9.24	26.21	9.40	25.05	8.73	K6	64.46	39.49	63.45	43.18	56.37	39.90
E7	30.59	9.86	30.13	10.23	28.65	9.78	K7	62.83	39.97	61.77	42.57	56.44	37.42
E8	39.95	21.39	36.73	22.46	37.36	20.86	K8	63.22	37.76	61.88	40.41	56.57	36.34
E9	38.07	21.40	38.45	22.44	35.88	20.64	K9	69.15	40.00	67.44	43.32	59.48	39.07
E10	40.46	19.58	39.97	22.15	36.67	21.80	K10	62.96	37.80	61.29	38.98	59.54	38.91
E11	41.07	15.73	40.10	17.01	37.41	17.04	K11	72.92	42.22	70.65	45.44	62.30	38.46
E12	42.66	16.56	41.89	17.55	38.49	17.05	K12	68.81	36.57	67.31	38.73	62.73	37.59
E13	44.21	16.92	43.85	18.60	41.44	19.35	K13	71.95	39.77	70.31	42.69	63.04	37.76
E14	44.48	18.59	41.31	20.11	42.81	20.11	K14	70.45	35.84	68.97	35.38	63.36	35.64
E15	50.37	21.17	49.91	23.43	46.55	23.39	K15	72.24	38.18	70.39	40.77	64.11	35.20
E16	51.27	22.88	50.94	24.73	47.16	24.50	K16	78.83	46.30	76.76	48.72	69.98	50.32
E17	51.07	21.12	50.42	22.72	47.60	23.02	K17	82.73	41.31	80.28	44.87	71.19	39.40
E18	51.53	20.59	50.65	21.96	48.16	22.08	K18	80.28	40.14	77.79	42.13	72.48	36.55
E19	52.67	26.93	52.13	29.29	48.46	29.32	K19	83.40	39.57	80.76	41.98	73.69	36.00
E20	59.99	19.98	59.70	22.15	58.37	23.85	K20	80.71	45.73	78.31	47.93	74.03	46.49
E21	66.16	33.48	64.68	34.09	60.06	32.14	K21	83.82	37.52	81.62	40.73	74.26	36.99
E22	72.94	27.95	72.89	32.85	70.64	33.78	K22	82.55	44.38	80.86	46.49	75.24	43.81
							K23	112.0	56.13	110.6	59.01	104.8	57.63

Notă: În vid, valorile totale ale energiei pentru E1 sunt: $E = -606.1440772$ a.u., $H = -606.04156958$ a.u., $G = -606.08507874$ a.u. În apă, valorile totale ale energiei pentru E2 sunt: $E = -606.15927423$ a.u., $H = -606.05902544$ a.u., $G = -606.10366354$ a.u.

Stabilitatea lui E1 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. Energia liberă Gibbs a acestuia este mai mică decât energia liberă Gibbs a celei mai stabile structuri cetonice K1 cu 32,7 kJ·mol⁻¹ la nivelul B3LYP/6-311++G(2df,2p).

Abundența relativă (AR) a izomerilor enediolici și cetonici a fost calculată prin utilizarea ecuației Boltzmann (4.1), utilizând valorile energiei interne, corectate după energia punctului zero (zero point energy - ZPE):

$$RA = \exp(-\Delta E/RT) \quad (4.1),$$

unde $\Delta E = \Delta E_{el} + \Delta ZPE$.

Rezultatele arată că în fază gazoasă, 99.78% din DFH₄ sunt reprezentate de trei structuri enediolice, 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.%; E2 - 38.4% și E3 - 27%, cu un total de 97.2% (Figura 4.3).

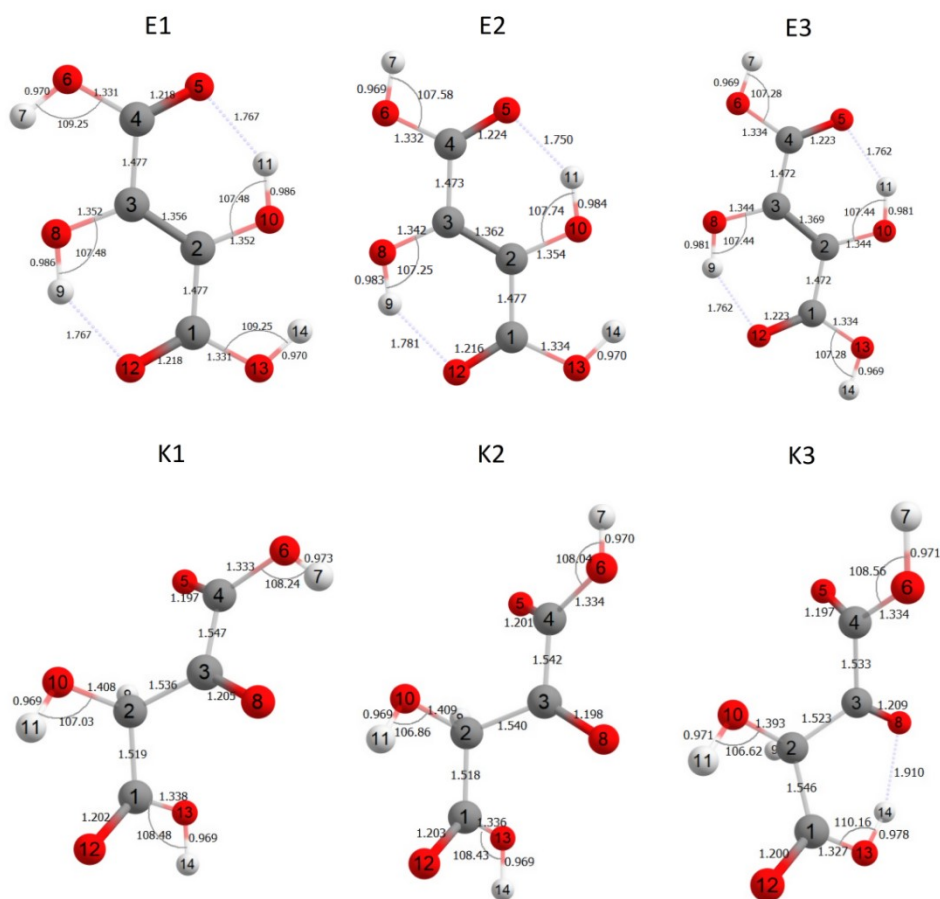


Fig. 4.3. Structurile geometrice optimizate ale celor mai stabile trei structuri enediolice și trei structuri cetonice, *in vacuo*

Atât *in vacuo*, cât și în apă, structurile enediolice ale DFH₄ 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.

Tabelul 4.2. prezintă valorile unor unghiuri diedre pentru cele mai stabile trei structuri enediolice și cetonice. Cele trei structuri enediolice care reprezintă 99.78% din DFH₄ în faza gazoasă, respectiv 97.2% în apă, sunt caracterizate de abateri ale unghiurilor diedre de cel mult 0.1°, în timp ce în toate celelalte structuri ale izomerilor enediolici (cu excepția E20 și E22) abaterile unghiurilor diedre discutate sunt puțin mai mari, dar nu depășesc 1° față de planaritate. Cele mai semnificative abateri sunt prezente în structurile E20 și E22: până la -3,8° (-2,0° în apă) și -2.4° (-1.2° în apă) pentru unghiul (O8C3C2C1); -16.1° (-4.4° în apă) și -3.8° (-1.8° în apă) pentru unghiul (O8C3C4O5); -17.3° (-4.4° în apă) și -3.2° (-1.0° în apă) pentru unghiul (O6C4C3C2) și -179.1° (1.3° în apă) și -166.8° (6.6° în apă) pentru unghiul (O10C2C1O13).

Tabelul 4.2. Unele unghiuri (în °), lungimi de legătură (în Å) și momentele de dipol (în Debye) ale celor mai stabile structuri enediolice și cetonice ale DFH₄

	E1		E2		E3		K1		K2		K3	
	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă
∠ diedru (O10C2C3O8)	180	180	180	180	180	180	93.6	109.58	116.1	121.8	171.8	174.4
∠ diedru (O10C2C1O12)	180	180	-180	-180	180	180	-8.9	-13.72	-13.6	-17.0	11.6	8.0
∠ diedru (O10C2C3C4)	-0	-0	-0	-0	0	0	-82.6	-67.6	-63.9	-58.2	-13.4	-10.5
∠ diedru (O5C4C3O8)	-180	-180	180	180	180	180	172.2	171.8	141.3	147.5	94.9	98.1
R(C2-C3)	1.36	1.36	1.36	1.36	1.37	1.36	1.53	1.53	1.54	1.53	1.52	1.52
R(C3-O8)	1.35	1.35	1.34	1.35	1.34	1.35	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
R(O8-H9)	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	-	-	-	-	-	-
Momentul de dipol	0.001	0.017	3.105	4.318	0.001	0.015	3.179	4.561	0.814	1.317	1.66	2.175

E20 și E22 sunt singurele structuri enediolice care se abat semnificativ de la planaritate, deoarece hidrogenii hidroxilici orientați *anti*-periplanar (în raport cu ceto-oxigenul) a celor două grupări carboxilice de la ambele capete ale moleculei, forțează atomul de hidrogen enolic să se miște în afara planului practic perpendicular, cu unghiul diedric (C1C2O10H11) de 94.1° (-75.6° în apă) și 72.9° (-72.2° în apă) pentru E20 și, respectiv, E22.

Structurile cetonice sunt răsucite, atât în vid cât și în apă, cu unghiul diedric (O10C2C3O8) variind între 85° și aprox. 180°. Celelalte unghiuri diedre deviază de la planaritate cu până la aprox. 90° în unele structuri cetonice, având valori similare în vid și în solvent. Totuși, această variație a unghiurilor diedre influențează foarte puțin celelalte lungimi și unghiuri de legătură.

4.2. Studiu termodinamic și cinetic al izomerizării geometrice și tautomerizării celor mai stabili izomeri ai acidului dihidroxifumaric *in vacuo* și în solvent (apă)

În această secțiune s-au investigat procesele de izomerizare și tautomerizare ceto-enolică a celor mai stabile trei structuri enediolice.

Mai întâi, au fost identificate toate structurile de tranziție caracteristice pentru interconversiile ceto-ceto și enediol-enediol. Figura 3.2 prezintă grafic unele structuri ale ST, iar Tabelul 4.3 prezintă energia de activare (E_a), frecvența imagină (ν) și energia liberă de activare Gibbs (ΔG^\ddagger) pentru unele interconversii [110,111].

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), câteva structuri ale ST pot fi vizualizate în Figura 4.4. În transformările enediol-enediol, energiile de activare ale transferului de proton sunt în intervalul 135-160 kJ·mol⁻¹ iar pentru calea de rotație sunt în intervalul 5-75 kJ·mol⁻¹. Pentru interconversiile dintre formele cetonice, energiile de activare sunt în intervalul 139–153 kJ·mol⁻¹ pentru calea de transfer al protonului și de 0,15–52 kJ·mol⁻¹ pentru rotația internă.

În cazul izomerilor enediolici și cetonici care poartă cel puțin o grupare carboxilică cu hidrogen orientat *sin*- 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. Acestea sunt: E2 ↔ E6, E3 ↔ E7, E5 ↔ E10, E7 ↔ E18, E8 ↔ E13, E9 ↔ E19, E11 ↔ E17, E12 ↔ E14, E12 ↔ E15, E14 ↔ E16, E15 ↔ E16, E19 ↔ E21 și K1 ↔ K6, K2 ↔ K4, K2 ↔ K9, K4 ↔ K11, K7 ↔ K8, K9 ↔ K11, K12 ↔ K22, K13 ↔ K15, K13 ↔ K17, K14 ↔ K21, K15 ↔ K19, K17 ↔ K19.

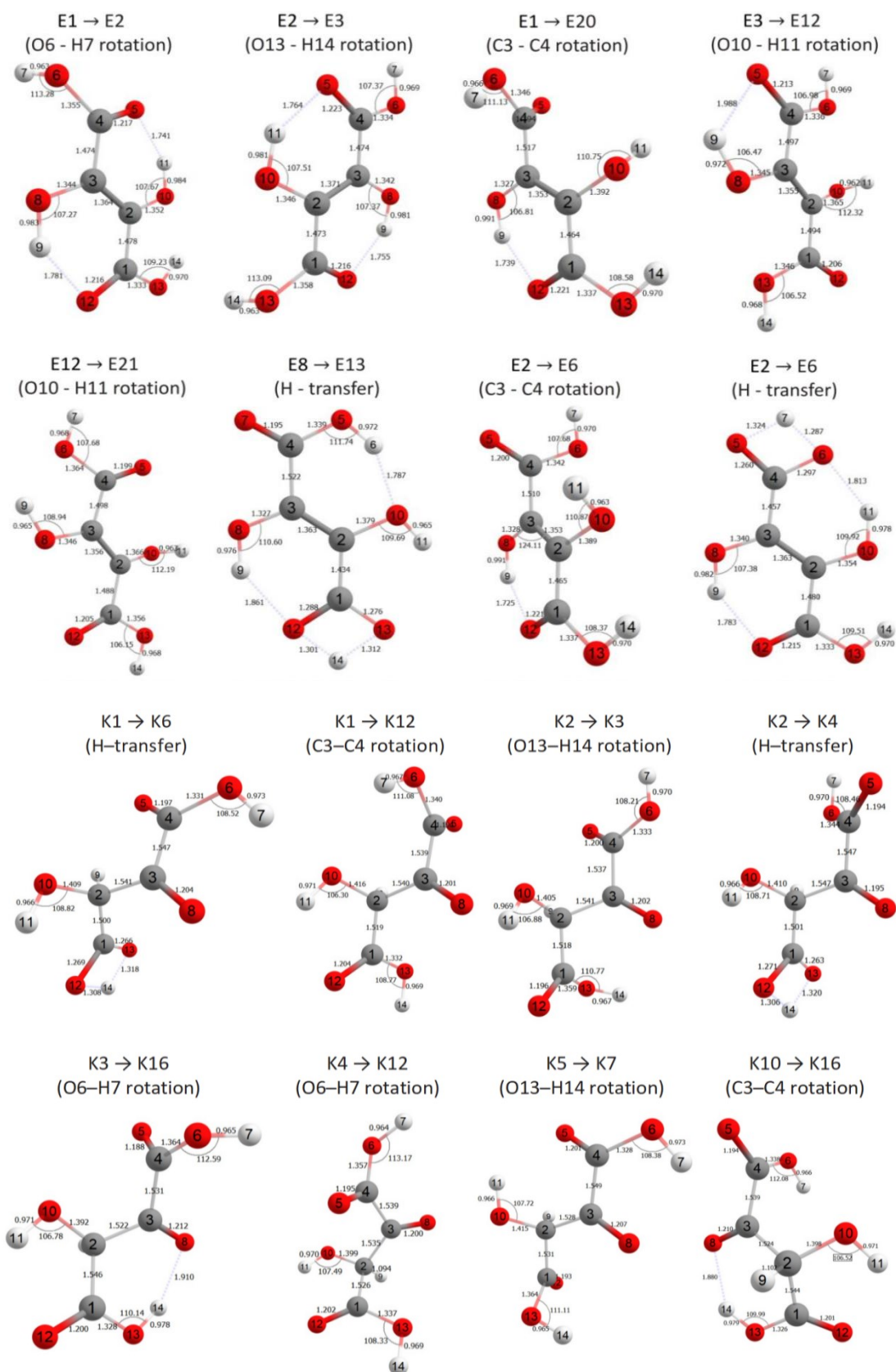


Fig. 4.4. Structurile geometrice optimizate ale unor ST caracteristice pentru interconversiile enediol-enediol și cetonă-cetonă, în apă

Tabelul 4.3. Energia de activare, E_a , energia liberă de activare Gibbs, $\Delta G^\#$ ($\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), și frecvențele imaginare, ν (cm^{-1}), pentru unele interconversii ale enediolilor și ale formelor cetonice

ST	Interconversii enediol-enediol					
	ν		E_a		$\Delta G^\#$	
	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă
O–H rotație						
E1 → E2	-607.01	-426.97	52.19	41.42	47.50	39.90
E2 → E1			47.01	42.01	42.43	40.38
E2 → E3			51.71	41.52	47.01	40.19
E3 → E2	-601.56	-575.23	46.47	41.53	42.03	38.96
E6 → E17			45.17	30.02	40.43	29.94
E17 → E6	-374.78	-324.1	20.76	18.13	17.87	15.66
C–C rotație						
E9 → E19			48.11	34.25	65.83	33.71
E19 → E9	-46.23	-62.20	37.24	26.47	7.46	25.32
E2 → E6			52.64	33.45	49.31	35.09
E6 → E2	-52.04	-72.12	31.15	24.21	29.34	26.36
H–transfer						
E2 → E6			158.92	164.36	145.82	154.28
E6 → E2	-1,875.32	-1997.15	137.43	155.12	125.85	145.54
E3 → E7			156.93	163.68	143.84	152.10
E7 → E3	-1,873.71	-1995.14	136.76	153.81	125.23	143.56
Ceto-ceto interconversii						
ST	ν		E_a		$\Delta G^\#$	
	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă
O–H rotație						
K1 → K2			48.76	44.06	43.87	39.81
K2 → K1	-487.93	-520.06	44.46	43.11	41.04	38.41
K1 → K16			44.33	43.50	40.64	37.71
K16 → K1	-492.33	-507.37	28.18	31.86	25.91	19.91
K11 → K22			41.57	41.00	37.88	36.35
K22 → K11	-481.19	-536.29	31.94	38.83	24.94	31.00
C–C rotație						
K1 → K6			22.84	14.15	23.87	15.10
K6 → K1	-73.29	-56.36	12.72	9.32	14.19	7.71
K1 → K12			23.62	17.50	23.73	18.20
K12 → K1	-69.77	-215.90	9.15	15.59	7.70	13.13
H–transfer						
K1 → K6			162.29	167.03	148.58	156.83
K6 → K1	-1,887.85	-1936.46	152.17	162.20	138.90	149.44
K2 → K4			167.09	168.40	153.19	155.58
K4 → K2	-1,887.49	-1938.56	162.36	166.65	149.43	154.22

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.

Tabelul 4.3. prezintă frecvențele imaginare (ν , în cm^{-1}) ale unor ST pentru interconversiile enediol–enediol și ceto–ceto, pentru comparație. Conform așteptărilor, rotația internă C–C are frecvența minimă (aproximativ -40 cm^{-1} ... -100 cm^{-1}), fiind aproape o vibrație rotațională pură. Frecvența imaginară a reacției de transfer de proton este în jur de -1900 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 cm^{-1} ... -600 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 DFH₄, 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-enediol, cât și pentru ceto-ceto izomerizare. De asemenea, energiile de activare 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 investigată pentru cele mai stabile trei structuri enediolice ale DFH₄ care reprezintă 99.78% în faza gazoasă și 97.3% în mediu apos. Structurile ST optimizate în fază gazoasă sunt prezentate în Figura 4.5, iar ST în mediu apos sunt practic echivalente.

Barierile energetice ale procesului de tautomerizare ceto-enolică au fost calculate folosind diferențele de energie dintre structurile minime locale (Tabelul 6) și stările de tranziție. Singura cale prin care poate avea loc tautomerismul ceto-enolic este transferul de proton. Tabelul 9 prezintă energia de activare, E_a , frecvența imaginară, ν și energia liberă de activare Gibbs, ΔG^\ddagger a interconversiilor ceto-enolice, calculate la nivelul de teorie B3LYP la 298.15 K. Conform așteptărilor, barierele pentru conversiile enediol \rightarrow cetonă le depășesc pe cele pentru tranziții inverse cetonă \rightarrow enediol, în gaz și în apă, cu aproximativ $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [112].

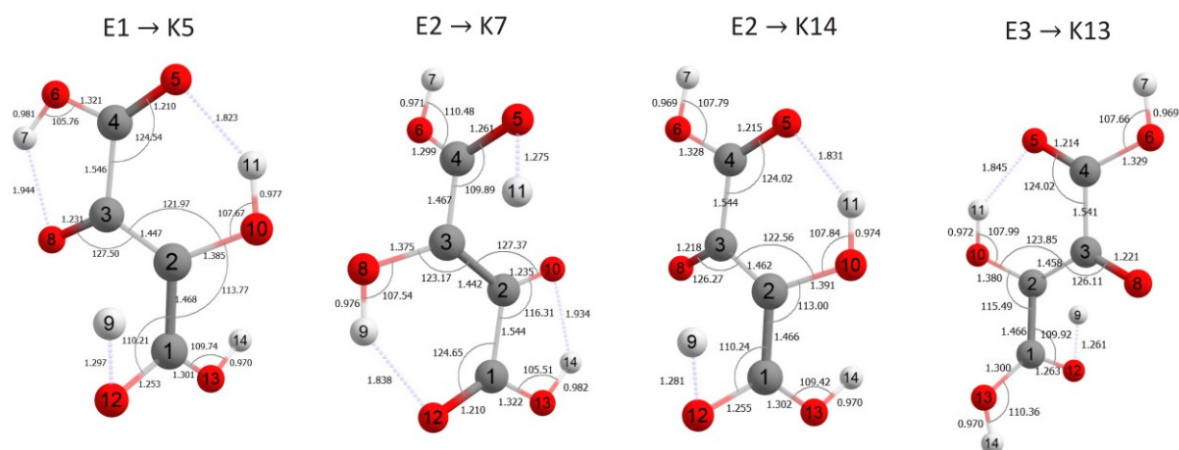


Fig. 4.5. Structurile geometrice optimizate ale stărilor de tranziție în tautomeria ceto-enolică a celor mai stabili trei izomeri ai DFH₄, în vid.

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 ΔG^\ddagger sunt mai mici cu 50-80 kJ·mol⁻¹ în apă, decât în gaz, ceea ce indică faptul că apa participă în procesul de transfer al hidrogenului, ușurându-l. Structurile ST arată că oxigenul carboxilic care formează legătura de hidrogen în structura enediolului este implicat în mecanismul transferului de protoni (Figura 4.5).

Tabelul 4.4. Energia de activare, E_a , frecvența imaginară, ν (cm⁻¹), și energia liberă de activare Gibbs, ΔG^\ddagger , pentru procesele de tautomerizare ceto-enolică a celor mai stabile trei forme enediolice, în vid și în apă

Reacția	ν (cm ⁻¹)		E_a (kJ·mol ⁻¹)		ΔG^\ddagger (kJ·mol ⁻¹)	
	Vid	Apă	Vid	Apă	Vid	Apă
E1 → K5			293.46	236.07	275.13	212.88
K5 → E1	-1813.03	-1881.78	232.79	175.41	220.29	158.05
E2 → K7			291.07	228.97	272.36	206.85
K7 → E2	-1791.89	-1885.58	233.42	171.31	220.99	155.48
E2 → K14			309.94	239.55	289.43	216.36
K14 → E2	-1819.46	-1899.57	244.66	174.27	231.14	158.07
E3 → K13			308.11	232.14	287.50	209.61
K13 → E3	-1805.39	-1895.83	246.58	170.60	234.51	156.63

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

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (4.2),$$

unde ΔG^\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 $\Delta G^\ddagger_1 = G_{TS} - G_{\text{reactant}}$, iar constanta de viteză a reacției inverse (k_2) a fost calculată utilizând valoarea $\Delta G^\ddagger_2 = G_{TS} - G_{\text{produs}}$.

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

$$K_{eq} = \exp(-\Delta G/RT) \quad (4.3),$$

Unde $\Delta G = G_{298}^{\text{produși}} - G_{298}^{\text{reactanți}}$ 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 4.5 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 4.5. 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⁻¹ iar constantele de viteză în s⁻¹.

	Izomerie				Tautomerie ceto-enolică							
	E1 ↔ E2		E2 ↔ E3		E1 ↔ K5		E2 ↔ K7		E2 ↔ K14		E3 ↔ K13	
	Gas	Water	Gas	Water	Gas	Water	Gas	Water	Gas	Water	Gas	Water
ΔE	5.18	-0.59	5.24	-0.01	60.67	35.61	57.66	39.97	65.28	35.84	61.54	39.78
ΔH	5.26	-0.53	5.27	0.58	59.55	40.44	56.50	42.57	63.70	35.38	59.77	42.12
ΔG	5.07	-0.48	4.98	1.24	54.84	39.07	51.30	37.42	58.29	35.64	52.99	36.52
K_{eq}	0.13	1.21	0.13	0.61	2.46 · 10 ⁻¹⁰	1.41 · 10 ⁻⁷	10.29 · 10 ⁻¹⁰	2.73 · 10 ⁻⁷	0.61 · 10 ⁻¹⁰	5.61 · 10 ⁻⁷	5.21 · 10 ⁻¹⁰	3.93 · 10 ⁻⁷
ΔG^\ddagger_1	47.50	39.90	47.01	40.19	275.13	261.20	272.36	260.72	289.43	270.23	287.50	267.22
ΔG^\ddagger_2	42.43	40.38	42.03	38.96	220.29	222.13	220.99	223.29	231.14	234.59	234.51	230.70
k_1	2.96 · 10 ⁴	6.29 · 10 ⁵	3.61 · 10 ⁴	5.59 · 10 ⁵	3.91 · 10 ⁻³⁶	1.01 · 10 ⁻³³	1.19 · 10 ⁻³⁵	1.23 · 10 ⁻³³	1.22 · 10 ⁻³⁸	2.66 · 10 ⁻³⁵	2.66 · 10 ⁻³⁸	8.96 · 10 ⁻³⁵
k_2	2.29 · 10 ⁵	5.18 · 10 ⁵	2.69 · 10 ⁵	9.19 · 10 ⁵	1.59 · 10 ⁻²⁶	71.85 · 10 ⁻²⁶	1.19 · 10 ⁻²⁶	4.49 · 10 ⁻²⁷	1.99 · 10 ⁻²⁸	4.70 · 10 ⁻²⁹	5.11 · 10 ⁻²⁹	2.26 · 10 ⁻²⁸

Rezultatele arată că prezența solventului (apa) influențează atât parametrii termodinamici, cât și cinetici. În soluție apoasă, ΔE , ΔH , ΔG , ΔG_1^\ddagger și ΔG_2^\ddagger scad cu aproximativ 2-7 kJ·mol⁻¹ în reacțiile de izomerizare și cu aproximativ 10-30 kJ·mol⁻¹ 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 2.46·10⁻¹⁰, 10.29·10⁻¹⁰, 0.61·10⁻¹⁰ și 5.21·10⁻¹⁰, respectiv. În apă, aceste valori sunt de 1.41·10⁻⁷, 2.73·10⁻⁷, 5.61·10⁻⁷, 3.93·10⁻⁷, respectiv, ceea ce demonstrează o creștere semnificativă a vitezelor reacțiilor directe.

4.3. Descriptorii de reactivitate globală și validitatea procedurii KID

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 electrophile sau nucleophile, și atribuie o singură valoare întregii molecule.

Cei mai simpli descriptori de reactivitate globală sunt 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 (μ) reprezintă aciditatea/bazicitatea intrinsecă a lui Lewis a unui sistem și este întotdeauna negativ; electronegativitatea (χ) reprezintă tendința atomilor sau moleculelor de a atrage electroni; electrorigiditatea globală (η) poate fi definită ca rezistența la transferul de sarcină și este întotdeauna pozitivă; electrofilicitatea (ω) 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 [113], utilizarea energiilor orbitalilor moleculari de frontieră ca aproximare pentru obținerea I și A este susținută de teorema lui Janak [114]. 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 [115]. Folosind o aproximare cu diferențe finite și teorema lui Koopman [116], acești descriptori pot fi exprimați prin următoarele ecuații:

$$I = E_{N-1} - E_N \approx -\epsilon_H \quad (4.4)$$

$$A = E_N - E_{N+1} \approx -\epsilon_L \quad (4.5)$$

$$\mu = -\chi \approx -\frac{1}{2}(I + A) \approx \frac{1}{2}(\epsilon_L + \epsilon_H) \quad (4.6)$$

$$\eta \approx \frac{1}{2}(I - A) \approx \frac{1}{2}(\epsilon_L - \epsilon_H) \quad (4.7)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \approx \frac{(I+A)^2}{2(I-A)} \approx \frac{(\epsilon_L + \epsilon_H)^2}{2(\epsilon_H + \epsilon_L)} \quad (4.8)$$

unde ϵ_H și ϵ_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.

Conform celor menționate la începutul acestui capitol, unii derivați obținuți nu au manifestat activitate antioxidantă/antiradicalică, cu toate că fragmentul enediolic a fost păstrat în structura moleculelor respective. Pentru a studia acest fenomen, am căutat să obținem informații suplimentare cu privire la reactivitatea chimică a moleculelor studiate, inclusiv descriptorii de reactivitate globală și locală, cu utilizarea conceptelor bazate pe metodele DFT. Aceste informații ar permite de a explica rezultatele obținute anterior, precum și de a prezice siturile reactive în procesul de design a derivaților noi.

Figura 4.6 prezintă structurile optimizate ale compușilor studiați, în apă. Compușii **1**, **2**, **5**, **6**, **12** și **13** au structuri plane, iar compușii **7**, **8**, **9**, **10** și **11** au structurile sucite, din cauza fragmentelor anexate. Interesant de remarcat faptul că anume structurile plane au demonstrat cea mai mare activitate antioxidantă/antiradicalică în cercetările experimentale, sugerând că geometria moleculei trebuie, de asemenea, luată în considerație în studiile ce implică radicalii DPPH• și ABTS^{•+}, care sunt specii radicalice cu un număr mare de atomi.

Tabelul 4.6 prezintă valorile energiilor electronice calculate pentru compușii studiați cu sarcinile +1, 0 și -1, care corespund speciilor cationice, neutre și anionice, respectiv. Diferențele de energie indică faptul că prezența solvenților stabilizează compușii **1**, **2**, **5**, **6**, **11** cu circa 25–50 kJ·mol⁻¹, compușii **7**, **8**, **9**, **12** și **13** cu circa 50–100 kJ·mol⁻¹, iar compusul **10** cu 115–150 kJ·mol⁻¹.

Valorile prezentate în Tabelul 4.6 au fost utilizate pentru a calcula potențialele verticale de ionizare I și afinitățile electronice A (în eV), și descriptorii globali de reactivitate (electronegativitatea χ , tăria totală η , și electrofilicitatea globală ω) ale moleculelor studiate. Acești descriptorii, împreună cu energiile orbitalilor HOMO și LUMO (în eV), sunt prezentate în Tabelul 4.7.

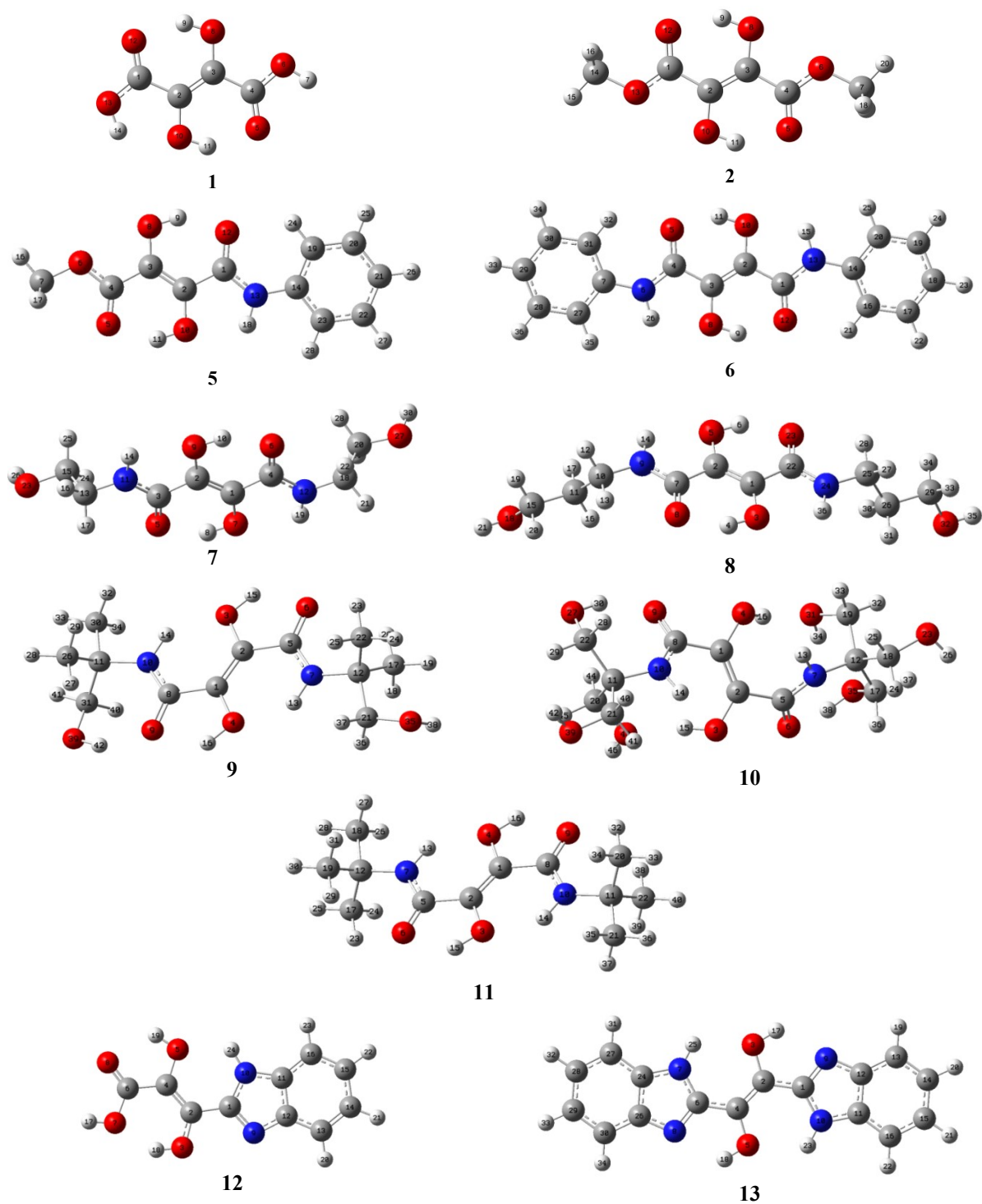


Fig. 4.6. Structurile optimizate ale compușilor cercetați în soluție apoasă: 1 - DFH₄, 2 - dimetil 2,3-dihidroxifumarat, 5 - (*E*)-metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoat, 6 - 2,3-dihidroxi-N1,N4-di(piridin-2-il)fumaramida, 7 - MEAD, 8 - MPAD, 9 - 2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramida, 10 - N1,N4-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxifumaramida, 11 - N1,N4-di-tert-butil-2,3-dihidroxifumaramida, 12 - MBD, 13 - BBD

Tabelul 4.6. Energiile electronice în hartree, ale compușilor studiați, în vid, apă și metanol

Compușul	Faza	Sarcina +1 (multip. = 2)	Sarcina 0 (multip. = 1)	Sarcina -1 (multip. = 2)
DFH ₄ 1	Gaz (vid)	-605.7484223	-606.088655	-606.1035926
	Apă	-605.8721992	-606.1047084	-606.1947288
	Metanol	-605.8736924	-606.1034704	-606.1896305
Dimetil 2,3-dihidroxifumarat 2	Gaz (vid)	-684.346181	-684.6495683	-684.6518663
	Apă	-684.4335329	-684.6597513	-684.7452721
	Metanol	-684.4337419	-684.6603574	-684.7432581
<i>(E)</i> -metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoat 5	Gaz (vid)	-856.1784784	-856.4595639	-856.4722537
	Apă	-856.2537816	-856.470400	-856.5552357
	Metanol	-856.2544116	-856.474637	-856.5543781
2,3-dihidroxi-N1,N4-di(piridin-2-il)fumaramida 6	Gaz (vid)	-1027.999121	-1028.270221	-1028.290088
	Apă	-1028.069128	-1028.281918	-1028.365072
	Metanol	-1028.075728	-1028.288934	-1028.370304
MEAD 7	Gaz (vid)	-873.64297	-873.9349746	-873.9249985
	Apă	-873.7486554	-873.9658111	-874.0341436
	Metanol	-873.7492577	-873.9668436	-874.0331369
MPAD 8	Gaz (vid)	-952.238379	-952.524954	-952.511061
	Apă	-952.341208	-952.557323	-952.624098
	Metanol	-952.3442359	-952.5601177	-952.6263063
2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramida 9	Gaz (vid)	-1030.821748	-1031.118599	-1031.119027
	Apă	-1031.208575	-1031.140454	-1030.920334
	Metanol	-1030.924611	-1031.145302	-1031.211229
N1,N4-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxifumaramida 10	Gaz (vid)	-1331.618073	-1331.914894	-1331.9136
	Apă	-1331.747447	-1331.970848	-1332.035979
	Metanol	-1331.735107	-1331.959545	-1332.010436
N1,N4-di-tert-butil-2,3-dihidroxifumaramida 11	Gaz (vid)	-880.419886	-880.70997	-880.697777
	Apă	-880.501423	-880.717923	-880.780651
	Metanol	-880.5083491	-880.725266	-880.7875483
MBD 12	Gaz (vid)	-795.807936	-796.084165	796.099544
	Apă	-795.902281	-796.109965	-796.19062
	Metanol	-795.9029754	-796.1112026	-796.1897187
BBD 13	Gaz (vid)	-985.850991	-986.102094	-986.118723
	Apă	-985.928835	-986.121289	-986.196453
	Metanol	-985.9334433	-986.1263518	-986.1994685

Partea din stânga a Tabelul 4.7 arată rezultatele obținute presupunând validitatea teoremei lui Koopman, iar partea din dreapta arată rezultatele obținute din valorile verticale calculate ale I și A . După cum se poate observa din Tabelul 4.7, teorema lui Koopman este valabilă pentru calcule efectuate în solvenții utilizați (apă și metanol).

Tabelul 4.7. Energiile orbitalilor HOMO și LUMO (în eV), diferența HOMO–LUMO $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ (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_{HOMO}	E_{LUMO}	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$	χ	η	ω	I	A	χ	η	ω
DFH ₄ 1	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 2,3-dihidroxifumarat 2	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
<i>(E)</i> -metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoat 5	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
2,3-dihidroxi-N1,N4-di(piridin-2-il)fumaramida 6	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 7	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 8	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
2,3-dihidroxi-N1,N4-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramida 9	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
N1,N4-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propa n-2-il)-2,3-dihidroxifumaramida 10	Gaz	-6.22	-1.65	4.57	3.94	2.29	6.78	8.08	-0.04	4.02	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
N1,N4-di-tert-butil-2,3-dihidroxifumaramida 11	Gaz	-5.96	-1.42	4.54	3.69	2.27	6.00	7.89	-0.33	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 12	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 13	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

Pentru faza gazoasă, electronegativitatea este prezisă surprinzător de bine, în timp ce duritatea totală este de 2 ori mai mică, iar electrofilia este de 2 ori mai mare decât datele obținute din utilizând valorile verticale calculate ale I și A . Aceste rezultate sugerează că Procedura KID este valabilă și poate fi utilizată în studii ulterioare ale compușilor înrudiți în solvent (apă, metanol). Calculele demonstrează că acidul DFH₄ 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.

4.4. Funcțiile Fukui, Parr și indicele diferenței 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.

În cadrul DFT, primul descriptor local de reactivitate care este utilizat pentru a caracteriza interacțiunile electrostatice dintre molecule este densitatea electronică $\rho(\vec{r})$. Totuși, atunci când reacțiile chimice se datorează în principal interacțiunilor covalente, se întrebunțează un descriptor local de reactivitate de ordinul doi, funcția Fukui, care permite identificarea celor mai reactive situsuri ale unei molecule, cele predispuse la atacuri electrophile, nucleophile sau radicale.

Funcția Fukui este definită în termenii derivatei lui $\rho(\vec{r})$ față de N , dată de ecuația. (4.9), după cum urmează:

$$f(\vec{r}) = \left(\frac{\partial \rho(\vec{r})}{\partial N} \right)_{v(\vec{r})} \quad (4.9)$$

unde $\rho(\vec{r})$, N și $v(\vec{r})$ sunt densitatea electronică, numărul de electroni și respectiv potențialul extern exercitat de nucleu. Funcția $f(\vec{r})$ reflectă modificarea densității electronilor indusă de modificarea numărului absolut de electroni cu o geometrie și un potențial fix.

În funcție de densitățile electronice totale, funcțiile Fukui pot fi definite în două moduri, pe baza derivatei lui $\rho(\vec{r})$ din dreapta și din stânga față de N (ecuațiile 4.10 și 4.11), iar a treia definiție prezintă descriptorul atacului radicalic (ecuația 9), în conformitate cu concluziile lui Perdew și colab. [117]:

$$f^+(\vec{r}) = \left(\frac{\partial \rho(\vec{r})}{\partial N} \right)_{v(\vec{r})}^+ = \rho_{N+1}(\vec{r}) - \rho_N(\vec{r}) \quad (4.10)$$

$$f^-(\vec{r}) = \left(\frac{\partial \rho(\vec{r})}{\partial N} \right)_{v(\vec{r})}^- = \rho_N(\vec{r}) - \rho_{N-1}(\vec{r}) \quad (4.11)$$

$$f^0(\vec{r}) = \frac{1}{2} [\rho_{N+1}(\vec{r}) - \rho_{N-1}(\vec{r})] \quad (4.12)$$

unde $\rho(\vec{r})$ este sarcina atomică în situsul atomic r , pentru speciile neutră (N), anionică ($N+1$) și cationică ($N-1$).

Descriptorul electrofil $f^+(\vec{r})$ măsoară reactivitatea intramoleculară la situsul r față de un reactiv nucleofil, iar cele mai mari valori ale $f^+(\vec{r})$ vor implica locul preferat pentru un atac nucleofil (de către o moleculă nucleofilă). Funcția Fukui nucleofilă $f^-(\vec{r})$ măsoară reactivitatea intramoleculară la situsul r față de un reactiv electrofil, iar valoarea cea mai mare indică locul preferat pentru un atac electrofilic [118].

Deși funcția Fukui este foarte utilă în dezvoltarea regiunilor nucleofile și electrofile ale unei molecule, un descriptor local de reactivitate de o precizie sporită a fost propus de către Morell și colab. [117], și anume descriptorul dual, exprimat ca o derivată a funcției Fukui în raport cu numărul de electroni:

$$f^{(2)}(\vec{r}) = \left(\frac{\partial f(\vec{r})}{\partial N} \right)_{v(\vec{r})} \cong f^+(\vec{r}) - f^-(\vec{r}) \quad (4.13)$$

Astfel, descriptorul dual poate fi aproximat la diferența dintre funcțiile Fukui pentru atacurile nucleofile și electrofile și, prin urmare, ajută la dezvoltarea adevăratelor locuri preferate pentru atacurile electrofilice și nucleofilice, simultan. Descriptorul dual este util mai ales în situațiile ambigue, când nu se poate obține o informație exactă din $f^+(\vec{r})$ și $f^-(\vec{r})$, deoarece este o combinație a celor două. Descriptorul dual este pozitiv pentru locațiile susceptibile la atacuri nucleofile și negativ în situsurile unde este mai probabil un atac electrofilic.

În ceea ce privește densitățile orbitalilor moleculari de frontieră (aproximarea orbitalilor moleculari de frontieră, FMOA), ec. (4.13) se transformă în ec. (4.14) după cum urmează:

$$f^{(2)}(\vec{r}) = \rho_{LUMO}(\vec{r}) - \rho_{HOMO}(\vec{r}) \quad (4.14)$$

În această formă, această expresie implică faptul că reactivitatea locală a moleculei depinde numai de densitățile electronice ale orbitalilor moleculari de frontieră. Astfel, densitățile electronice ale celorlalți orbitali moleculari ocupați nu sunt implicate, iar efectele de relaxare sunt excluse, făcând din descriptorul dual un descriptor local de reactivitate mai precis decât $f^+(\vec{r})$ și $f^-(\vec{r})$ [117].

Recent, Luis R. Domingo a introdus și alți descriptori de reactivitate locală, în conceptul său de Teorie a densității electronilor moleculari (molecular electron density theory - MEDT), și anume funcțiile Parr [119,120] care pot fi considerate ca o alternativă a funcțiilor Fukui pentru

descrierea zonelor din interiorul moleculelor unde vor fi favorizate atacurile nucleofile sau electrofile. Funcțiile Parr pot fi exprimate prin următoarele ecuații:

$$P^-(\vec{r}) = \rho_s^{rc}(\vec{r}) \quad (4.15)$$

$$P^+(\vec{r}) = \rho_s^{ra}(\vec{r}) \quad (4.16)$$

unde $P^-(\vec{r})$ și $P^+(\vec{r})$ sunt funcțiile Parr nucleofilică și electrofilică, respectiv, și $\rho_s^{rc}(\vec{r})$ și $\rho_s^{ra}(\vec{r})$ sunt legate cu densitatea atomică de spin a radical cationului și radical anionului, respectiv [121].

De remarcat, totuși, că funcțiile Fukui și Parr pot da rezultate slabe și chiar contradictorii pentru sistemele care prezintă hiperconjugare, iar acest efect este mai puternic în speciile cu sarcină decât la speciile neutre [119].

Pentru a depăși acest posibil neajuns, în cadrul acestui capitol a fost utilizat și descriptorul diferenței de reactivitate locală R_k , propus de Chattaraj și colab. [122], permițând identificarea centrilor cu comportament electrofil ($R_k = + \text{n.nn}$), nucleofil ($R_k = - \text{n.nn}$) precum și comportamentul ambifil ($R_k = \pm \text{n.nn}$), și pentru a elimina centrii cu reactivitate marginală [122]:

- (a) dacă $(1 < \omega_k/N_k < 2)$ sau $(1 < N_k/\omega_k < 2)$
atunci $R_k \approx (\omega_k + N_k)/2 \rightarrow$ ambifilic ($R_k = \pm \text{n.nn}$)
altfel $R_k \approx (\omega_k - N_k)$
- (b) pentru $R_k > 0 \rightarrow$ electrofilic ($R_k = + \text{n.nn}$)
- (c) pentru $R_k < 0 \rightarrow$ nucleofilic ($R_k = - \text{n.nn}$)
- (d) dacă $|R_k| < 0.1$, atunci $R_k = 0$.

Semnul (+, -, ±) indicelui R_k indică caracterul electrofilic și/sau nucleofilic al centrului k , în timp ce mărimea n.nn este o măsură a activării locale. Electrofilicitatea locală (ω_k) și nucleofilicitatea locală (N_k), în situsul atomic k sunt definite în termenii funcțiilor Fukui relevante, f_k^+ și f_k^- , conform relațiilor:

$$\omega_k = \omega \cdot f_k^+ \quad (4.17)$$

$$N_k = N \cdot f_k^- \quad (4.18)$$

unde N este nucleofilicitatea definită relativ tetracianoetilenei (TCE) [122]. TCE este folosit ca referință deoarece prezintă cea mai scăzută energie HOMO dintr-o serie mare de molecule deja investigate, permițând crearea unei scări normalizate de valori pozitive:

$$N = E_{HOMO(Nu)} (eV) - E_{HOMO(TCE)} (eV) \quad (4.19)$$

Funcțiile Fukui condensate la situsul atomic k , pentru atacul nucleofil (f_k^+) și pentru atacul electrofil (f_k^-) sunt date în funcție de populația respectivă $q_k(N)$ a sistemului N -electronic al situsului atomic k , de către ecuațiile 4.20, 4.21 după cum urmează:

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad (4.20)$$

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad (4.21)$$

Un alt predictor util al reactivității chimice, folosit în cadrul acestei cercetări în scopuri de verificare, este potențialul electrostatic, care arată regiunile potențiale negative, care se așteaptă a fi locuri de protonare și atac nucleofilic, și regiunile potențiale pozitive, care pot indica situsuri electrofile. Acesta este un instrument predictiv important, deoarece atracția/repulsia electrostatică este de rază lungă în comparație cu efectele de transfer de electroni caracterizate de descriptorul dual [123]. O hartă clasică a potențialului electrostatic molecular (molecular electrostatic potential - MEP) indică regiunile roșii cu potențial electrostatic negativ, locurile albastre reprezintă regiunile cu potențial electrostatic pozitiv, iar părțile de culoare verde reprezintă regiunile cu potențial zero.

În cadrul acestui sub-capitol au fost investigați DFH₄ și toți derivații sintetizați ai acestuia, inclusiv și aceșe substanțe care nu au demonstrat activitate antioxidantă/antiradicalică. Structurile moleculare ale moleculelor investigate au fost optimizate la B3LYP/6-311G(d,p) în fază gazoasă, iar absența valorilor negative în profilul vibrațional a confirmat adevăratele minime. Pentru a analiza efectul apei, aceste structuri au fost utilizate în continuare ca punct de plecare pentru o optimizare la B3LYP/6-311G(d,p) în apă, utilizând modelul de solvatare SMD.

Pentru a compara informațiile obținute din descriptorii locali de reactivitate, au fost calculate funcțiile Fukui și funcțiile Parr. Funcțiile Fukui au fost calculate utilizând sarcinile atomice din analiza populației Hirshfeld pentru anionii și cationii respectivi, iar funcțiile Parr din densitățile atomice de spin - din analiza populației Hirshfeld pentru radical anionii și radical cationii respectivi.

Pentru a valida utilizarea energiilor orbitalilor moleculari Kohn-Sham de frontieră pentru a calcula descriptorii de reactivitate calculați conform teoriei DFT conceptuale, 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.

4.5. Analiza comparativă a indicilor de reactivitate locală

Descriptorul dual $f^{(2)}(\vec{r})$, precum și funcțiile Parr electrofilice și nucleofilice ale atomilor compușilor studiați sunt prezentate în Tabelul 4.8-4.17. Valorile reale au fost multiplicat cu 100 pentru a ușura comparația dintre ele. O critică importantă ce ține de calculul funcțiilor Fukui se referă la modul arbitrar de alegere a sarcinilor [124]. În cadrul cercetărilor noastre anterioare [125] am studiat funcțiile Fukui calculate folosind sarcinile Hirshfeld și NBO, iar rezultatele au fost similare. Din acest motiv, în cadrul acestui capitol sunt prezentate numai rezultatele bazate pe sarcinile Hirshfeld.

Pentru a verifica informațiile oferite de către indicii de reactivitate locală, a fost de asemenea utilizată harta potențialului molecular electrostatic (MEP).

Potențialul electrostatic molecular este foarte informativ în ceea ce privește distribuția de sarcină nucleară și electronică a moleculelor, pe lângă faptul că este un instrument util în interpretarea și predicția reactivității chimice. Harta MEP este utilizată pe scară largă ca o hartă de reactivitate care afișează cea mai probabilă regiune pentru atacuri nucleofile și electrofile. Pe suprafața MEP, culoarea roșie se referă la regiunea bogată în electroni (negativă), culoarea albastră se referă la regiunea săracă în electroni (pozitivă), iar culoarea verde înseamnă potențial electrostatic zero. În majoritatea suprafețelor MEP, regiunea negativă este locul preferat pentru atacul electrofile și regiunea pozitivă este preferată pentru atacul nucleofil. Concentrațiile de electroni la suprafața MEP sunt indicate prin culori. Valorile densității electronilor scad în următoarea ordine Roșu > Portocaliu > Galben > Verde > Albastru.

Pentru derivații cercetați, multe valori ale f_k^+ , f_k^- și f_k^0 sunt negative atât în gaz, cât și în solvent (apă și metanol). Acest lucru înseamnă că în specia cationică densitatea electronică se mărește, iar în specia anionică densitatea electronică scade pe toți atomii. Ayres și colab. au sugerat anterior că un astfel de comportament ar putea fi corelat cu oxidarea și reducerea centrelor atomice din moleculă [126].

Astfel, în cazul compușilor cercetați, funcțiile Fukui electrofilice și nucleofilice nu permit obținerea unor concluzii exacte cu acuratețe. În schimb, semnul descriptorului dual poate descrie fără ambiguitate situsurile nucleofile și electrofile din moleculă, așa cum s-a menționat anterior. Mai exact, dacă $f^{(2)}(\vec{r}) > 0$, atunci locul este favorabil pentru un atac nucleofil, în timp ce dacă $f^{(2)}(\vec{r}) < 0$, atunci locul poate fi favorabil pentru un atac electrofil [117, 127].

Pentru DHF₄, rezultatele prezentate în Tabelul 4.8 arată că în faza gazoasă, conform valorilor descriptorului dual, situsurile preferate pentru atacuri nucleofilice sunt O8 și O10 ($f_k^{(2)} = 8.6$) urmate de C2 și C3 ($f_k^{(2)} = 3.8$), în timp ce situsurile preferate pentru atacurile electrofile

sunt C1 și C4 ($f_k^{(2)} = -7.1$). Valorile calculate ale funcțiilor Parr indică asupra faptului că C1 și C4 ($P_k^+ = 16.8$), și C2 și C3 ($P_k^+ = 15.9$) sunt situsurile preferate pentru atacurile nucleofilice, în timp ce C2 și C3 ($P_k^- = 24.3$) și O8 și O10 ($P_k^- = 23.3$) vor fi favorizate pentru atacurile electrofilice.

Aceste rezultate pot părea controversate la prima vedere, dar acest lucru poate fi explicat prin faptul că acidul dihidroxifumaric este un sistem hiperconjugat, stabilizat de interacțiunile dintre legăturile duble C=C și C=O și perechile de electroni liberi ale oxigenului și prin urmare, unele dintre grupuri pot avea un comportament ambifilic.

Harta MEP a DFH₄ (Figura 4.7a) confirmă că regiunea pe C1 și C4 este încărcată pozitiv, astfel încât un electrofil ar fi respins, favorizând aceste locuri pentru un atac nucleofil, așa cum sugerează funcția Parr și se confirmă în experimentele de chimie organică, în timp ce potențialul electrostatic pe C2, C3 și O8, O10 este foarte aproape de neutru, sugerând că aceste locuri ar putea, într-adevăr, să fie abordate de electrofili (neutri sau pozitivi) și nucleofili (neutri sau negativi).

Pentru a verifica această afirmație, a fost calculat indicele local al diferenței de reactivitate R_k (Tabelul 4.8). Rezultatele confirmă că C2, C3 și O8, O10 sunt situsuri ambifilice care pot acționa ca electrofile și nucleofile în faza gazoasă. În apă și metanol, descriptorii de reactivitate cresc ușor, iar tendința rămâne aceeași, cu singura diferență că O8 și O10 sunt prezentate ca singurele situsuri reactive ambifile, cu valorile R_k de ± 0.48 și ± 0.51 , respectiv, în apă, și R_k de ± 0.55 pentru amândouă, în metanol.

Tabelul 4.8. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de acid DFH₄ 1, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-7.1	-7.1	-15.1	16.8	17.6	16.0	-3.5	0.9	0.9	-0.47	-1.02	-0.94
2 C	3.8	4.2	-23.5	15.9	15.0	13.6	24.3	21.0	21.0	±0.37	-0.66	-0.51
3 C	3.8	3.9	-23.5	15.9	15.5	13.7	24.3	21.0	21.0	±0.37	-0.68	-0.51
4 C	-7.1	-7.4	-15.0	16.8	18.2	16.0	-3.5	0.9	0.9	-0.47	-1.04	-0.94
5 O	-3.4	-4.6	-17.3	12.4	11.4	11.6	7.3	4.2	4.2	-0.41	-0.94	-0.85
6 O	-2.0	-3.2	-9.7	2.7	3.1	4.7	-0.8	-0.1	-0.1	-0.28	-0.57	-0.51
8 O	8.6	10.5	-23.1	2.6	2.8	3.8	23.3	23.2	0.0	±0.34	±0.51	±0.55
10 O	8.6	9.7	-23.1	2.6	2.7	3.8	23.3	23.2	23.2	±0.34	±0.48	±0.55
12 O	-3.4	-4.3	-17.2	12.4	11.4	11.6	7.3	4.2	0.8	-0.41	-0.94	-0.84
13 O	-2.0	-2.9	-9.8	2.7	3.0	4.7	-0.8	-0.1	23.2	-0.28	-0.58	-0.51

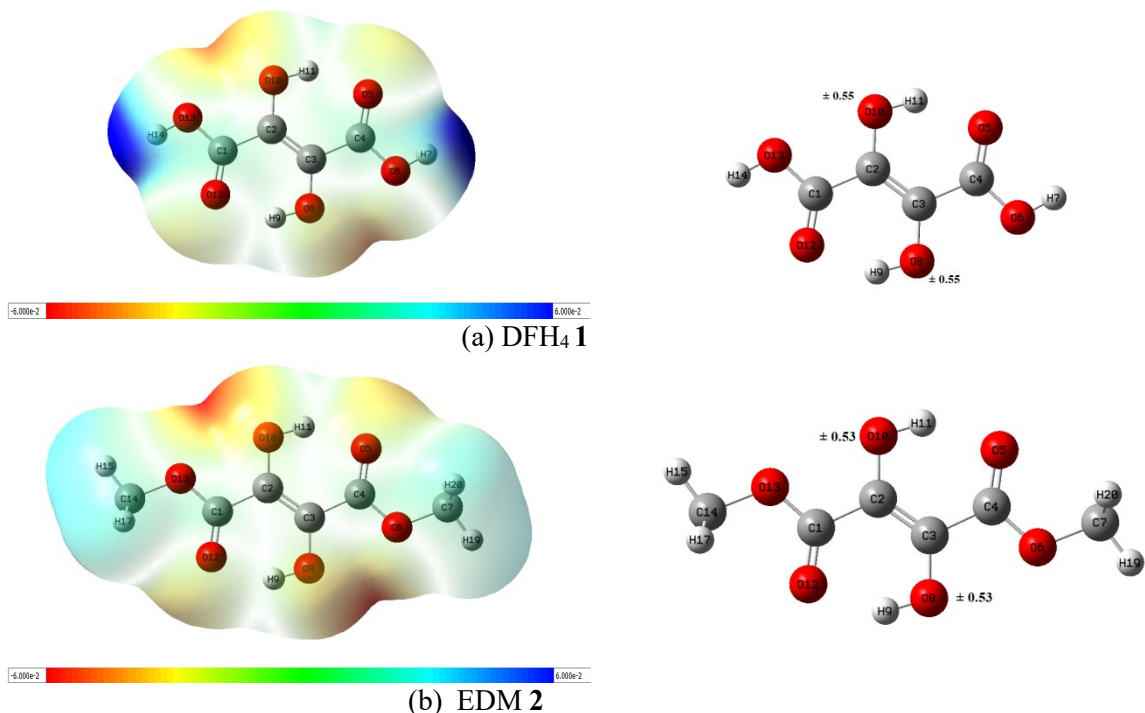


Fig. 4.7. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale DFH4 1 și EDM 2, în metanol

Tabelul 4.9 prezintă valorile descriptorului dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleofilice P_k^- , și indicele local al diferenței de reactivitate R_k pe atomii esterului EDM 2, calculate în vid, în apă și metanol.

Tabelul 4.9. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleofice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de EDM 2, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-7.4	-7.1	-14.0	19.4	18.3	15.6	-2.8	-2.5	0.9	-0.34	-0.91	-0.85
2 C	4.2	4.3	-23.4	12.6	14.5	13.5	23.1	23.7	21.3	±0.35	-0.57	-0.45
3 C	4.2	4.2	-23.4	12.6	14.5	13.5	23.1	23.6	21.3	±0.35	-0.57	-0.45
4 C	-7.4	-7.1	-14.0	19.4	18.2	15.6	-2.8	-2.5	0.9	-0.34	-0.91	-0.85
5 O	-4.1	-4.6	-16.1	12.7	11.4	11.7	4.4	4.2	3.7	-0.23	-0.83	-0.76
6 O	-1.6	-2.5	-8.0	2.6	3.4	4.9	0.6	0.5	0.3	±0.15	-0.43	-0.39
7 C	-0.4	-0.7	-3.0	-0.3	-0.4	0.1	0.0	0.0	0.1	±0.09	-0.15	-0.13
8 O	9.2	10.3	-22.8	2.8	2.7	3.7	25.2	24.7	22.9	±0.38	±0.49	±0.53
10 O	9.2	10.3	-22.8	2.8	2.6	3.7	25.2	24.7	22.9	±0.38	±0.49	±0.53
12 O	-4.1	-4.6	-16.0	12.7	11.4	11.7	4.4	4.2	3.7	-0.23	-0.82	-0.76
13 O	-1.6	-2.5	-8.0	2.6	3.4	4.9	0.6	0.5	0.3	±0.15	-0.43	-0.39
14 C	-0.4	-0.7	-3.0	-0.3	-0.4	0.1	0.0	0.0	0.1	0	-0.15	-0.13

În general, rezultatele prezintă un tablou asemănător celui în cazul DHF₄, dar cu prezența mai multor situsuri ambifilice în fază gazoasă. În apă și metanol, totuși, situsurile atomice O8 și O10 sunt unicele locații ambifilice, cu R_k de ± 0.49 în apă și R_k de ± 0.53 în metanol, similare valorilor obținute în cazul DHF₄ în apă și metanol.

Aceste rezultate oferă o bună explicație a activității antioxidante/antiradicale ridicate a DHF₄ **1** și EDM **2**, raportate în capitolul precedent, față de radicalul DPPH• și cationul radicalul ABTS^{•+}. Reactivitatea puternică a fragmentului ene-diolic, cu cei doi oxigeni hidroxilici ambifili, asigură transferul electronului (și a atomului de hidrogen) spre speciile radicale reactive, inactivându-le.

Tabelul 4.10 prezintă valorile descriptorului dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleofilice P_k^- , și indicele local al diferenței de reactivitate R_k pe atomii moleculei de anilidă **5**, calculate în vid, în apă și metanol. Deși valoarea descriptorului dual sugerează că C1 și C4 vor fi situsurile preferate pentru atacul electrofilic, funcția P_k^+ indică că situsurile C1 și C4 vor fi preferate pentru atacul nucleofilic, în timp ce descriptorul P_k^- sugerează că C3 va fi favorizat pentru atacul electrofilic, fiind urmat de C21 și O8 pentru apă. În metanol tabloul este similar.

Tabelul 4.10. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleofilice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de anilidă **5, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară**

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-6.11	-6.40	-11.1	18.35	17.87	14.5	-3.80	-4.11	-0.8	-0.28	-0.76	-0.70
2 C	-0.20	-0.68	-17.2	8.20	12.90	12.2	10.45	10.33	11.7	± 0.23	-0.61	-0.48
3 C	1.11	0.65	-18.2	12.97	13.68	12.7	16.54	20.43	17.5	± 0.26	-0.57	-0.44
4 C	-6.44	-7.28	-12.3	16.25	17.17	14.5	-1.76	-1.83	1.0	-0.30	-0.86	-0.76
5 O	-4.25	-5.50	-13.6	10.91	10.65	10.9	3.21	3.65	3.3	-0.23	-0.78	-0.69
6 O	-2.10	-3.03	-6.8	2.39	3.15	4.6	0.42	0.56	0.4	-0.11	-0.41	-0.36
7 C	-0.70	-0.92	-2.5	-0.30	-0.33	0.1	-0.02	-0.05	0.0	0	-0.14	-0.11
8 O	4.83	5.66	-17.4	3.06	2.58	3.6	16.88	17.68	17.7	± 0.28	± 0.41	± 0.44
10 O	1.36	2.24	-13.6	1.79	2.29	3.2	7.62	8.78	9.4	± 0.20	-0.30	± 0.36
12 O	-4.83	-5.31	-11.8	13.22	11.02	11.4	-3.77	-3.69	-3.3	-0.24	-0.72	-0.66
13 N	2.58	1.95	-9.6	-1.90	1.49	3.5	17.13	17.05	12.0	± 0.15	-0.22	± 0.26
14 C	3.11	3.31	-5.3	3.46	-0.21	0.9	9.69	7.03	6.3	0	± 0.11	± 0.12
19 C	2.11	2.15	-6.1	3.40	3.55	2.2	8.70	8.10	5.6	± 0.11	± 0.16	± 0.16
20 C	1.13	1.86	-4.2	-1.21	-1.79	-0.3	-4.53	-4.09	0.1	± 0.12	± 0.10	± 0.10
21 C	2.86	3.93	-8.9	8.46	5.13	3.1	21.96	18.95	10.9	± 0.24	± 0.21	± 0.22
22 C	1.16	1.70	-4.1	-1.64	-1.61	-0.2	-4.07	-4.72	-0.1	± 0.13	± 0.10	± 0.10
23 C	1.67	2.37	-6.1	3.63	3.21	2.1	8.42	8.83	5.9	± 0.13	± 0.15	± 0.15

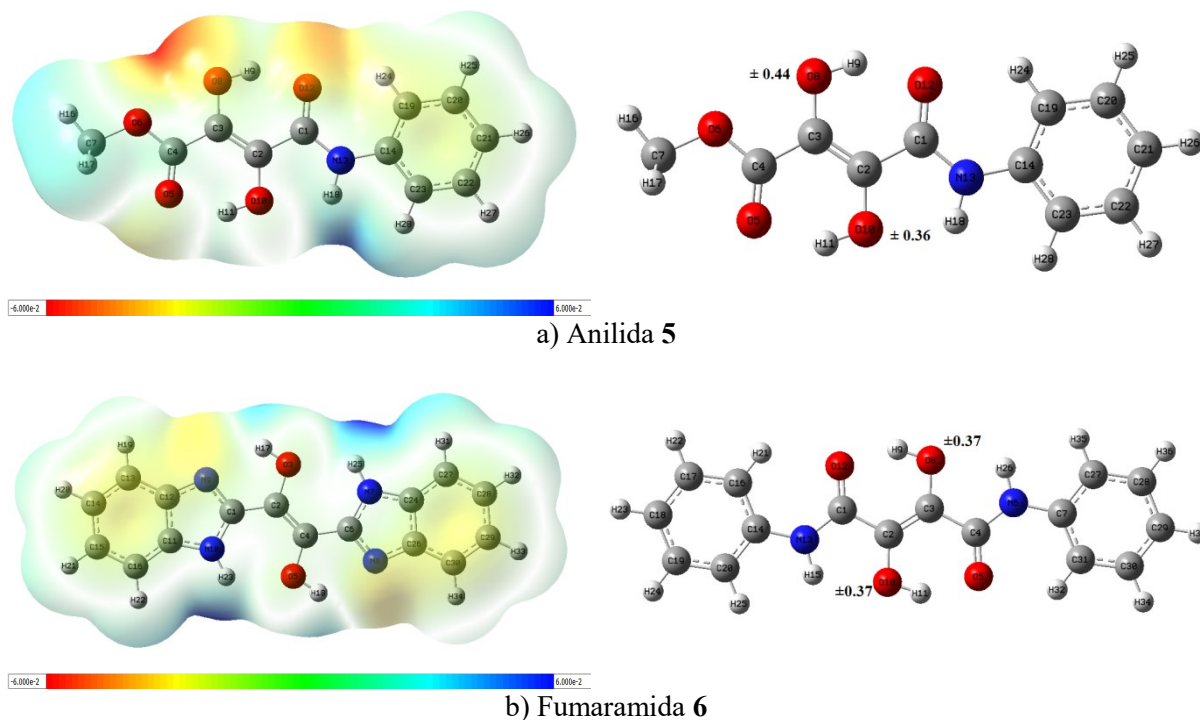


Fig. 4.8. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale anilidei 5 și fumaramidei 6, în metanol

Harta MEP a anilidei 5 (Figura 4.8a) confirmă că regiunea pe C1 și C4 este încărcată pozitiv, regiunea deasupra O8 este negativă, iar regiunea asupra O10 este foarte aproape de neutru.

Indicele local al diferenței de reactivitate R_k indică asupra faptului că în vid există două situsuri ambifilice practic echivalente, O8 ($R_k = \pm 0.28$) și C3 ($R_k = \pm 0.26$); în apă cel mai important atom cu reacție ambifilică este O8 ($R_k = \pm 0.41$), iar în metanol există două situsuri ambifilice, O8 ($R_k = \pm 0.44$) și O10 ($R_k = \pm 0.36$).

Tabelul 4.11 prezintă valorile descriptorului dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleofilice P_k^- , și indicele local al diferenței de reactivitate R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 6, calculate în vid, apă și metanol. Valoarea descriptorului dual sugerează că C2 și C3 vor fi situsurile preferate pentru atacul electrofilic în vid ($f_k^{(2)} = -10.5$) și în metanol ($f_k^{(2)} = -16.7$), iar în apă - situsurile C1 și C4 ($f_k^{(2)} = -27.0$).

Funcția P_k^+ indică că situsurile C1 și C4 vor fi preferate pentru atacul nucleofilic în toate mediile cercetate, în timp ce descriptorul P_k^- sugerează că C2 și C3 vor fi favorizate pentru atacul electrofilic, fiind urmat de O8 și O10.

Tabelul 4.11. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 6, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-7.5	-27.0	-10.0	12.9	13.6	13.6	-0.4	-0.4	-0.4	-0.27	-0.69	-0.67
2 C	-10.5	-20.8	-16.7	9.5	11.7	11.5	9.6	15.1	14.9	±0.21	-4.42	-0.39
3 C	-10.5	-20.8	-16.7	9.5	11.7	11.5	9.6	15.2	14.9	±0.21	-4.42	-0.39
4 C	-7.5	-27.0	-10.0	12.9	13.6	13.6	-0.4	-0.4	-0.4	-0.27	-0.69	-0.67
5 O	-9.2	-23.9	-10.5	11.5	10.5	10.6	-2.4	-2.1	-2.3	-0.24	-0.65	-0.63
6 N	-6.4	-12.2	-7.5	1.6	3.3	3.2	9.3	7.7	8.0	±0.12	-0.2	-0.19
7 C	-3.1	0.0	-3.3	2.2	0.8	0.8	5.8	3.2	3.2	0	0	0
8 O	-9.7	-18.6	-13.9	2.8	3.1	3.1	7.3	12.4	12.1	±0.19	±0.38	±0.37
10 O	-9.7	-18.6	-13.9	2.8	3.1	3.1	7.3	12.5	12.1	±0.19	±0.38	±0.37
12 O	-9.2	-23.9	-10.4	11.5	10.5	10.6	-2.4	-2.1	-2.2	-0.24	-0.64	-0.62
13 N	-6.4	-12.2	-7.5	1.6	3.3	3.3	9.3	7.7	8.0	±0.12	-0.2	-0.19
14 C	-3.1	0.0	-3.3	2.2	0.8	0.8	5.8	3.1	3.2	0	0	0
16 C	-4.5	0.0	-4.5	2.1	2.0	2.0	4.8	3.4	3.6	0	0	0
17 C	-5.0	0.0	-3.0	0.2	-0.3	-0.3	0.0	-0.1	-0.3	0	0	0
18 C	-10.1	-19.4	-6.3	4.1	2.9	2.9	9.8	6.1	6.4	±0.19	±0.17	±0.18
19 C	-5.4	-10.5	-3.0	0.1	-0.2	-0.2	0.2	-0.2	-0.3	-0.10	0	0
20 C	-5.2	0.0	-4.4	2.2	1.9	1.9	4.6	3.5	3.7	0	0	0
27 C	-5.2	0.0	-4.4	2.2	1.9	1.9	4.6	3.5	3.7	0	0	0
28 C	-5.4	-10.5	-3.0	0.1	-0.2	-0.2	0.2	-0.2	-0.3	±0.10	0	0
29 C	-10.1	-19.4	-6.3	4.1	2.9	2.9	9.8	6.1	6.5	-0.19	±0.17	±0.18
30 C	-5.0	0.0	-3.0	0.2	-0.3	-0.3	0.0	-0.1	-0.3	0	0	0
31 C	-4.5	0.0	-4.5	2.1	2.0	2.0	4.8	3.4	3.6	0	0	0

Harta MEP a fumaramidei 6 (Figura 4.8b) confirmă că regiunea pe O8 și O10 este practic neutră. Indicele local al diferenței de reactivitate R_k indică asupra faptului că în vid situsurile ambifilice cu cea mai mare magnitudine sunt C2, C3 ($R_k = \pm 0.21$), urmate de O8 și O10 ($R_k = \pm 0.19$), iar în apă și metanol O8 și O10 sunt cele mai importante locuri cu reactivitate ambifilică ($R_k = \pm 0.38$ în apă și $R_k = \pm 0.37$ în metanol).

Tabelele 4.12 și 4.13 prezintă valorile descriptorului dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleofilice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculelor derivaților *mono-* MBD 12 și *bis-* BBD 13 benzimidazolici ai DHF₄, respectiv, calculate în vid, în apă și în metanol.

Pentru MBD 12, valorile descriptorului dual prezentate în Tabelul 4.12 arată că în faza gazoasă, pentru atacuri electrofile va fi preferat situsul O8 ($f_k^{(2)} = -17.2$), iar în apă - situsul C4 ($f_k^{(2)} = -18.5$).

Tabelul 4.12. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de MBD 12, calculate în vacuo, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-7.5	-8.9	-8.9	8.3	8.2	8.5	7.7	4.7	4.6	±0.15	-0.35	-0.34
2 C	-12.0	-16.5	-16.4	16.7	16.3	15.9	0.8	4.8	4.9	-0.23	-0.60	-0.56
3 O	-10.2	-12.0	-11.9	4.7	4.2	4.2	1.0	4.1	4.1	±0.20	-0.28	-0.26
4 C	-14.0	-18.5	-18.4	7.6	9.7	9.8	23.3	25.2	25.2	±0.26	±0.52	±0.51
5 O	-10.6	-13.7	-13.7	1.3	2.0	2.0	12.3	15.4	15.5	±0.20	±0.34	±0.34
6 C	-12.0	-13.7	-13.6	15.1	15.4	15.1	2.0	2.2	2.2	-0.29	-0.79	-0.75
7 O	-7.1	-7.4	-7.3	3.3	3.9	3.9	0.7	1.1	1.1	-0.11	-0.36	-0.34
8 O	-17.2	-16.1	-16.1	12.4	11.8	11.6	6.2	5.1	5.1	-0.24	-0.76	-0.72
9 N	-11.9	-12.1	-12.1	9.1	9.4	9.3	5.6	5.1	5.1	±0.24	-0.39	-0.37
10 N	-4.5	-5.8	-5.8	4.3	4.9	4.9	-0.9	-0.1	-0.1	0	-0.23	-0.22
11 C	-6.3	-7.0	-7.0	0.1	0.3	0.2	9.7	8.7	8.6	0	±0.18	±0.17
12 C	-6.8	-7.0	-6.9	-0.6	-0.6	-0.6	10.1	7.9	7.8	0.11	±0.17	±0.17
13 C	-9.0	-7.4	-7.5	6.7	5.3	5.5	4.2	2.2	2.3	±0.18	-0.23	-0.22
14 C	-9.0	-7.3	-7.3	0.5	0.8	0.8	2.8	3.7	3.6	±0.17	±0.20	±0.20
15 C	-13.4	-10.2	-10.2	5.0	4.0	4.1	15.0	10.5	10.4	±0.26	±0.28	±0.28
16 C	-7.4	-6.2	-6.3	3.9	3.0	3.3	-1.8	-1.7	-1.7	±0.15	-0.21	-0.20

Valorile calculate ale funcțiilor Parr indică asupra faptului că C2 este situsul preferat pentru atacurile nucleoflice atât în gaz ($P_k^+ = 16.7$) cât și în apă ($P_k^+ = 16.3$), urmat de C6 ($P_k^+ = 16.7$ în gaz și $P_k^+ = 16.7$ în apă), deși valorile descriptorului dual arată o afinitate față de electrofilii a acestor regiuni. Locurile favorizate pentru atacurile electrofilice vor fi C4, atât în gaz ($P_k^- = 23.3$) cât și în apă ($P_k^- = 25.2$), urmat de C15 ($P_k^- = 15.0$) și O5 ($P_k^- = 12.3$) în gaz, și de O5 ($P_k^- = 15.4$) și C15 ($P_k^- = 10.5$) în apă, și în acest caz, rezultatele date de P_k^- sunt în concordanță cu descriptorul dual.

Indicele local al diferenței de reactivitate R_k (Tabelul 4.12) sugerează că atât în gaz cât și în solvenți, există câteva situsuri ambifilice cu magnitudinea până la ± 0.30 , și un număr mai mare de situsuri nucleoflice. Două cele mai importante situsuri ambifilice sunt C4 (R_k de ± 0.52 în apă și de ± 0.51 în metanol) și O5 (R_k de ± 0.34 în apă și metanol), fiind cele mai active situsuri pentru atacurile nucleoflice.

Harta MEP a derivatului MBD 12 (Figura 4.9a) confirmă că regiunea pe C4 și O5 este puțin pozitivă, foarte aproape de valori neutre, sugerând că aceste situsuri ar putea fi favorizate în atacuri de electrofilii (neutri sau pozitivi) și nucleofili (neutri sau negativi).

Pentru BBD 13, valorile descriptorului dual prezentate în Tabelul 4.13 arată că atât în faza gazoasă cât și în apă, pentru atacuri electrofile vor fi preferate situsurile C2 și C4 ($f_k^{(2)} =$

-11.2 în gaz și -15.3 în apă). Valorile calculate ale funcțiilor Parr indică asupra faptului că C2 și C4 vor fi preferate pentru atacurile nucleofilice atât în gaz ($P_k^+ = 10.4$) cât și în apă ($P_k^+ = 11.4$), și aceleași situsuri vor fi favorizate pentru atacurile electrophilice ($P_k^- = 12.8$ în gaz și $P_k^- = 15.3$ în apă).

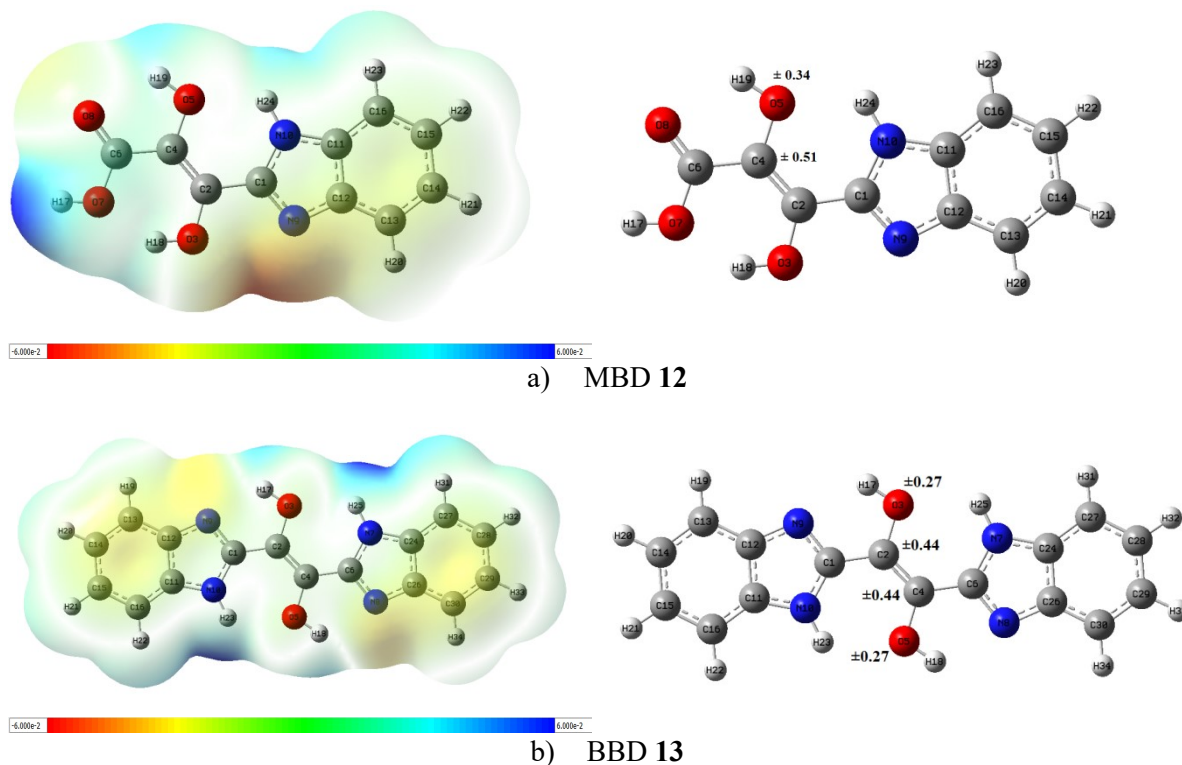


Fig. 4.9. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale MBD 12 și BBD 13, în metanol

Indicele local al diferenței de reactivitate R_k (Tabelul 4.13) aduce o explicație a rezultatelor anterioare, căci anume C2 și C4 sunt două cele mai importante situsuri ambifilice, cu valorile R_k de ± 0.22 în gaz, ± 0.44 în apă și metanol, fiind de asemenea cele mai active situsuri pentru atacurile nucleofile atât în gaz cât și în solvenți.

Harta MEP a derivatului BBD 13 (Figura 4.9b) confirmă că regiunea pe C4, C4, O3 și O5 este foarte aproape de valori neutre, sugerând că aceste situsuri ar putea fi favorizate în atacuri de electrofili (neutri sau pozitivi) și nucleofili (neutri sau negativi).

Mai sus au fost arătate rezultatele calculelor pentru compușii care au demonstrat activitate antioxidantă față de radicalii DPPH \cdot și ABTS $^{+\cdot}$. După cum s-a menționat în capitolul anterior, un șir de derivați obținuți nu au exercitat activitate antiradicalică în testul cu DPPH \cdot (compușii 7, 8, 9, 10, 11) însă unii dintre ei, și anume derivații 7, 8, 9 au avut un efect oarecum

mai semnificativ în testul cu ABTS⁺. Din acest motiv cercetarea indicatorilor de reactivitate locală a acestor derivați de asemenea prezintă interes, în special pentru a face posibilă o comparație cu derivații descriși mai sus.

Tabelul 4.13. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de BBD 13, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom		$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
		Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1	C	-4.9	-7.0	-7.0	9.4	9.2	9.1	1.4	0.7	0.7	±0.10	-0.36	-0.39
2	C	-11.2	-15.3	-15.5	10.4	11.4	11.3	12.8	15.3	15.3	±0.22	±0.44	±0.44
3	O	-8.0	-10.0	-10.3	2.3	2.4	2.4	6.0	8.1	8.2	±0.16	±0.27	±0.27
4	C	-11.2	-15.3	-15.5	10.4	11.4	11.3	12.8	15.3	15.3	±0.22	±0.44	±0.44
5	O	-8.0	-10.0	-10.3	2.3	2.4	2.4	6.0	8.1	8.2	±0.16	±0.27	±0.27
6	C	-4.9	-7.0	-7.0	9.4	9.2	9.1	1.4	0.7	0.7	-0.13	-0.36	-0.39
7	N	-4.0	-5.3	-5.2	4.0	4.6	4.5	0.7	1.0	1.0	0	-0.19	-0.21
8	N	-9.0	-10.3	-9.9	7.6	8.4	8.3	5.9	5.9	5.9	±0.18	-0.32	-0.32
9	N	-9.0	-10.3	-9.9	7.6	8.4	8.3	5.9	5.9	5.9	±0.18	-0.32	-0.32
10	N	-4.0	-5.3	-5.2	4.0	4.6	4.5	0.7	1.0	1.0	0	-0.19	-0.21
11	C	-4.4	-4.9	-4.9	-0.1	0.1	0.1	6.4	5.4	5.4	0	±0.13	±0.13
12	C	-4.2	-4.6	-4.7	-0.3	-0.5	-0.4	5.2	4.0	4.0	0	±0.12	±0.12
13	C	-7.0	-5.9	-6.2	6.2	5.3	5.4	2.0	1.7	1.8	±0.14	-0.20	-0.24
14	C	-7.2	-5.3	-5.6	0.7	0.8	0.8	2.4	2.1	2.1	±0.14	±0.15	-0.13
15	C	-9.7	-7.2	-7.5	4.3	3.8	3.8	7.7	5.8	5.8	±0.19	±0.21	-0.17
16	C	-5.9	-5.0	-5.2	4.0	3.2	3.3	-1.3	-0.9	-0.9	±0.12	-0.18	-0.22
24	C	-4.4	-4.9	-4.9	-0.1	0.1	0.1	6.4	5.4	5.4	0	±0.13	±0.13
26	C	-4.2	-4.6	-4.7	-0.3	-0.5	-0.4	5.2	4.0	4.0	0	±0.12	±0.12
27	C	-5.9	-5.0	-5.2	4.0	3.2	3.3	-1.3	-0.9	-0.9	0	-0.18	-0.22
28	C	-9.7	-7.2	-7.5	4.3	3.8	3.8	7.7	5.8	5.8	±0.19	±0.21	-0.17
29	C	-7.2	-5.3	-5.6	0.7	0.8	0.8	2.4	2.1	2.1	±0.14	±0.15	-0.13
30	C	-7.0	-5.9	-6.2	6.2	5.3	5.4	2.0	1.7	1.8	±0.14	-0.20	-0.24

Tabelul 4.14 prezintă descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilică P_k^+ și nucleofilică P_k^- , precum și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii fumaramidei MEAD 7, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. În general, rezultatele arată aceleași situsuri reactive ca și pentru ceilalți derivați cercetați. Există totuși o diferență ce ține de reactivitatea mărită a situsurilor C2 și C3, care întrece reactivitatea celor doi atomi de oxigen din grupurile hidroxilice atașate legăturii duble centrale. Conform valorilor indicelui R_k , situsurile C2 și C3 sunt preferate pentru atacurile electrofile și nucleofile în faza gazoasă (R_k de ± 0.32) și în apă (R_k de ± 0.55), fiind urmați de O9 în vid (R_k de ± 0.31), iar în apă de O7 și O9 (R_k de ± 0.42). În metanol, cele mai importante situsuri ambifilice sunt C1 și C2 (R_k de ± 0.58), urmați de O7 și O9 (R_k de ± 0.46). Harta MEP a fumaramidei MEAD 7 (Figura 4.10a) confirmă că situsurile C2 și C3 sunt

foarte aproape de neutru, sugerând că aceste locuri ar putea fi, într-adevăr, atacate de electrofili (neutri sau pozitivi) și nucleofili (neutri sau negativi), în timp ce O7 și O9 sunt ușor negative.

Tabelul 4.14. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă MEAD 7, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-6.77	-6.26	-23.6	18.19	16.82	14.8	-2.99	-2.80	22.3	-0.25	-0.60	±0.58
2 C	3.34	4.21	-23.6	14.27	16.03	14.8	23.04	24.98	22.3	±0.32	±0.55	±0.58
3 C	3.34	4.21	-11.8	14.27	15.98	14.2	23.04	24.96	0.8	±0.32	±0.55	-0.57
4 C	-6.77	-6.27	-11.8	18.18	16.87	14.2	-2.99	-2.81	0.8	-0.25	-0.61	-0.57
5 O	-4.32	-4.22	-13.5	10.57	8.57	9.1	0.73	1.55	1.3	-0.16	-0.53	-0.50
6 O	-4.32	-4.21	-13.5	10.57	8.55	9.1	0.73	1.56	1.3	-0.16	-0.53	-0.50
7 O	7.33	9.71	-21.3	2.40	2.34	3.5	20.34	22.84	21.3	0.24	±0.42	±0.46
9 O	7.33	9.71	-21.3	2.40	2.34	3.5	20.34	22.83	21.3	±0.31	±0.42	±0.46
11 N	-0.90	-2.01	-8.4	3.86	6.11	6.6	5.35	3.80	2.7	±0.15	-0.31	-0.26
12 N	-0.90	-2.01	-8.4	3.86	6.10	6.6	5.34	3.78	2.7	±0.15	-0.31	-0.26
13 C	-0.13	-0.45	-2.3	-0.13	-0.39	0.4	-0.01	-0.19	0.2	0	0	0
15 C	0.18	-0.25	-1.2	0.25	0.51	0.5	0.56	0.36	0.3	0	0	0
18 C	-0.13	-0.45	-2.3	-0.13	-0.39	0.4	-0.01	-0.19	0.2	0	0	0
20 C	0.18	-0.24	-1.2	0.25	0.52	0.5	0.56	0.36	0.3	0	0	0
23 O	1.17	-0.17	-1.1	0.05	0.04	0.1	2.70	0.02	0.0	0	0	0
27 O	1.17	-0.17	-1.1	0.05	0.04	0.1	2.70	0.02	0.0	0	0	0

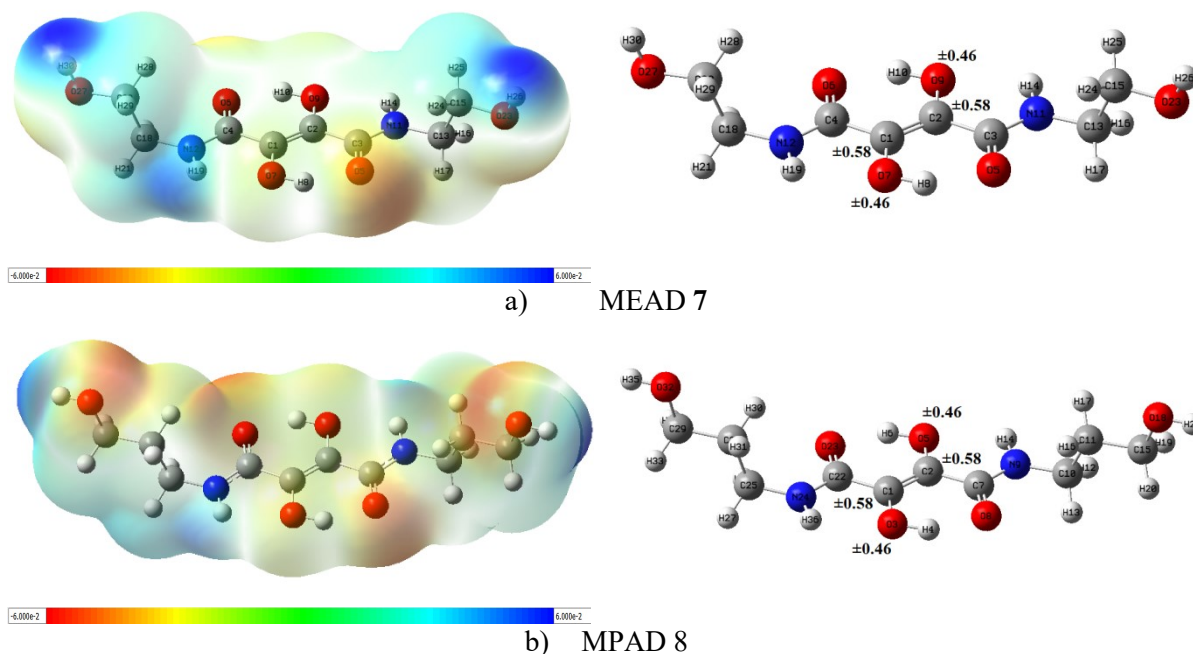


Fig. 4.10. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale MEAD 7 (a) și MPAD 8 (b), în metanol

Tabelul 4.15. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă MPAD 8, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f_k^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-17.6	-23.7	-23.4	13.6	14.9	14.6	19.0	22.3	22.2	±0.30	±0.58	±0.58
2 C	-17.6	-23.7	-23.4	13.6	14.9	14.6	19.0	22.3	22.2	±0.30	±0.58	±0.58
3 O	-17.3	-21.2	-21.1	3.4	3.5	3.5	17.8	21.2	21.2	0.23	±0.46	±0.46
5 O	-17.3	-21.2	-21.1	3.4	3.5	3.5	17.8	21.2	21.2	0.23	±0.46	±0.46
7 C	-9.1	-11.7	-11.7	14.7	14.0	14.2	0.5	0.7	0.7	-0.22	-0.57	-0.56
8 O	-12.4	-13.1	-13.2	10.5	8.9	9.0	0.2	1.1	1.1	-0.15	-0.49	-0.48
9 N	-8.3	-8.6	-8.7	5.2	6.8	6.9	3.9	3.1	3.2	±0.14	-0.27	-0.27
10 C	-2.4	-2.2	-2.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0	0	0
11 C	-1.2	-1.1	-1.1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0	0	0
15 C	-1.9	-0.6	-0.6	0.2	0.1	0.1	0.7	0.1	0.1	0	0	0
18 O	-4.7	-0.5	-0.5	0.1	0.0	0.0	4.9	0.0	0.0	0	0	0
22 C	-9.1	-11.7	-11.7	14.7	14.0	14.2	0.5	0.7	0.7	-0.22	-0.57	-0.56
23 O	-12.4	-13.1	-13.2	10.5	8.9	9.0	0.2	1.1	1.1	-0.15	-0.49	-0.48
24 N	-8.3	-8.6	-8.7	5.2	6.8	6.9	3.9	3.1	3.1	±0.14	-0.27	-0.27
25 C	-2.4	-2.2	-2.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3	0	0	0
26 C	-1.2	-1.1	-1.1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0	0	0
29 C	-1.9	-0.6	-0.6	0.2	0.1	0.1	0.7	0.1	0.1	0	0	0
32 O	-4.7	-0.5	-0.5	0.1	0.0	0.0	4.9	0.0	0.0	0	0	0

Tabelul 4.15 prezintă descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilică P_k^+ și nucleofilică P_k^- , precum și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii fumaramidei MPAD 8, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Siturile reactive sunt plasate pe atomii din fragmentul enediolic. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$ sugerează că situsurile C1, C2, O3 și O5 vor fi preferate pentru atacurile electrofile, fapt confirmat în totalitate de către valorile funcției P_k^- nucleofile, atât pentru faza gazoasă, cât și pentru apă și metanol. Funcția electrofilă P_k^+ arată că pentru atacurile nucleofile vor fi preferate situsurile C1, C2, C7 și C22. Indicele diferenței de reactivitate locală confirmă ambifilicitatea situsurilor C1, C2 ($R_k = \pm 0.58$) și O3, O5 ($R_k = \pm 0.46$).

Harta MEP a fumaramidei MPAD 8 (Figura 4.10b) confirmă că situsurile C2 și C3 sunt foarte aproape de neutru, sugerând că aceste locuri ar putea fi, într-adevăr, atacate de electrofilii (neutri sau pozitivi) și nucleofili (neutri sau negativi), în timp ce O3 și O5 sunt moderat negative.

Tabelul 4.16 prezintă descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilică P_k^+ și nucleofilică P_k^- , precum și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii fumaramidei 9, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Siturile reactive sunt plasate pe atomii din fragmentul enediolic. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$ sugerează că situsurile C1, C2, O3 și O4 vor fi preferate pentru atacurile

electrofile, fapt confirmat în totalitate de către valorile funcției P_k^- nucleofile, atât pentru faza gazoasă, cât și pentru apă și metanol.

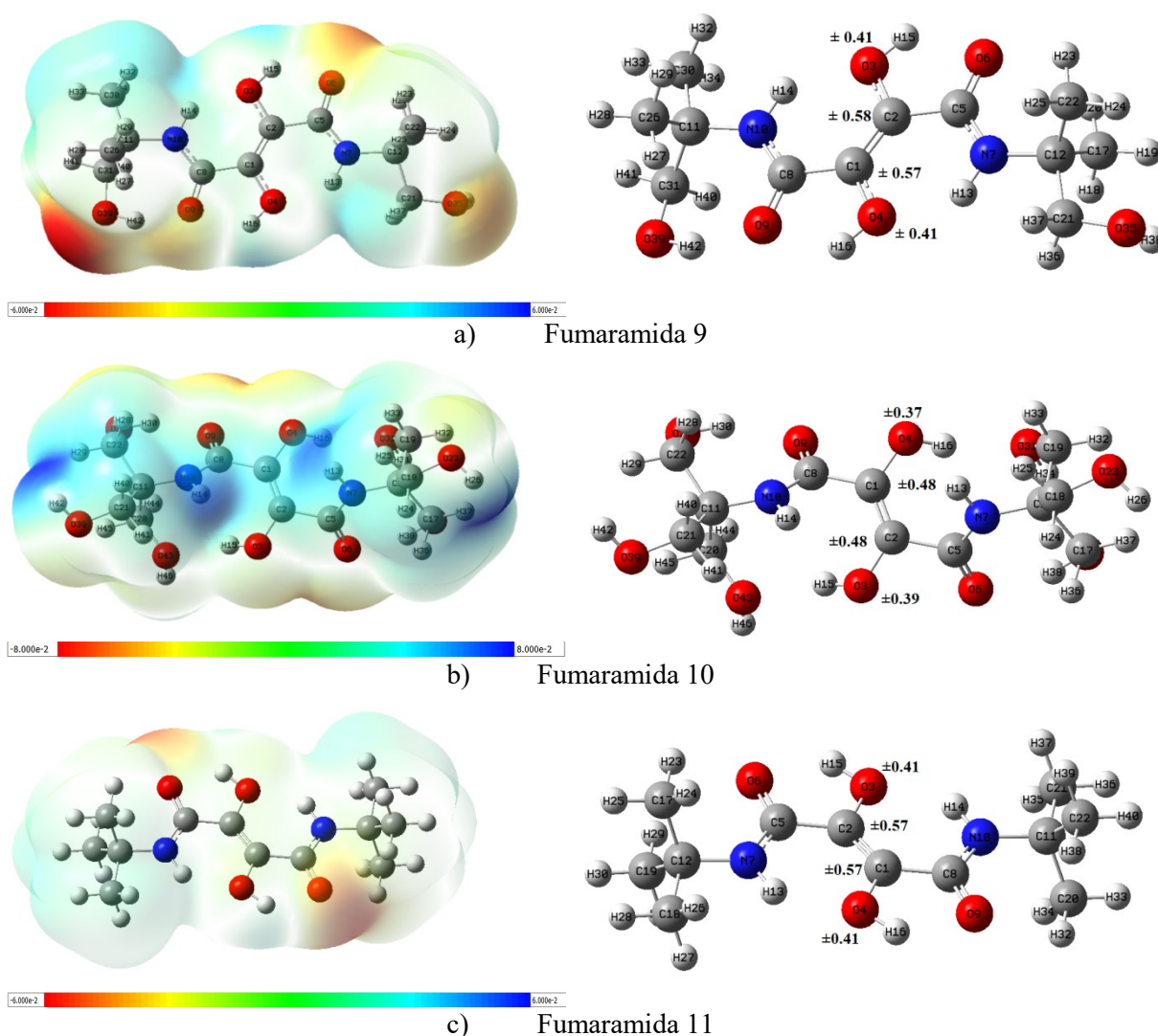


Fig. 4.11. Hărțile MEP (pe stânga) și indicele ambifilic R_k (pe dreapta) ale fumaramidelor 9 (a), 10 (b) și 11 (c), în metanol

Funcția electrofilă P_k^+ arată că pentru atacurile nucleofile vor fi preferate situsurile C2 și C8, în toate mediile cercetate. Indicele diferenței de reactivitate locală confirmă ambifilicitatea situsurilor C1 (R_k de ± 0.30 în gaz, ± 0.58 în apă, ± 0.57 în metanol), C2 (R_k de ± 0.31 în gaz, ± 0.60 în apă, ± 0.58 în metanol) și O3 (R_k de ± 0.25 în gaz, ± 0.42 în apă, ± 0.41 în metanol), O4 (R_k de ± 0.25 în gaz, ± 0.41 în apă și metanol).

Harta MEP a fumaramidei 9 (Figura 4.11a) confirmă că situsurile C1, C2 și O3, O4 sunt foarte aproape de neutru, sugerând că aceste locuri ar putea fi, într-adevăr, atacate de electrofili (neutri sau pozitivi) și nucleofili (neutri sau negativi).

Tabelul 4.16. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă **9, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară**

Atom		$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
		Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetO H	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1	C	-16.2	-23.7	-23.6	13.4	14.3	14.3	17.1	23.0	23.0	±0.30	±0.58	±0.57
2	C	-16.9	-24.0	-23.9	15.1	16.2	16.1	16.9	22.3	22.4	±0.31	±0.60	±0.58
3	O	-13.9	-19.2	-19.1	3.5	3.8	3.8	13.9	19.4	19.4	±0.25	±0.42	±0.41
4	O	-13.9	-19.1	-19.0	2.9	3.1	3.1	13.9	19.8	19.7	±0.25	±0.41	±0.41
5	C	-8.3	-10.9	-10.9	13.7	12.9	12.9	0.2	0.4	0.4	-0.26	-0.55	-0.53
6	O	-12.8	-12.8	-12.8	10.1	8.7	8.8	-2.4	-1.1	-1.2	-0.20	-0.50	-0.48
7	N	-8.3	-8.1	-8.1	5.3	6.4	6.3	8.8	5.7	5.7	±0.15	-0.24	-0.22
8	C	-8.9	-11.7	-11.6	15.4	14.7	14.7	0.0	0.4	0.4	-0.28	-0.60	-0.58
9	O	-11.3	-11.9	-12.0	9.9	8.8	8.8	-2.0	-1.2	-1.2	-0.22	-0.49	-0.47
10	N	-8.3	-8.8	-8.8	6.2	7.2	7.2	8.0	6.2	6.3	±0.16	-0.26	-0.25
11	C	-1.4	-1.2	-1.2	0.4	0.4	0.4	2.7	0.4	0.4	0	0	0
12	C	-0.7	-1.0	-1.0	0.3	0.3	0.3	0.8	0.3	0.3	0	0	0
17	C	-1.6	-1.1	-1.1	0.3	0.3	0.3	0.8	0.4	0.4	0	0	0
21	C	-0.6	-0.5	-0.5	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0	0	0
22	C	-1.7	-1.1	-1.1	0.3	0.3	0.3	0.9	0.4	0.4	0	0	0
26	C	-2.1	-1.2	-1.3	0.4	0.4	0.4	1.5	0.6	0.6	0	0	0
30	C	-1.5	-0.8	-0.8	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0	0	0
31	C	-2.5	-0.9	-0.9	0.2	0.3	0.3	2.2	0.4	0.4	0	0	0
35	O	-3.5	-1.0	-1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0	0
39	O	-10.0	-1.9	-1.9	0.0	0.0	0.0	12.1	0.3	0.3	0.19	0	0

Tabelul 4.17 prezintă descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilică P_k^+ și nucleofilică P_k^- , precum și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii fumaramidei **10**, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. În general, rezultatele arată aceleași situsuri reactive ca și pentru celelalte fumaramide MEAD **7**, MPAD **8** și fumaramida **9**. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$ sugerează că situsurile C1, C2, O3 și O4 vor fi preferate pentru atacurile electrofile, fapt confirmat în totalitate de către valorile funcției P_k^- nucleofile, atât pentru faza gazoasă, cât și pentru apă. Funcția electrofilă P_k^+ arată că pentru atacurile nucleofile vor fi preferate situsurile C2, C5 și C8, pentru toate mediile cercetate. Indicele diferenței de reactivitate locală confirmă ambifilicitatea situsurilor C1, C2 ($R_k = \pm 0.27$) și O3 ($R_k = \pm 0.24$) în gaz, și C1, C2 ($R_k = \pm 0.52$) și O3 ($R_k = \pm 0.42$), O4 ($R_k = \pm 0.41$) în apă, și C1, C2 ($R_k = \pm 0.48$) și O3 ($R_k = \pm 0.39$), O4 ($R_k = \pm 0.37$) în metanol.

Harta MEP a fumaramidei **10** (Figura 4.11b) confirmă că situsurile C1 și C2 sunt ușor pozitive, în timp ce O3 și O4 sunt ușor negative.

Tabelul 4.17. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 10, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-15.9	-22.6	-23.0	12.7	12.0	12.8	16.8	23.3	24.0	±0.27	±0.52	±0.48
2 C	-15.8	-22.4	-22.7	13.8	14.4	14.5	16.5	22.2	21.8	±0.27	±0.52	±0.48
3 O	-14.7	-20.5	-20.4	2.7	3.3	3.3	15.6	20.6	20.1	±0.24	±0.42	±0.39
4 O	-14.7	-20.4	-19.6	2.4	2.6	2.6	16.1	21.0	19.7	0.17	±0.41	±0.37
5 C	-8.4	-10.3	-10.5	15.3	14.6	14.2	0.9	0.8	0.9	-0.28	-0.54	-0.44
6 O	-13.7	-14.0	-14.1	11.1	9.4	9.4	3.2	3.0	2.7	-0.19	-0.48	-0.37
7 N	-6.2	-5.9	-5.9	4.1	5.2	5.2	3.7	1.0	1.6	±0.11	-0.24	-0.18
8 C	-8.5	-11.5	-11.3	14.1	15.4	14.7	0.9	0.9	1.1	-0.27	-0.59	-0.46
9 O	-12.9	-14.4	-14.7	11.3	10.2	10.0	0.7	2.0	2.9	-0.21	-0.52	-0.39
10 N	-6.3	-6.5	-6.2	4.0	5.6	5.5	5.0	2.0	1.7	±0.11	-0.24	-0.18
11 C	-1.1	-1.0	-1.0	0.9	0.9	0.9	1.5	0.2	0.1	0	0	0
12 C	-1.0	-1.1	-1.1	1.1	1.0	0.9	0.8	0.1	0.2	0	0	0
17 C	-1.1	-0.6	-0.6	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0	0	0
18 C	-1.3	-0.8	-0.9	0.2	0.1	0.2	0.5	0.0	0.1	0	0	0
19 C	-1.6	-1.0	-1.0	0.4	0.4	0.4	0.7	0.1	0.2	0	0	0
20 C	-1.7	-1.0	-0.9	0.3	0.4	0.4	1.0	0.2	0.2	0	0	0
21 C	-0.9	-0.6	-0.6	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0	0	0
22 C	-2.0	-0.8	-0.8	0.2	0.2	0.2	1.2	0.1	0.1	0	0	0
23 O	-3.7	-1.0	-1.1	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.1	0	0	0
27 O	-7.9	-1.9	-1.7	0.0	0.0	0.0	8.4	0.2	0.2	0	0	0
31 O	-1.2	-1.5	-1.2	0.3	0.3	0.3	0.6	0.0	0.0	0	0	0
35 O	-3.3	-1.6	-1.4	0.1	0.1	0.1	0.3	0.0	0.0	0	0	0
39 O	-3.4	-1.0	-1.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0	0	0
43 O	-0.4	-1.1	-0.8	0.3	0.2	0.2	0.7	0.0	0.0	0	0	0

Tabelul 4.18 prezintă descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilică P_k^+ și nucleofilică P_k^- , precum și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii fumaramidei 11, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. În general, rezultatele arată aceleași situsuri reactive ca și pentru celelalte fumaramide menționate anterior, având situsurile reactive plasate pe atomii din fragmentul enediolic, cu reactivitatea mărită pe atomii de carbon uniți prin legătura dublă. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$ sugerează că situsurile C1, C2, O3 și O4 vor fi preferate pentru atacurile electrofile, fapt confirmat în totalitate de către valorile funcției P_k^- nucleofile, atât pentru faza gazoasă, cât și pentru apă și metanol. Funcția electrofilă P_k^+ arată că pentru atacurile nucleofile vor fi preferate situsurile C1, C2, C5 și C8, atât pentru faza gazoasă, cât și pentru apă și metanol. Indicele diferenței de reactivitate locală confirmă ambifilicătatea situsurilor C1, C2 ($R_k = \pm 0.31$) în gaz, și C1, C2 ($R_k = \pm 0.44$ în apă, $R_k = \pm 0.57$ în metanol) și O3 și O4 ($R_k = \pm 0.34$ în apă, $R_k = \pm 0.41$ în metanol) în solvenți. Harta MEP a fumaramidei 11 (Figura 4.11c) confirmă că situsurile C1, C2, O3 și O4 sunt foarte apropiate de neutru.

Tabelul 4.18. Descriptorul dual $f_k^{(2)}$, funcțiile Parr electrofilice P_k^+ și nucleoflice P_k^- , și indicele diferenței de reactivitate locală R_k pe atomii moleculei de fumaramidă 11, calculate *in vacuo*, în apă și metanol. Valorile reale ale $f^{(2)}(\vec{r})$, P_k^+ și P_k^- au fost înmulțite cu 100 pentru o comparație mai ușoară

Atom	$f_k^{(2)}$			P_k^+			P_k^-			R_k		
	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH	Vid	Apă	MetOH
1 C	-18.3	-18.3	-23.9	14.4	14.4	15.3	20.2	20.2	22.9	±0.31	±0.44	±0.57
2 C	-18.3	-18.3	-23.9	14.4	14.4	15.3	20.2	20.2	22.9	±0.31	±0.44	±0.57
3 O	-15.5	-15.5	-19.2	3.2	3.2	3.5	16.4	16.4	19.5	0.19	±0.34	±0.41
4 O	-15.5	-15.5	-19.2	3.2	3.2	3.5	16.4	16.4	19.5	0.19	±0.34	±0.41
5 C	-8.7	-8.7	-11.2	14.4	14.4	13.6	0.2	0.2	0.4	-0.23	-0.49	-0.52
6 O	-13.5	-13.5	-13.0	10.3	10.3	9.0	-3.1	-3.1	-1.2	±0.23	-0.45	-0.46
7 N	-9.3	-9.3	-8.5	5.5	5.5	6.7	11.3	11.3	6.0	±0.16	±0.23	-0.21
8 C	-8.7	-8.7	-11.2	14.4	14.4	13.6	0.2	0.2	0.4	-0.23	-0.49	-0.52
9 O	-13.5	-13.5	-13.0	10.3	10.3	9.0	-3.1	-3.1	-1.2	±0.23	-0.45	-0.46
10 N	-9.3	-9.3	-8.5	5.5	5.5	6.7	11.3	11.3	6.0	±0.16	±0.23	-0.21
11 C	-0.8	-0.8	-1.1	0.3	0.3	0.3	1.0	1.0	0.4	0	0	0
12 C	-0.8	-0.8	-1.1	0.3	0.3	0.3	1.0	1.0	0.4	0	0	0
17 C	-1.9	-1.9	-1.2	0.4	0.4	0.4	1.1	1.1	0.5	0	0	0
18 C	-1.2	-1.2	-0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0	0	0
19 C	-1.9	-1.9	-1.1	0.4	0.4	0.3	1.1	1.1	0.4	0	0	0
20 C	-1.9	-1.9	-1.1	0.4	0.4	0.3	1.1	1.1	0.4	0	0	0
21 C	-1.2	-1.2	-0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0	0	0
22 C	-1.9	-1.9	-1.2	0.4	0.4	0.4	1.1	1.1	0.5	0	0	0

4.6. Compușii cercetați prin prisma teoriei orbitalilor moleculari de frontieră

Un puternic model practic pentru descrierea reactivității chimice este teoria orbitalilor moleculari de frontieră (frontier molecular orbital theory - FMO), propusă de Kenichi Fukui în anii 1950. Aspectul central al teoriei electronilor de frontieră este importanța cu care tratează cei mai înalți orbitali moleculari ocupați (HOMO) și orbitalii neocupați situați cel mai jos (LUMO).

Este bine cunoscut faptul că energia electronilor determină comportamentul moleculei, și anume nivelurile energetice populate contribuie la energia și comportamentul moleculei. Celelalte niveluri energetice sunt doar posibilități.

Orbitalii neocupați sunt luați în considerație doar în cazuri speciale, de exemplu atunci când se analizează adăugarea de electroni suplimentari structurii. Acest lucru se poate întâmpla în timpul unei reacții de reducere, de exemplu. În acest caz, următorul nivel energetic (LUMO) poate fi un loc rezonabil pentru amplasarea acestui electron. Astfel, un electron suplimentar adăugat moleculei ar putea avea energia și ar putea fi situat în zona spațiului descrisă de acest orbital.

Desigur, această descriere poate fi o aproximare, căci odată cu adăugarea unui alt electron, forțele de respingere și de atracție sunt modificate în interiorul moleculei, astfel încât

energiile tuturor electronilor trebuie să se ajusteze. Cu toate acestea, LUMO este o bună primă presupunere despre unde ar ajunge un electron suplimentar și care ar fi energia acestuia.

Pentru cazul când analizăm posibilitatea moleculei de a dona un electron (sau o pereche de electroni) într-o reacție, în mod frecvent electronii provin din orbitalul molecular cel mai înalt ocupat (HOMO). Acești electroni sunt adesea cei mai reactivi, atât datorită energiei lor ridicate, cât și a locației lor accesibile, situându-se de regulă mai departe de nucleu sau pe marginea moleculei.

Orbitalii HOMO și LUMO sunt numiți împreună orbitali de frontieră, deoarece se află la marginea orbitalilor reali, ocupați, și a celor imaginari, neocupați. Orbitalii de frontieră sunt adesea cercetați atunci când se încearcă înțelegerea reacțiilor, și vor fi analizați în continuare, luând în considerație informația prezentată în subcapitolele anterioare.

Figura 4.12 prezintă unii orbitalii de frontieră și energetica acestora, pentru acidul DFH₄ **1**, anionul acidului **1** cu hidrogenul din poziția *anti*- disociat și anionul acidului **1** cu hidrogenul din poziția *syn*- disociat.

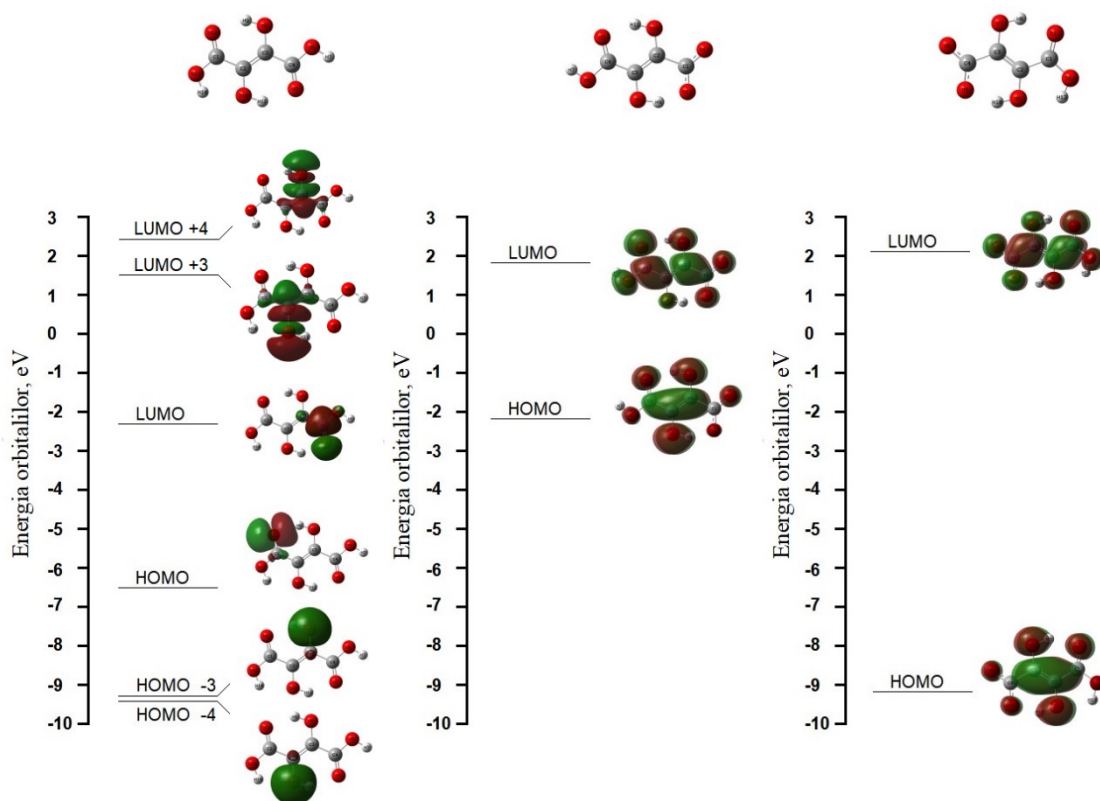


Fig. 4.12. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră ai izomerului E2 (stânga) al acidului DFH₄, anionul cu hidrogenul din poziția *anti*-disociat (centru) și anionul cu hidrogenul din poziția *syn*-disociat (dreapta)

Pentru reprezentare grafică au fost aleși orbitalii moleculari HOMO și LUMO, precum și orbitalii care caracterizează ambifilicitatea situsurilor atomice O8 și O10 (R_k de ± 0.51 și 0.48 , respectiv, în apă), redate de indicele diferenței de reactivitate locală R_k calculat în subcapitolul anterior pentru izomerul E2 al acidului DFH₄. Observăm astfel că pentru molecula nedisociată de DFH₄ **1**, situsurile atomice ambifile O8 și O10, se află pe nivelele energetice HOMO -3 și HOMO -4, și pe nivele LUMO +3 și LUMO +4. Pentru comparație au fost efectuate calcule ale speciilor anionice ale acidului DFH₄, un anion având hidrogenul din poziția *anti*- disociat și al doilea anion având hidrogenul din poziția *syn*- disociat. Rezultatele demonstrează că pentru formele anionice ale DFH₄, situsurile atomice ambifile O8 și O10 se află pe nivelele HOMO și LUMO (Figura 4.12), iar energia orbitalilor (Tabelul 4.19) sugerează că cea mai activă specie în transferul de electroni va fi anionul având hidrogenul din poziția *anti*- disociat, cu energia orbitalilor HOMO de -2.16 eV, față de -6.50 eV pentru acidul nedisociat și -9.12 eV pentru celălalt anion.

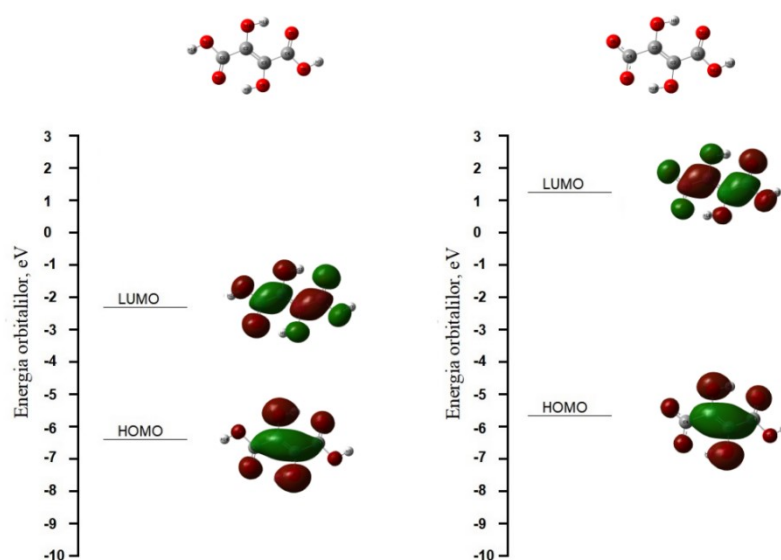


Fig. 4.13. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră ai izomerului E3 (stânga) al acidului DFH₄ și anionul respectiv

Pentru calculele efectuate în metanol s-a utilizat geometria izomerului E3 al DFH₄, care este cel mai abundent izomer în acest solvent. În cazul izomerului 3 și a anionului acestuia, orbitalii moleculari responsabili pentru ambifilicitatea situsurilor atomice O8 și O10 se află pe nivele HOMO și LUMO (Figura 4.13). Se observă că anionul izomerului E3 are energetica orbitalilor HOMO mai joasă decât izomerul protonat, -5.67 eV față de -6.32 eV, respectiv, sugerând că anionul poate dona mai ușor electroni (Tabelul 4.19).

Figura 4.14a prezintă orbitalii moleculari de frontieră HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10, pentru esterul EDM 2. Situsurile atomice ambifile O8 și O10 se află pe nivelele energetice HOMO -3 și HOMO -4, în limitele -8.76 eV și -8.79 eV pentru apă și metanol, și pe nivelele LUMO +5 și LUMO +6, în limitele -2.63 eV și -2.92 eV pentru apă și metanol (Tabelul 4.20).

Figura 4.14b prezintă orbitalii moleculari de frontieră HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsului O8 pentru anilida 5. Pentru molecula anilidei 5, situsul atomic ambifilic O8 se află pe nivelele energetice HOMO -7 și LUMO +8. Rezultatele demonstrează că energetica orbitalilor anilidei 5 este practic identică în solvenții studiați, de -9.50 eV și -9.49 eV pentru HOMO -7 în apă și metanol, respectiv, și de 2.61 eV și 2.60 eV pentru LUMO +8, în apă și metanol, respectiv.

Tabelul 4.19. Orbitalii moleculari HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 pentru izomerii E2 și E3 ai acidului DFH₄, precum și formele lor disociate

Orbitalul molecular	Energia orbitalilor, eV				
	Izomerul E2 al acidului DFH ₄			Izomerul E3 al acidului DFH ₄	
	Acidul DFH ₄	anionul cu H din poziția <i>anti</i> -disociat	anionul cu H din poziția <i>syn</i> -disociat	Acidul DFH ₄	anionul cu H din poziția <i>syn</i> -disociat
	Apă	Apă	Apă	Metanol	Metanol
LUMO +4	2.38				
LUMO +3	1.60				
LUMO	-2.33	1.83	2.11	-2.20	-1.38
HOMO	-6.50	-2.16	-9.12	-6.32	-5.67
HOMO -3	-9.32				
HOMO -4	-9.39				

Figura 4.14c prezintă orbitalii de frontieră HOMO și LUMO pentru fumaramida 6. Calculele demonstrează că orbitalii responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 se află pe nivele HOMO și LUMO, având energii aproape identice în solvenții studiați, de -5.97 eV și -5.95 eV pentru HOMO în apă și metanol, respectiv, și de -2.05 eV și -2.04 eV pentru LUMO, în apă și metanol, respectiv.

Pentru derivatul MEAD 7 (Figura 4.14d), situsurile atomice ambifile O8 și O10, se află pe nivelele energetice HOMO -7 și HOMO -8, în limitele -9.39 eV – -9.42 eV pentru apă și metanol, și pe nivelele LUMO +5 și LUMO +6, în limitele 1.78 eV – 2.22 eV pentru apă și metanol (Tabelul 4.20).

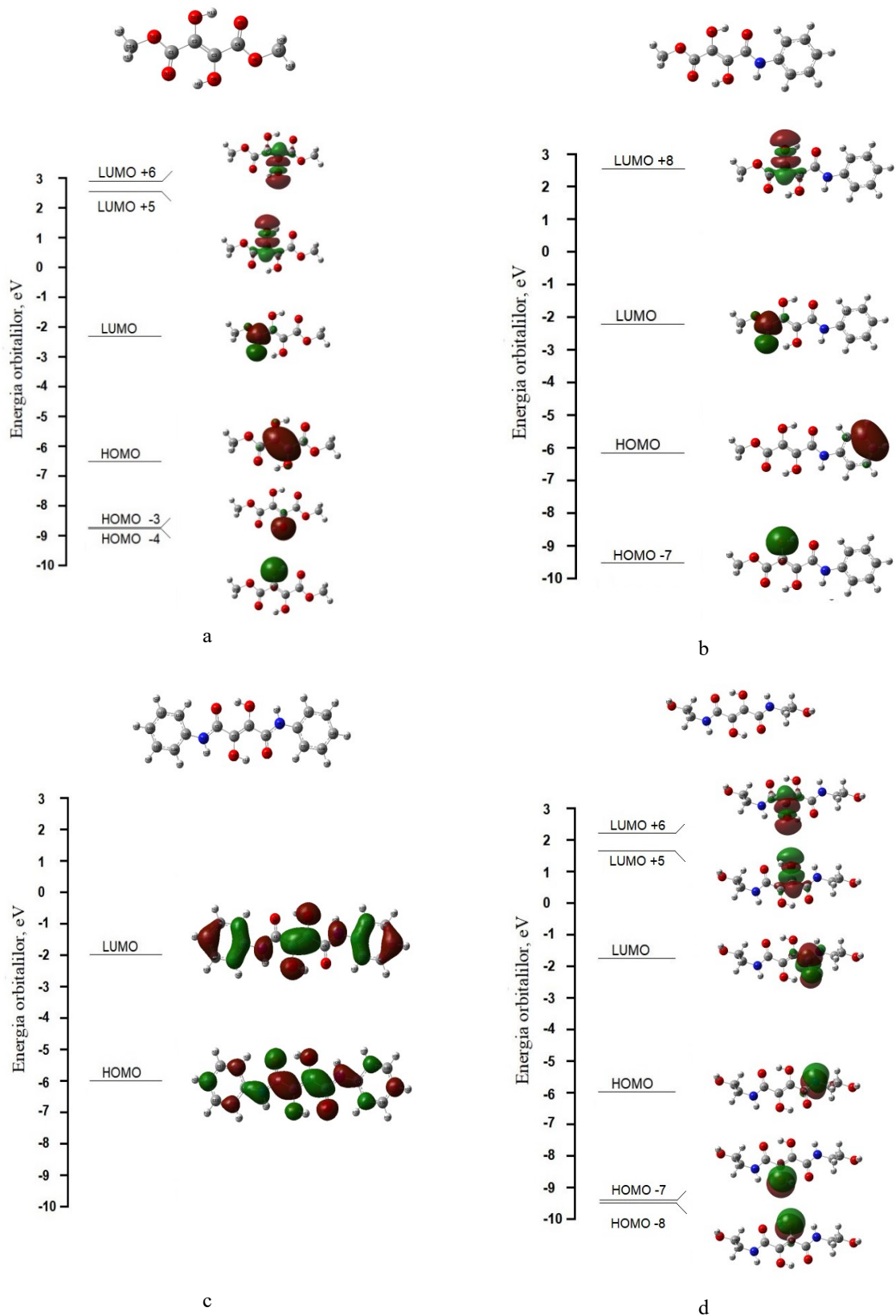


Fig. 4.14. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră pentru (a) esterul EMD 2, (b) anilida 5, (c) fumaramida 6 și (d) MEAD 7

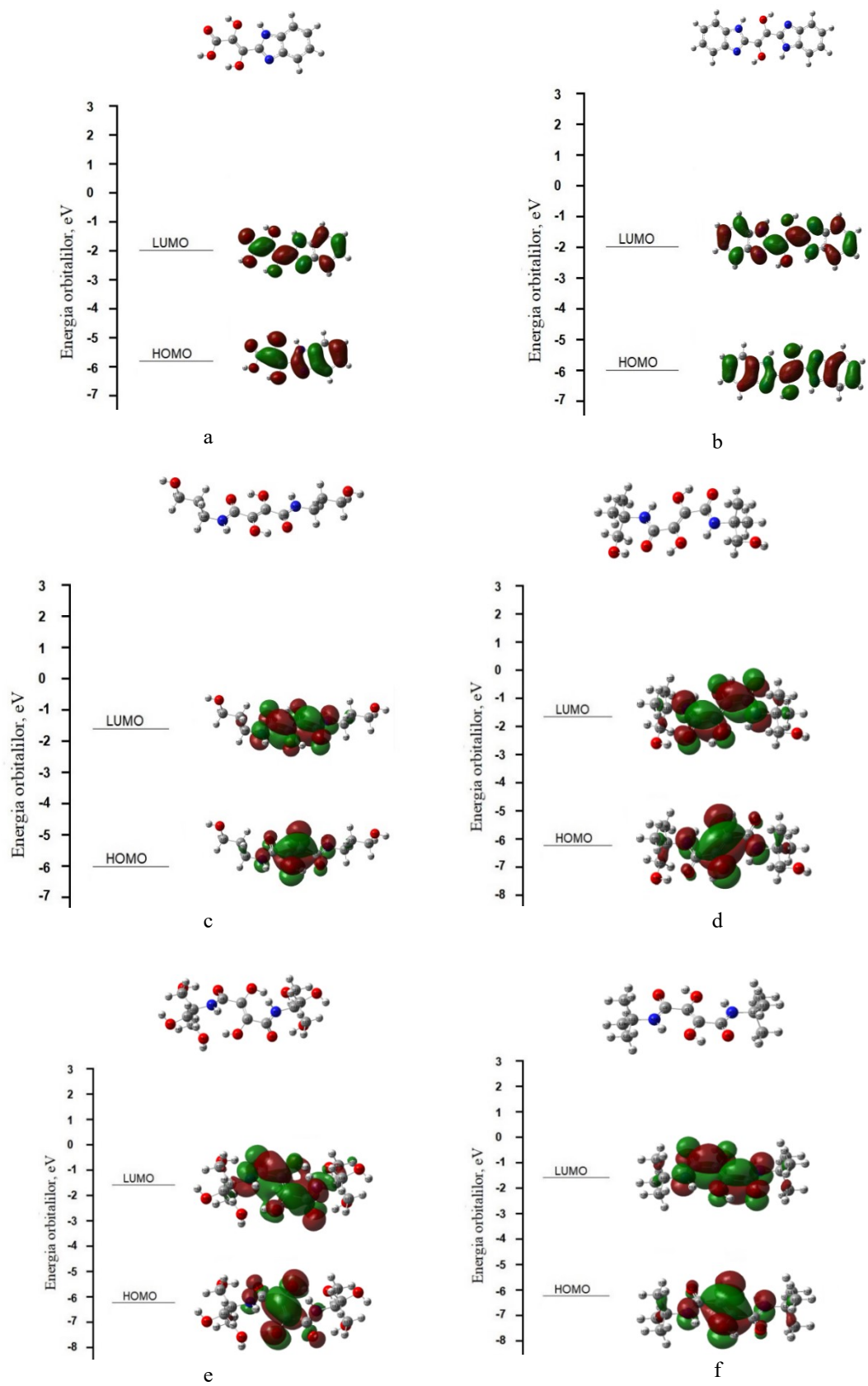


Fig. 4.15. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră pentru (a) MBD 12, (b) BBD 13, (c) MPAD 8, (d) fumaramida 9, (e) fumaramida 10, (f) fumaramida 11

Figura 4.15a prezintă orbitalii de frontieră HOMO și LUMO pentru acidul MBD **12**. Conform rezultatelor, orbitalii responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 se află pe nivele HOMO și LUMO, având energii aproape identice în solvenții studiați, de -5.85 eV și -5.83 eV pentru HOMO în apă și metanol, respectiv, și de -2.00 eV și -1.97 eV pentru LUMO, în apă și metanol, respectiv (Tabelul 4.20).

Figura 4.15b prezintă orbitalii de frontieră HOMO și LUMO pentru derivatul BBD **13**. Calculele arată că orbitalii responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 se află pe nivele HOMO și LUMO, având energii aproape identice în solvenții studiați, de -5.97 eV și -5.41 eV pentru HOMO în apă și metanol, respectiv, și de -2.05 eV și -1.81 eV pentru LUMO, în apă și metanol, respectiv (Tabelul 4.20).

Tabelul 4.20. Orbitalii moleculari de frontieră HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 pentru derivații cercetați, în apă și metanol

Compusul	Solvent	Energetica orbitalilor, eV								
		HOMO -8	HOMO -7	HOMO -4	HOMO-3	HOMO	LUMO	LUMO+5	LUMO+6	LUMO +8
EDM 2	Apă			-8.79	-8.77	-6.28	-2.15	2.63	2.92	
	Metanol			-8.79	-8.76	-6.25	-2.12	2.63	2.92	
Anilida 5	Apă		-9.50			-6.09	-2.1			2.61
	Metanol		-9.49			-6.07	-2.07			2.60
Fumaramida 6	Apă					-5.97	-2.05			
	Metanol					-5.95	-2.04			
MEAD 7	Apă	-9.42	-9.40			-6.04	-1.68	1.79	2.20	
	Metanol	-9.40	-9.39			-6.01	-1.65	1.78	2.22	
MPAD 8	Apă					-6.01	-1.63			
	Metanol					-5.97	-1.65			
Fumaramida 9	Apă					-6.13	-1.67			
	Metanol					-6.10	-1.65			
Fumaramida 10	Apă					-6.17	-1.60			
	Metanol					-6.14	-1.25			
Fumaramida 11	Apă					-6.03	-1.52			
	Metanol					-6.00	-1.54			
Acidul MBD 12	Apă					-5.85	-2.00			
	Metanol					-5.83	-1.97			
BBD 13	Apă					-5.97	-2.05			
	Metanol					-5.41	-1.81			

Pentru fumaramida MPAD **8** (Figura 4.15c), fumaramida **9** (Figura 4.15d), fumaramida **10** (Figura 4.15e) și fumaramida **11** (Figura 4.15f), orbitalii responsabili pentru nucleofilitatea și electrofilitatea situsurilor O8 și O10 se află, de asemenea, pe nivele HOMO și LUMO, având energii foarte apropiate în solvenții studiați (Tabelul 4.20).

Figura 4.16 prezintă geometria optimizată a DPPH* (a), orbitalii moleculari β -LUMO +3 responsabili pentru acceptul electronului de la antioxidant, cu energia de -3,65 eV (b) și harta potențialului molecular electrostatic (c). Radicalul DPPH* este un radical stabil din cauză că electronul liber este delocalizat deasupra moleculei, și astfel este evitată formarea dimerului. Din Figura 4.16c se observă că situsul N9, deși se află într-o regiune neutră, nu este ușor accesibil, fiind ecranat de inelele fenilice și inelul picril, astfel că derivații cu structuri geometrice voluminoase vor întâmpina greutate în procesul de apropiere pentru a reacționa.

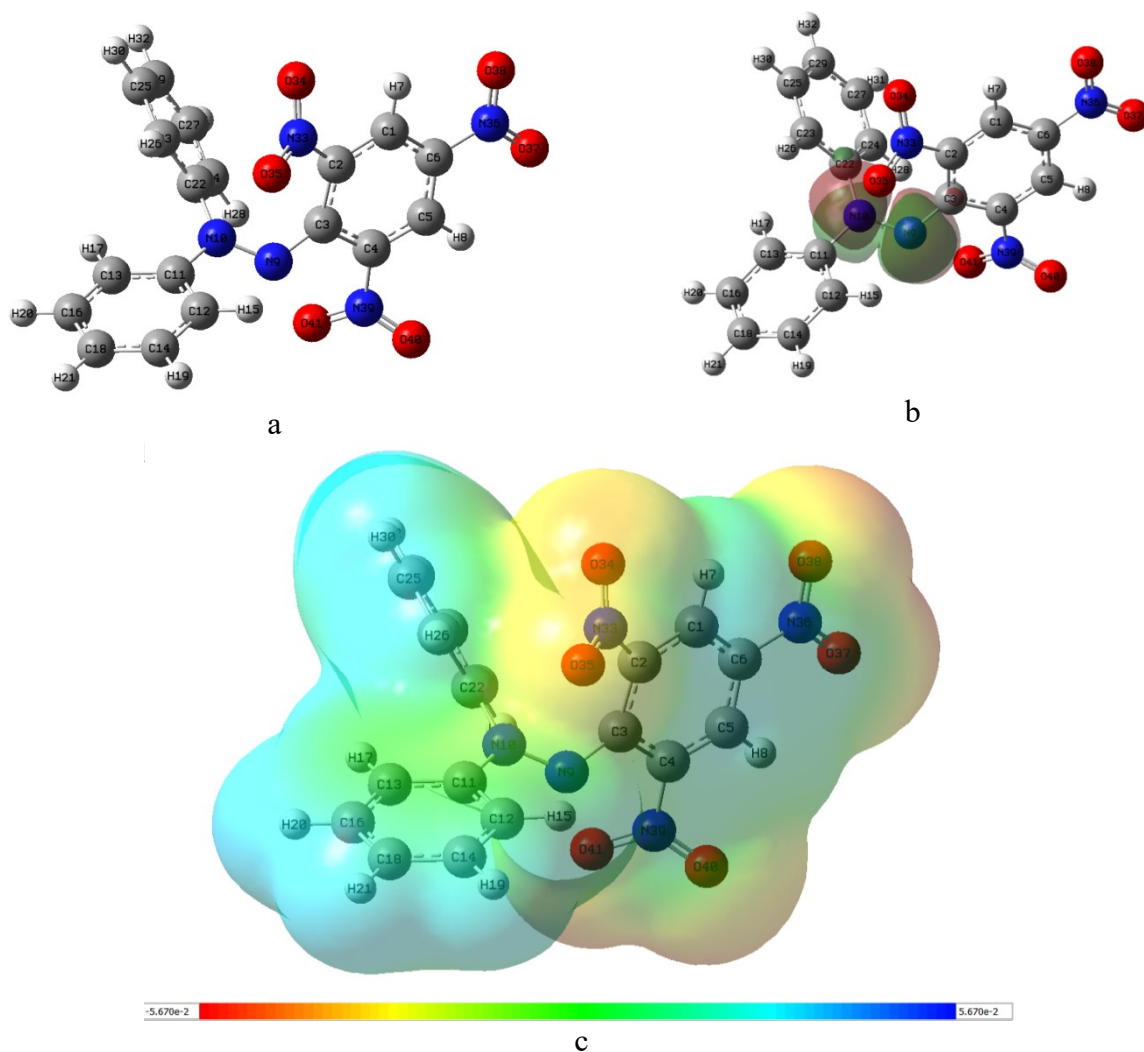


Fig. 4.16. Geometria optimizată a DPPH* (a), orbitalii moleculari β -LUMO +3 responsabili pentru acceptul electronului de la antioxidant (b) și harta potențialului molecular electrostatic (c)

4.7. Determinarea mecanismului activității antioxidante a acidului dihidroxifumaric

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) [128-131].

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 ($AH^{+\bullet}$) pentru a doua etapă. Moleculele cu valori scăzute ale IP și PDE vor avea activitate ridicată [128-131].

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 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 DFH₄ își manifestă activitatea antioxidantă față de radicalul DPPH \cdot . 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 [128,129]:

$$BDE = H(DFH_3^\bullet) + H(H^\bullet) - H(DFH_4) \quad (4.22)$$

$$IP = H(DFH_4^{+\bullet}) + H(e^-) - H(DFH_4) \quad (4.23)$$

$$PDE = H(DFH_3^\bullet) + H(H^+) - H(DFH_4^{+\bullet}) \quad (4.24)$$

$$PA = H(DFH_3^-) + H(H^+) - H(DFH_4) \quad (4.25)$$

$$ETE = H(DFH_3^\bullet) + H(e^-) - H(DFH_3^-) \quad (4.26)$$

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

$$H(X) = E_0 + ZPE + \Delta H_{\text{trans}} + \Delta H_{\text{rot}} + \Delta H_{\text{vib}} + RT \quad (4.27)$$

unde E_0 este energia electronică totală, ZPE - este energia în punctul zero, ΔH_{trans} , ΔH_{rot} , ΔH_{vib} sunt contribuțiile de translație, rotație și vibrație la entalpie, respectiv. Termenul RT este adăugat pentru a converti energia în entalpie [131].

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 kJ mol^{-1} , respectiv [128,131]. Entalpiile acestor specii în apă constituie: -1310.0, -101.86 și -1083.8 kJ mol^{-1} , respectiv [128,131].

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) 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. Reieșind din cele expuse mai sus speciile moleculare supuse cercetării în cazul utilizării solventului (apă) sunt prezentate în Figura 4.17.

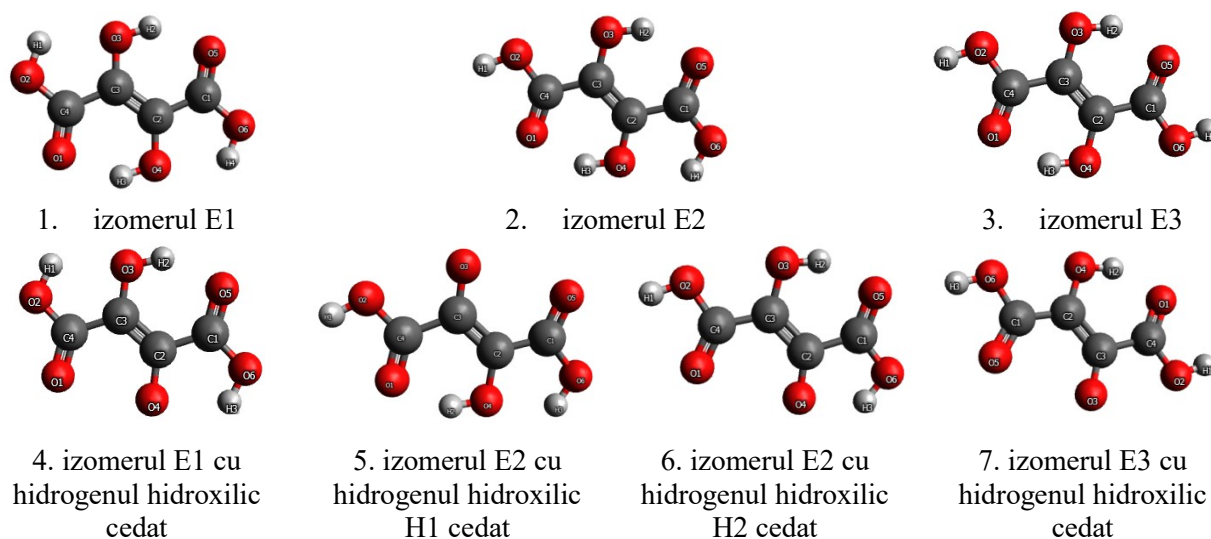


Figura 4.17. Speciile moleculare cu caracter antioxidant cercetate în solvent (apă).

Valorile obținute ale BDE, IP, PDE, PA, și ETE (kJ mol^{-1}) pentru izomerii DFH₄ (prezentate în Figura 4.17) *in vacuo* și în apă sunt redată în Tabelul 4.21, unde cea mai mică valoare indică asupra preferinței mecanistice prin care are loc manifestarea activității antioxidante.

Analiza datelor obținute relevă faptul că *in vacuo* mecanismul transferului direct de hidrogen (HAT) este cel mai probabil, valoarea BDE a izomerului E1 (347.13 kJ mol^{-1}) fiind mult mai mică decât valorile obținute pentru primele etape ale mecanismelor SET-PT (IP = 864.81 kJ mol^{-1}) și SPLET (PA = 1357.21 kJ mol^{-1}). În solvent, situația este diferită. Mecanismul HAT, deși este caracterizat de valori mai mici ale energiei necesare decât *in vacuo*, este totuși puțin probabil, deoarece valorile PA în soluție sunt de 80 - 100 kJ mol^{-1} , în timp ce valorile

pentru IP sunt în jur de 500 kJ mol⁻¹. 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⁻¹), urmat îndeaproape de izomerul E2 (PA = 84.75 kJ mol⁻¹). 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• izomerul E2 poate ceda unul din cei doi hidrogeni de la grupările hidroxil, iar calculele arată că anume structura prezentată în Figura 4.17(5) va fi cea mai probabilă, cu PA = 84.75 kJ mol⁻¹, față de structura din Figura 4.17(6), cu PA = 96.39 kJ mol⁻¹. Astfel, cel mai ușor este cedat radicalului anume hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare *syn*-.

Tabelul 4.21. Valorile calculate ale BDE, IP, PDE, PA, și ETE (kJ·mol⁻¹) pentru izomerii DFH₄ și speciile anionice respective *in vacuo* și în apă.

Mediul	Specia	Mecanismul				
		HAT	SET-PT		SPLET	
		BDE	IP	PDE	PA	ETE
<i>In vacuo</i>	Izomerul E1	347.13	864.81	792.04	1357.21	305.84
În solvent (apă)	Izomerul E1	329.11	499.99	-46.53	81.41	372.00
	Izomerul E2 ^a	327.58	495.91	-43.99	84.75	367.13
	Izomerul E2 ^b	332.36	495.91	-39.21	96.39	360.27
	Izomerul E3	330.36	485.47	-30.77	100.66	354.00

Notă: notația E2^a 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^b 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*-.

Ținând cont de cele expuse mai sus, putem prezenta schematic mecanismul primei etape a interacțiunii acidului DFH₄ cu radicalul DPPH• conform reacțiilor de mai jos:

In vacuo, conform mecanismului HAT:



unde DFH₄ este prezent sub forma izomerului E1, prezentat în Figura 4.17(1).

În solvent (apă) transferul hidrogenului are loc în două etape (SPLET) și anume:



unde DFH₃⁻ va avea cel mai probabil structura prezentată în Figura 4.17(5).

4.8. Estimarea proprietăților farmaco-cinetice și de toxicitate a derivaților cercetați

Pentru a fi eficientă ca medicament, o moleculă activă trebuie să-și atingă ținta în organism într-o concentrație suficientă și să rămână în locul stabilit într-o formă bioactivă suficient de mult timp pentru a avea loc evenimentele biologice preconizate. Dezvoltarea formelor medicamentoase implică evaluarea absorbției, distribuției, metabolismului, excreției și toxicității (ADMET) cât mai devreme în procesul de cercetare [132]. În contextul când compușii considerați sunt numeroși, modelele computerizate permit evaluarea proprietăților farmaco-cinetice fără a recurge la studii experimentale costisitoare și de durată, permițând determinarea probabilității ca derivații cercetați să devină potențiali candidați pentru dezvoltarea medicamentelor. Majoritatea companiilor farmaceutice au început a folosi această abordare computațională pentru screening-ul medicamentelor încă din anii 1990, deoarece marea majoritate a medicamentelor evaluate în studiile clinice nu ajungeau pe piață fie din cauza lipsei de eficacitate, fie din cauza efectelor secundare inacceptabile [133]. În cadrul tezei de față a fost efectuată, de asemenea, o predicție asistată de computer a proprietăților farmaco-cinetice și a profilului de toxicitate a derivaților studiați, utilizând softurile SwissADME [132] și pkCSM [133]. SwissADME oferă acces la cinci filtre bazate pe reguli acceptate. Aceste filtre provin adesea din analizele efectuate de marile companii farmaceutice care urmăresc să îmbunătățească calitatea colecțiilor chimice deținute. Filtrul Lipinski (Pfizer) a fost implementat conform [130], iar metodele Ghose (Amgen), Veber (GSK), Egan (Pharmacia) și Muegge (Bayer) au fost adaptate, respectiv, din [135-138].

Rezultatele analizei computaționale pot fi utile în viitor pentru a avansa în dezvoltarea unor posibile medicamente semisintetice și/sau sintetice pentru uz divers.

Tabelul 4.22 prezintă rezultatele obținute pentru acidul DFH4 și derivații acestuia. S-a constatat că majoritatea structurilor cercetate îndeplinesc *regula de cinci a lui Lipinski*, și satisfac filtrele Ghose, Veber și Egan, majoritatea atingând un scor bun de biodisponibilitate. Un alt atribut important este solubilitatea în apă a compusului, importantă pentru absorbția și distribuția acestuia în organism. Conform rezultatelor, se poate observa că majoritatea compușilor sunt foarte solubili în apă.

A fost evaluată penetrabilitatea pielii, adică viteza unei molecule de a pătrunde în *stratum corneum*, pentru a determina potențialul de a crea o formă de administrare transdermică a medicamentului. Se consideră că o moleculă va pătrunde în piele la valoarea $\log K_p$ mai mare de -2,5 cm/h [132]. S-a descoperit că toți derivații cercetați au o penetrabilitate a pielii moderată spre bună. Caco-2 este celula de adenocarcinom colorectal epitelial uman și permeabilitatea acesteia se utilizează pentru a calcula aportul de medicamente orale.

Tabelul 4.22. Proprietățile de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate (ADMET) pentru compușii cercetați: (1) acidul DFH₄ 1; (2) esterul EDM 2; (5) anilida 5; (6) fumaramida 6; (7) MEAD 7; (8) MPAD 8; (9) fumaramida 9; (10) fumaramida 10; (11) fumaramida 11; (12) MBD 12; (13) BBD 13

Compusul cercetat	1	2	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Similitudinea cu medicamente											
Lipinski	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Nu	Da	Da	Da
Indicele de biodisponibilitate	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.11	0.56	0.56	0.55
Absorbția											
Solubilitatea în apă (log mol/L)	-1.541	-0.408	-2.198	-3.352	-1.082	-0.997	-1.5	-1.042	-2.122	-2.892	-2.892
Permeabilitatea Caco2 (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	-0.601	-0.23	0.153	0.033	0.221	0.168	0.284	-0.102	-0.292	0.137	0.474
Absorbția intestinală (om)	0	47.231	57.093	74.879	29.869	39.827	34.788	0	52.619	33.09	80.743
Permeabilitatea pielii (log Kp)	-2.735	-3.084	-2.86	-2.776	-3.139	-2.98	-3.185	-2.735	-2.782	-2.735	-2.735
Substrat pentru P-glicoproteină	Nu	Nu	Nu	Da	Nu	Da	Nu	Da	Da	Da	Da
Inhibitor al P-glicoproteinei I	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Inhibitor al P-glicoproteinei II	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Distribuția											
VDss (om) (log L/kg)	-0.563	-0.113	-0.41	-0.231	-0.64	-0.694	-0.448	-0.387	-0.714	0.002	0.029
Permeabilitatea BBB (log BB)	-1.14	-0.21	-0.6	-0.713	-0.952	-1.202	-1.052	-1.865	-0.701	-1.237	-1.878
Permeabilitatea CNS (log PS)	-3.525	-3.059	-2.744	-2.42	-4.204	-4.15	-4.105	-6.697	-2.646	-4.542	-2.433
Metabolism											
Substrat pentru CYP2D6	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Substrat pentru CYP3A4	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Inhibitor al CYP1A2	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Da
Inhibitor al CYP2C19	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Inhibitor al CYP2C9	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Da
Inhibitor al CYP2D6	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Inhibitor al CYP3A4	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Excreția											
Lichidare totală (log ml/min/kg)	0.842	0.942	0.189	0.002	0.966	1.025	0.892	1.066	1.186	0.639	1.261
Substrat pentru OCT2 renal	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Da
Toxicitatea											
Toxicitate AMES	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Da
Hepatotoxicitate	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
Sensibilizarea pielii	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
hERG I inhibitor	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu

Majoritatea compușilor s-au dovedit a avea valori de permeabilitate moderate până la puternice pentru Caco-2 (valori $\log P_{app} > 0,90$ cm/s).

Determinarea dacă o substanță este inhibitor/substrat al P-gp este metoda principală utilizată pentru a determina efluxul activ prin membranele biologice [139]. P-gp este elementul principal al transportatorilor de casete care leagă ATP sau transportatorilor ABC, care este utilizat pentru a proteja sistemul nervos central (SNC) de xenobiotice. Majoritatea derivaților nu au fost găsiți ca inhibitor/substrat al P-gp.

Rezultatele demonstrează că majoritatea compușilor au o absorbție ridicată în tractul gastro-intestinal. Din șirul de compuși cercetați, nici unul nu are capacitatea de a traversa bariera sanguină a creierului (BBB), sau sistemul nervos central, având valori negative ale logaritmului raportului concentrației creier-plasmă.

Au fost de asemenea evaluate izoformele citocromului uman P450 (CYP), care participă în metabolismul medicamentelor din interiorul ficatului. Cea mai importantă enzimă clinic adecvată de metabolizare a medicamentelor din corpul uman este CYP3A4, fiind responsabilă pentru metabolismul a aproximativ 60% din xenobiotice, inclusiv medicamente, cancerigeni, steroizi și eicosanoizi [140]. Inhibarea CYP3A4 poate duce direct la toxicitate medicamentoasă, interacțiuni medicament-medicament și alte efecte adverse. Toți compușii cercetați sunt non-inhibitori/substraturi ale izoenzimelor, în afară de compusul BBD 13, care este posibil inhibitor al câtorva izoenzime.

Pentru a prezice calea de excreție, a fost evaluat clearance-ul total atât pentru substraturile hepatice, cât și renale precum și pentru substratul renal al transportorului de cationi organici 2 (OCT2), exprimat ca \log mL/min/kg [141]. 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. Toxicitatea AMES evaluează efectul potențial carcinogen al substanțelor chimice prin utilizarea tulpinii bacteriene *Salmonella typhimurium* [142]. Rezultatele obținute relevă că doar BBD 13 posedă astfel de toxicitate. 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 4.18 prezintă radarele de biodisponibilitate a substanțelor cercetate, demonstrând proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor [143].

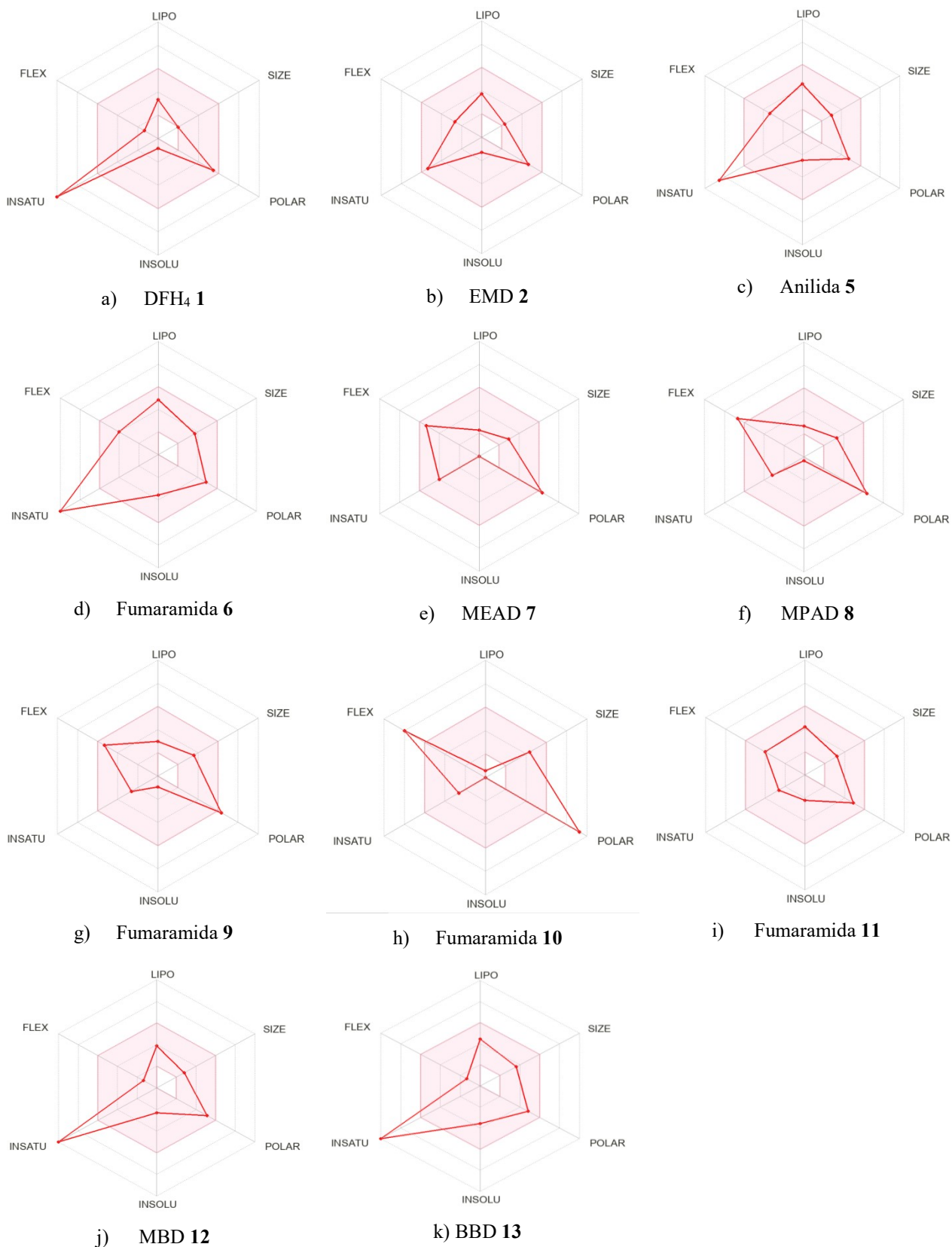


Fig. 4.18. Radarele de biodisponibilitate pentru substanțele cercetate: (a) acidul DFH₄ 1, (b) esterul EDM 2, (c) anilida 5, (d) fumaramida 6, (e) MEAD 7, (f) MPAD 8, (g) fumaramida 9, (h) fumaramida 10, (i) fumaramida 11, (j) MBD 12, (k) BBD 13

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

- ✓ LIPO (lipofilitate): $-0,7 < XLOGP3 < +5,0$;
- ✓ SIZE (dimensiune): $150\text{g/mol} < \text{greutate moleculară} < 500\text{g/mol}$;
- ✓ POLAR (polaritate): $20\text{\AA}^2 < \text{TPSA} < 130\text{\AA}^2$;
- ✓ 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 4.17 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.

4.8. Cercetarea computațională a efectului inhibitor al compușilor cercetați asupra virusului SARS-CoV-2

COVID-19 este o nouă boală infecțioasă cauzată de virusul SARS-CoV-2 al familiei coronavirus. De când a apărut pentru prima dată în Wuhan (China), acest virus a infectat sute de mii de oameni în aproape toate țările din lume, iar cele mai mari rate de mortalitate pentru COVID-19 au fost raportate în SUA și Italia. Virusul care a cauzat pandemia COVID-19 s-a dovedit a fi foarte contagios, iar elaborarea unui medicament puternic împotriva acestuia va fi un proces îndelungat [144]. În situația actuală, este clară necesitatea de a căuta tratamente alternative cu efecte antivirale puternice, și în același timp cu efecte secundare minime. Astfel, rezultatele cercetării de față ar putea contribui la lărgirea cunoștințelor și a posibilităților în tratamentul acestei infecții virale în curs de desfășurare.

Virusul COVID-19 infectează celulele prin legarea glicoproteinei spike (S) de enzima de conversie a angiotensinei 2 (ACE2), care este atașată de membranele celulare ale celulelor situate în plămâni, artere, inimă, rinichi și intestine. Pentru a finaliza intrarea în celulă, enzima protează TMPRSS2 trebuie să amorseze glicoproteina spike [144]. De fapt, este necesară activarea TMPRSS2 ca protează pentru a atașa proteina Spike a virusului la ligandul celular uman. Genomul viral este transcris și apoi translat după ce virusul pătrunde în celula gazdă și se deschide. Prin urmare, perturbarea funcționării uneia sau mai multor enzime implicate în replicarea, transcripția sau translarea virală poate fi o cale eficientă pentru a opri situația de urgență a acestei pandemii [144,145].

În screening-ul de noi compuși care pot contribui la combaterea acestui virus periculos, un rol important îl are sistemul de modelare bioinformatică cunoscut sub numele de andocare moleculară (molecular docking). Andocarea se bazează pe interacțiunea moleculelor mici,

cunoscute sub numele de liganzi sau inhibitori, cu situsurile active ale proteinei țintă (receptor). Acest proces de legare non-covalentă este utilizat pentru prezicerea afinității de legare între cele două molecule [146].

În cadrul cercetării de față a fost utilizat programul CB-Dock2, elaborat în cadrul Academiei de Științe Chineze [147,148]. Procedul utilizat 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 [149].

CB-Dock2 facilitează procedura de andocare și îmbunătățește acuratețea prin prezicerea site-urilor de legare ale proteinelor țintă, folosind o abordare proprie de detecție a cavității bazată pe curbura (CurPocket). Metoda de andocare utilizată în această procedură este FitDock, o metodă dezvoltată internă care se potrivește conformației inițiale la șablonul dat folosind o abordare ierarhică de aliniere cu mai multe caracteristici, explorează ulterior conformațiile posibile și, în final, emite poziții de andocare rafinate [147,148,150,151].

Una dintre cele mai interesante ținte ale virusului SARS-CoV-2 este proteaza principală a acestuia (M^{pro}), care este esențială în ciclul de viață a virusului, inclusiv în replicarea și asamblarea acestuia [152]. Astfel, inhibarea sau dezactivarea acestei proteaze va duce la moartea virusului. O multitudine de simulări computaționale au fost publicate recent având ca obiectiv central studiul interacțiunii dintre proteaza principală M^{pro} și compuși chimici deja cunoscuți pentru puternicele lor proprietăți antiinflamatoare și antioxidante, cu scopul de a descoperi dacă aceștia se pot lega de porțiuni diferite de M^{pro} , ceea ce ar însemna utilitatea acestor compuși în dezactivarea virusului SARS-CoV-2. Identitatea secvenței arată că proteaza principală SARS-CoV-2 este identică cu cea a altor viruși SARS-CoV în proporție de 96% [152], fiind un alt motiv de încurajare a cercetărilor în acest domeniu.

Structura cristalină a proteazei principale (denumită și 3CLpro sau protează asemănătoare 3-chimotripsinei [153]) este prezentă în baza de date Protein Data Bank (PDB) sub diferite coduri (de exemplu 6LU7, 6M03, 6W4B, 6Y84, 6YB7, 5R7Y, 5R7Z, 5R80, 6M03, etc.) [154]. În cercetarea de față a fost utilizată structura cristalină a M^{pro} cu codul PDB: 6LU7 [155], iar această structură cristalografică este codificată în genomul viral în combinație cu inhibitorul N3.

În cadrul cercetării de față a fost efectuată andocarea moleculară între proteaza principală (M^{pro}) a virusului SARS-CoV-2, ce conține 312 aminoacizi, și compușii studiați experimental anterior: acidul DFH₄, derivații sintetizați ai acestuia, precum și acidul ascorbic, pentru comparație. Andocarea moleculară are ca scop dezvăluirea a două informații semnificative: în primul rând, conformația corectă a complexului format ligand-receptor și în al doilea rând,

afinitatea de legare care reprezintă o aproximare a energiei libere de legare. Tabelul 4.23 prezintă valorile afinităților de legare ale compușilor cercetați la proteaza virală, iar Figurile 4.20-4.23 prezintă structurile tridimensionale și bidimensionale ale acestor interacțiuni, iar Tabelul 4.24 - lista legăturilor de H între aminoacizii proteazei principale a SARS-COV-2 și compușii cercetați.

Tabelul 4.23. Rezultatele andocării moleculare a compușilor cercetați la proteaza principală a virusului SARS-COV-2

Identificatorul proteinei	Compusul cercetat	Afinitatea de legare, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
6LU7	DFH ₄ 1	-22.18
	Esterul 2	-20.92
	Anilida 5	-26.36
	Fumaramida 6	-29.29
	MEAD 7	-22.59
	MPAD 8	-23.01
	Fumaramida 9	-28.03
	Fumaramida 10	-25.10
	Fumaramida 11	-27.61
	MBD 12	-28.03
	BBD 13	-30.12
	Acidul ascorbic	-22.18

Pe baza valorilor energiei de legare, s-a constatat că DFH₄ **1** are aceeași afinitate de legare ca și acidul ascorbic ($-22.18 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Cea mai mică afinitate de legare la proteaza virală o are esterul EDM **2** ($-20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), iar cea mai mare afinitate - acidul BBD **13** ($-30.12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Conform rezultatelor simulării computaționale, conformațiile cu cele mai mari afinități de legare pentru toți compușii cercetați se plasează în același buzunar al proteazei M^{pro} ca și inhibitorul N3 (Figura 4.19).

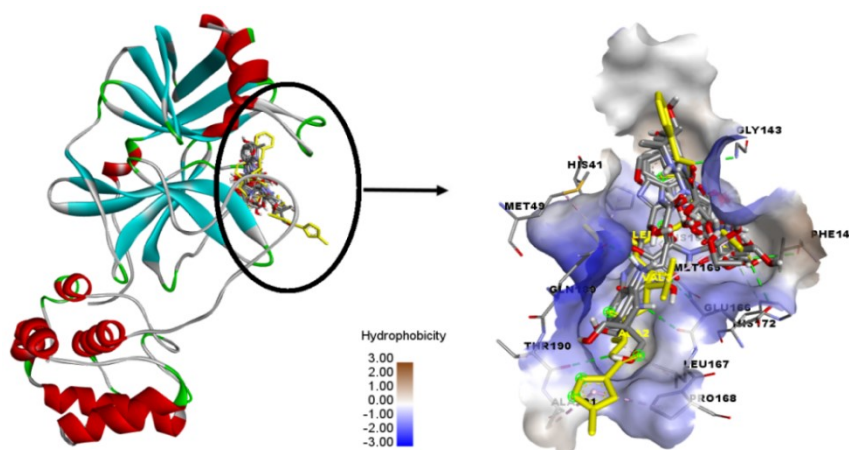


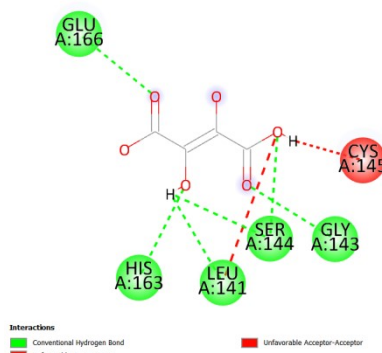
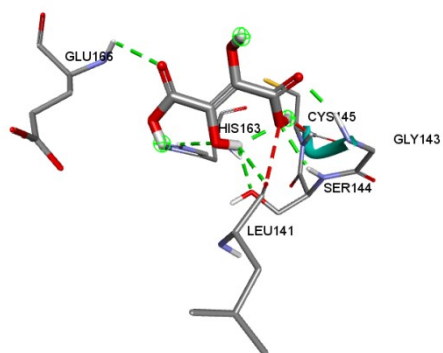
Figura 4.19. Poziția celei mai bune conformații pentru toți compușii studiați în buzunarul de legare al M^{pro} al SARS-CoV-2 (ligandul co-cristalizat N3 este prezentat cu galben)

Tabelul 4.24. Lista legăturilor de hidrogen între aminoacizii din proteaza principală a virusului SARS-COV-2 și compușii cercetați

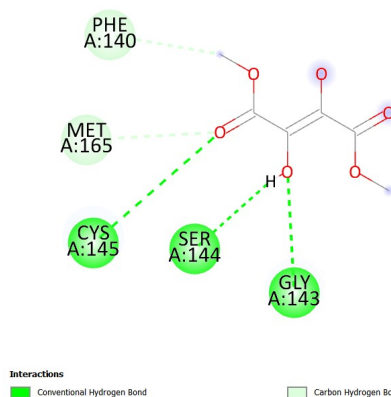
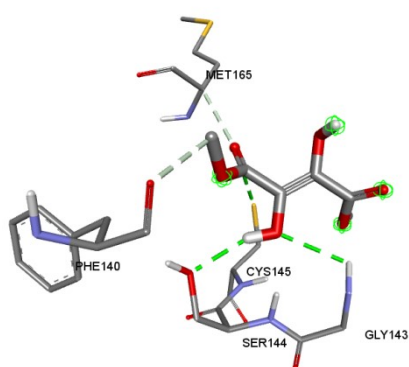
Compusul cercetat	Aminoacidul	Lungimea legăturii de hidrogen, Å	Aminoacidul	Lungimea legăturii de hidrogen, Å
DFH ₄ 1	GLY143	1.98451	GLU166	2.57088
	SER144	2.10917	LEU141	2.51648
	HIS163	2.47778	SER144	2.26947
Esterul 2	GLY143	2.64609	MET165	3.31822
	CYS145	3.5201	PHE140	3.34389
	SER144	2.23138		
Anilida 5	GLY143	2.20688	LEU141	2.57079
	SER144	2.42574	PHE140	3.50946
	CYS145	2.4952	GLU166	3.77109
	HIS163	2.0892	CYS145	5.27726
Fumaramida 6	GLU166	1.83658	MET165	4.9478
	HIS164	2.77663	LEU27	5.15539
	GLN189	2.51907	CYS145	4.24326
	MET165	3.48614		
MEAD 7	CYS145	2.41524	SER14	2.93849
	CYS145	2.72434	ASN142	2.75777
	HIS163	2.38557	PHE140	2.08449
	LEU141	1.8385		
MPAD 8	CYS145	2.40012	LEU141	2.18493
	CYS145	3.75288	ASN142	2.68122
	HIS163	2.33261	PHE140:O	3.59135
Fumaramida 9	SER144	2.09002	SER144	2.84729
	CYS145	2.65742	ASN142	2.69049
	CYS145	3.73015	ASN142	3.46055
	HIS163	2.48258		
Fumaramida 10	GLU166	2.01187	GLU166	2.92591
	GLN192	2.89091	GLU166	2.2936
	ASN142	1.76529	THR190	2.19688
Fumaramida 11	SER144	2.10174	SER144	2.72724
	CYS145	2.67445	CYS145	2.97041
	CYS145	3.74161	ASN142	2.66374
	HIS163	2.51531		
MBD 12	GLY143	2.09719	HIS172	3.70052
	HIS163	2.09979	CYS145	3.70958
	HIS163	2.59056	CYS145	4.09013
	CYS145	2.8369	LEU27	5.42848
BBD 13	GLN189	2.79554	CYS145	4.19659
	CYS145	4.13757	MET165	4.93593
	MET49	5.45128	MET165	5.19707
	LEU27	5.17113		
Acid ascorbic	GLY143	2.22474	HIS163	2.16413
	SER144	2.25121	LEU141	3.00598
	CYS145	2.35776	SER144	3.19641
	CYS145	3.40739	HIS172	3.5529

Interacțiunile dintre M^{pro} și DFH₄ 1 sunt prezentate în Figura 4.20a. Observăm prezența a șase legături de hidrogen obișnuite, cu aminoacizii GLY143, SER144, LEU141, HIS163 și GLU166. În cazul acidului ascorbic (Figura 4.20c), acesta prezintă cinci legături de hidrogen, legându-se practic cu aceiași aminoacizi ca și DFH₄ 1, excepție fiind legătura cu CYS145, și

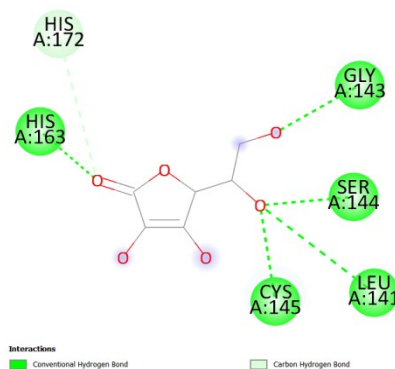
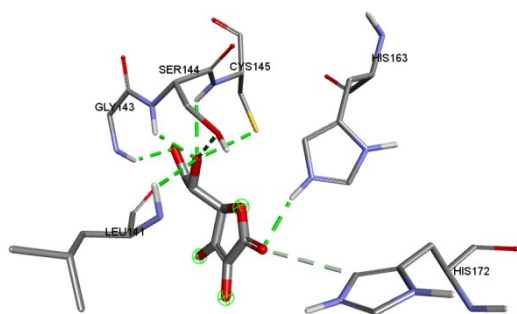
absența legăturii cu GLU166. În cazul DFH₄ 1 trebuie menționată prezența a două legături nefavorabile (indicate cu linie punctată roșie).



a) DFH₄ 1



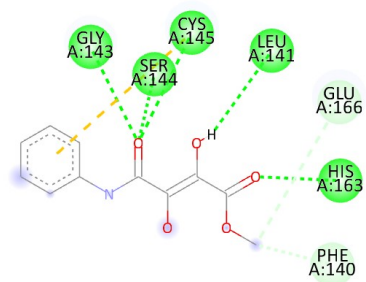
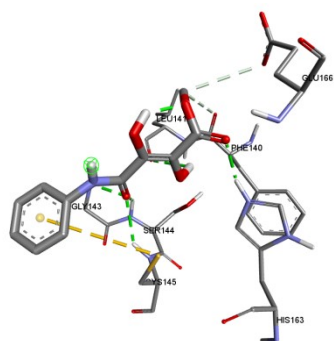
b) Esterul EDM 2



c) Acidul ascorbic

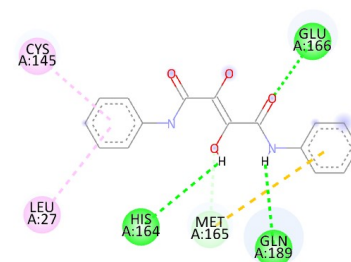
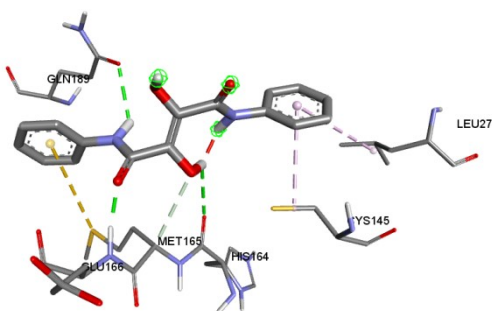
Fig. 4.20. Reprezentarea interacțiunilor cu cel mai mare scor de andocare între proteaza principală a virusului SARS-COV-2 și (a) acidul DFH₄ 1, (b) esterul EDM 2, (c) acidul ascorbic (imagine 3D - pe stânga și 2D - pe dreapta)

Esterul EDM 2 (Figura 4.20b) se leagă de proteaza virală prin trei legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii CYS145, SER144, GLY143 și prin trei legături carbon-hidrogen, cu aminoacizii PHE140 și MET165.



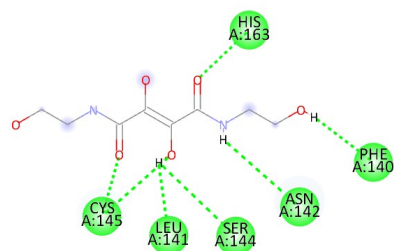
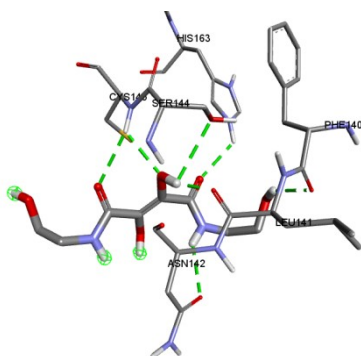
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Carbon Hydrogen Bond
 Pi-Sulfur

a) Anilida 5



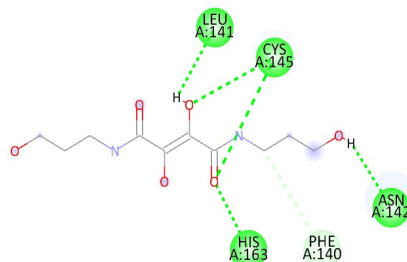
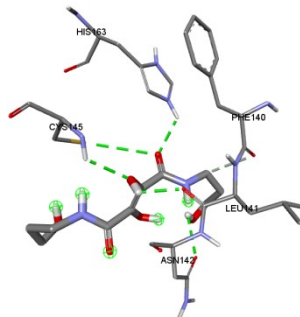
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Carbon Hydrogen Bond
 Pi-Sulfur
 Pi-Alkyl

b) Fumaramida 6



Interactions
 Conventional Hydrogen Bond

c) MEAD 7



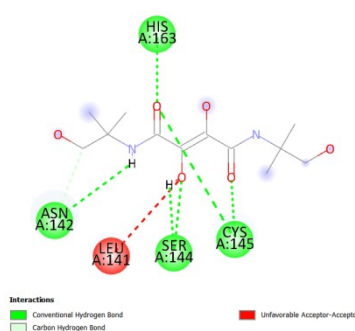
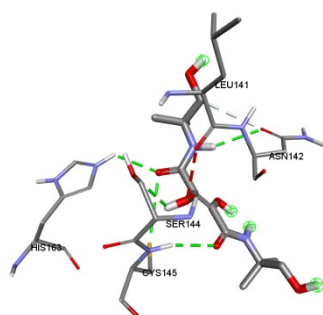
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Carbon Hydrogen Bond

d) MPAD 8

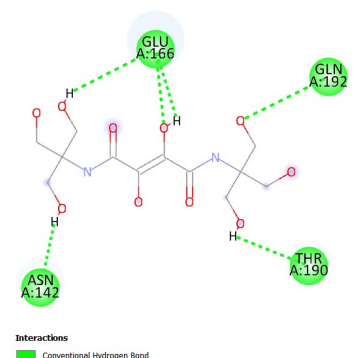
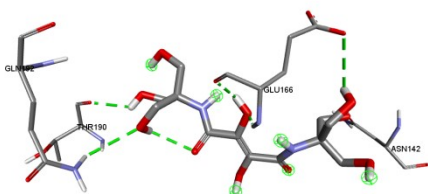
Fig. 4.21. Reprezentarea interacțiunii cu cel mai mare scor de andocare între compusul cercetat și proteaza principală a virusului SARS-COV-2 (imagine 3D - pe stânga și 2D - pe dreapta), pentru substanțele cercetate: (a) anilida 5, (b) fumaramida 6, (c) MEAD 7, (d) MPAD 8

Interacțiunile dintre M^{pro} și anilida **5** sunt prezentate în Figura 4.21a. Observăm prezența unei legături carbon-hidrogen cu aminoacidul GLU166 și a unei legături π -sulf cu aminoacidul CYS145. Cele cinci legături de hidrogen obișnuite, ca și în cazul acidului ascorbic, sunt create cu aminoacizii GLY143, SER144, LEU141, HIS163 și CIS145.

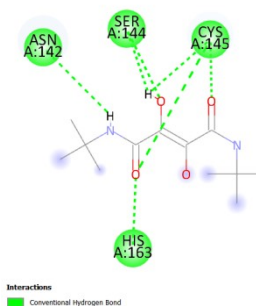
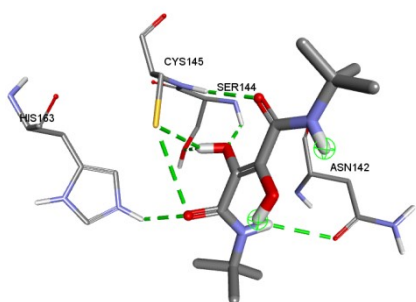
Fumaramida **6** interacționează cu proteaza principală M^{pro} prin intermediul a trei legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii GLU166, GLN189, HIS164, o legătură carbon-hidrogen cu aminoacidul MET165, o legătură π -sulf cu aminoacidul MET165 și două legături π -alchil, cu aminoacizii CYS145 și LEU27, respectiv (Figura 4.21b).



a) Fumaramida 9



b) Fumaramida 10

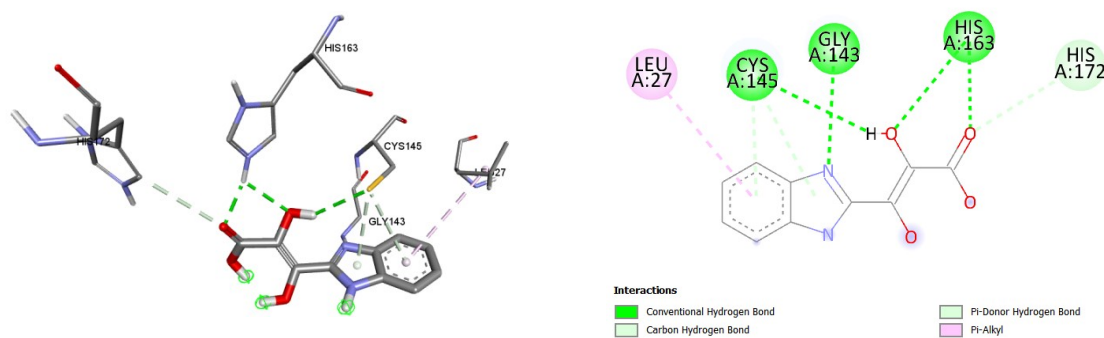


c) Fumaramida 11

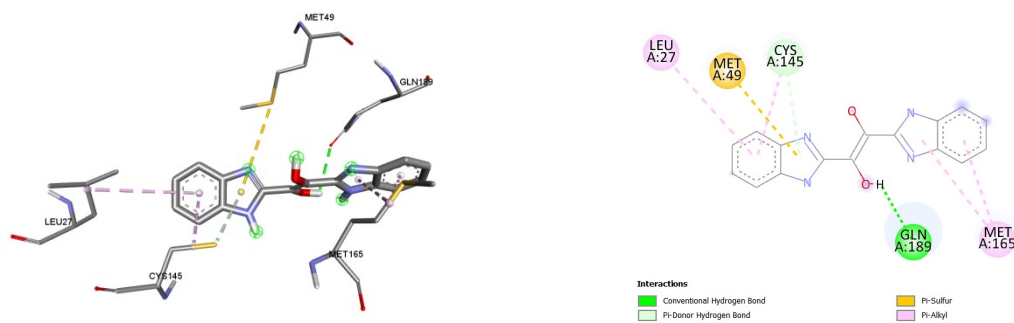
Fig. 4.22. Reprezentarea interacțiunii cu cel mai mare scor de andocare între compusul cercetat și proteaza principală a virusului SARS-COV-2 (imagine 3D - pe stânga și 2D - pe dreapta), pentru fumaramidele 9 (a), 10 (b) și 11 (c)

Interacțiunile dintre M^{pro} și MEAD 7 sunt prezentate în Figura 4.21c. Observăm prezența a șapte legături de hidrogen convenționale, dintre care cinci legături sunt create, ca și în cazul acidului ascorbic, cu aminoacizii SER144, LEU141, HIS163 și CIS145, iar celelalte două, cu PHE140 și HIS163.

Fumaramida MPAD 8 interacționează cu proteaza principală M^{pro} prin intermediul a cinci legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii LEU141, CYS145, HIS163, ASN142, și printr-o legătură carbon-hidrogen cu aminoacidul PHE140 (Figura 4.21d).



a) MBD 12



b) BBD 13

Fig. 4.23. 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: (a) MBD 12, (b) BBD 13

Interacțiunile dintre M^{pro} și fumaramida 9 sunt prezentate în Figura 4.22a. Observăm prezența a șase legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii SER144, HIS163, CIS145, ASN142, o legătură carbon-hidrogen cu aminoacidul ASN142, dar și o legătură nefavorabilă de tip acceptor-acceptor cu LEU141.

Fumaramida 10 interacționează cu proteaza principală M^{pro} prin intermediul a șase legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii GLU166, GLN192, ASN142 și THR190 (Figura 4.22b).

Interacțiunile dintre M^{pro} și fumaramida **11** sunt prezentate în Figura 4.22c. Observăm prezența a șapte legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii SER144, HIS163, CIS145, ASN142.

Derivatul MBD **12** interacționează cu proteaza principală M^{pro} prin intermediul a patru legături de hidrogen convenționale, cu aminoacizii CYS145, GLY143, HIS163, prin două legături de hidrogen π -donor cu aminoacidul CYS145, printr-o legătură carbon-hidrogen cu aminoacidul HIS172, precum și printr-o legătură π -alchil cu aminoacidul LEU27 (Figura 4.23a).

Interacțiunile dintre M^{pro} și derivatul BBD **13** sunt prezentate în Figura 4.23b. Observăm prezența a unei singure legături de hidrogen convenționale, cu aminoacidul GLN189, a unei legături de hidrogen π -donor cu aminoacidul CYS145, a unei legături de hidrogen π -sulf cu MET49, și trei legături π -alchil, cu aminoacizii LEU27 și MET165.

Astfel, cercetările computaționale au arătat că atât acidul dihidroxifumaric cât și toți derivații sintetizați au valorile afinității de legare cu proteaza principală M^{pro} similare și chiar mai bune decât acidul ascorbic, legându-se în același buzunar proteic. În viitor, se recomandă efectuarea simulărilor de dinamică moleculară pentru studii mai aprofundate ale interacțiunilor dintre compușii cercetați și diferite fragmente proteice ale virusului SARS-CoV-2.

4.9. Concluzii la capitolul 4

1. Pentru prima dată au fost identificați 45 de izomeri ai acidului dihidroxifumaric, inclusiv 23 de forme cetonice și 22 enediolice
2. S-a determinat abundența relativă a izomerilor, s-au determinat trei cele mai abunde specii și raportul lor în gaz și apă.
3. S-au calculat energia de activare (E_a), frecvența imaginară (ν) și energia liberă de activare Gibbs (ΔG^\ddagger) pentru interconversiile enediol-enediol și ceto-ceto (izomerizare), cât și pentru procesul de tautomerizare.
4. Au fost calculați indicii pentru reactivitatea globală a moleculelor studiate și a fost demonstrată validitatea procedurii KID în apă și metanol
5. Au fost calculați și comparați indicii de reactivitate locală a moleculelor studiate, funcțiile fukui, descriptorul dual, funcțiile Parr și indicele local al diferenței de reactivitate în vid, în apă și metanol.
6. S-a studiat corelația dintre indicele local al diferenței de reactivitate R_k și activitatea antioxidantă a moleculelor studiate față de DPPH[•] și ABTS^{•+}.
7. Au fost identificați și a fost calculată energetica orbitalilor moleculari de frontieră HOMO și LUMO, precum și a unor orbitali responsabili pentru nucleofilitatea și electrofilitatea

atomilor de oxigen hidroxilici din fragmentul enediolic pentru derivații cercetați, în apă și metanol.

8. A fost dedus din rezultatele calculelor computaționale că cel mai probabil mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă a DFH₄ *in vacuo* este mecanismul HAT, iar în apă - mecanismul SPLET.
9. Au fost estimate proprietățile de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate a derivaților cercetați, care au demonstrat proprietăți moderate similare medicamentului.
10. Au fost construite radarele de biodisponibilitate a substanțelor cercetate, demonstrând proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor.
11. Prin metoda andocării moleculare a fost demonstrat potențialul semnificativ de inhibiție a proteazei principale a virusului SARS-CoV-2 de către toți compușii supuși studiului.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluziile generale, formulate în baza rezultatelor obținute, se bazează în totalitate pe contribuția proprie a autorului și demonstrează realizarea obiectivului și sarcinilor, expuse în Introducere.

1. Au fost obținuți zece derivați stabili ai acidului dihidroxifumaric, care au fost caracterizați prin analiza elementală și următoarele metode spectroscopice: UV/Vis, FT-IR, RMN ^1H și ^{13}C .

2. Pentru prima dată 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.

3. Pentru DFH₄ și derivații obținuți a fost investigată activitatea antioxidantă cu radicalul DPPH[•] și s-au determinat constantele stoichiometrice, timpul de reacție până la echilibru, valorile PAR și EC₅₀ precum și ordinele de reacție față de reactanți și constantele de viteză, fapt care a permis descrierea legităților vitezei de reacție pentru interacțiunea dintre DPPH[•] cu DFH₄ și derivații acestuia. Prin metode computaționale a fost arătat cel mai probabil mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă a DFH₄.

4. În testul cu ABTS^{•+} au fost identificați patru derivați din șirul substanțelor sintetizate, care au demonstrat o bună activitate antioxidantă și prezintă interes pentru cercetări ulterioare: esterul EDM **2**, anilida **5**, acidul MBD **12** și diolul BBD **13**.

5. Pentru prima dată au fost identificați prin metode de calcul, 45 de izomeri ai acidului dihidroxifumaric, inclusiv 23 de forme cetonice și 22 enediolice, s-a arătat existența a trei cei mai stabili izomeri, 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 DFH₄, s-au determinat parametrii cinetici și termodinamici, a fost calculată energia orbitalilor responsabili pentru nucleofilitatea și electrofilitatea atomilor de oxigen hidroxilici din fragmentul enediolic pentru derivații cercetați, în apă și metanol.

6. 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.

7. 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.

Recomandări

1. Se recomandă laboratoarelor de sinteză aplicarea metodelor computaționale, propuse în lucrare, în procesul de design și obținere a noilor derivați cu proprietăți dirijate (de ex. cu caracter antioxidant, antiradicalic, antifungic, antimicrobian).

2. Se recomandă industriilor alimentară, viti-vinicolă și farmaceutică utilizarea acidului dihidroxifumaric și a derivaților săi pentru crearea și menținerea calității produselor.

3. Se recomandă instituțiilor de sănătate publică folosirea modelelor cu participarea antioxidantilor folosiți în lucrare pentru diminuarea impactului virusului SARS-CoV-2 asupra sănătății omului.

4. Se recomandă complementarea cursurilor de licență/masterat/doctorat cu privire la metodele cuanto-chimice disponibile pentru cercetarea reactivității substanțelor chimice de interes.

BIBLIOGRAFIA

1. MARTEMUCCI, G., COSTAGLIOLA, C., MARIANO, M., D'ANDREA, L., NAPOLITANO, P., D'ALESSANDRO, A.G. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*. 2022, nr. 2, pp. 48–78. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>.
2. KENNEDY, B.K., BERGER, S.L., BRUNET, A., CAMPISI, J., CUERVO, A.M., EPEL, E.S., FRANCESCHI, C., LITHGOW, G.J., MORIMOTO, R.I., PESSIN, J.E., RANDO, T.A., RICHARDSON, A., SCHADT, E.E., WYSS-CORAY, T., SIERRA, F. Geroscience: Linking ageing to chronic disease. *Cell*. 2014, nr. 159(4), pp. 709–713. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039>.
3. DE ARAÚJO, R., LÔBO, M., TRINDADE, K., SILVA, D.F., PEREIRA, N. Fibroblast growth factors: A controlling mechanism of Skin ageing. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2019, nr. 32(5), pp. 275–282. Disponibil: <https://doi.org/10.1159/000501145>.
4. SECARĂ, N., DUCA, G. Radicalii liberi în sistemele biologice: mecanisme de formare și de protecție a celulelor. *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2010, nr. 4(19), pp. 115-118. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/1623.
5. PRZEDBORSKI, S., JACKSON-LEWWIS, V. Experimental developments in movements disorders: update on proposed free radical mechanisms. *Current Opinion in Neurology*. 1998, nr. 11, pp. 335-339. Disponibil: doi: 10.1097/00019052-199808000-00009.
6. DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002, nr. 82(1), pp. 47–95. Disponibil: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
7. FERRARI, C.K., SOUTO, P. C., FRANÇA, E.L., HONORIO-FRANÇA, A.C. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: From effective defense to immunity evasion mechanisms. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*. 2011, nr. 59(6), pp. 441–448. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0144-z>.
8. 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, nr. 9. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>.
9. STONE, J.R., YANG, S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006, nr. 8(3-4), pp. 243–270. Disponibil: <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.243>.
10. LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and Functional Foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, nr. 4(8), pp. 118. Disponibil: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.
11. BHUIYAN M.A., HOQUE M.Z., HOSSAIN S.J., Free Radical Scavenging Activities of *Zizyphus mauritiana*. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2009, nr. 5(3), pp. 318-322.
12. DUCA GH., SYCHEV A. *Aspecte fundamentale și aplicative ale catalizei omogene cu compușii complecși ai metalelor de tranziție. Partea I*. Chișinău: CEP USM, 2002. (Rus.).
13. KREGEL, K.C., ZHANG, H.J. An integrated view of oxidative stress in aging: Basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2002, nr. 292(1), pp. 18–36. Disponibil: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2006>.
14. SOHAL, R.S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the ageing process. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002, nr. 33(1), pp. 37–44. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00856-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00856-0).
15. MAS-BARGUES, C., ESCRIVÁ, C., DROMANT, M., BORRÁS, C., VIÑA, J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021, nr. 709, pp. 108941. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>.

16. GARG, A., SHARMA, R., DEY, P., KUMAR, A. Food auto-oxidation: An overview. *Antioxidants Effects in Health*. 2022, pp. 43–68. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819096-8.00013-6>.
17. POLJSAK, B., KOVAČ, V., MILISAV, I. Antioxidants, Food Processing and health. *Antioxidants*. 2021, nr. 10(3), pp. 433. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/antiox10030433>
18. POKORNÝ, J., SCHMIDT, S. Natural antioxidant functionality during food processing. *Antioxidants in food*. 2001, pp. 331-354. Disponibil: <http://foodclinic.ir/wp-content/uploads/2016/05/Natural-antioxidant-functionality.pdf>
19. BENSID, A., EL ABED, N., HOUICHER, A., REGENSTEIN, J. M., ÖZOGUL, F. Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020, nr. 62(11), pp. 2985–3001. Disponibil: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1862046>.
20. BEN BRAÏEK, O., SMAOUI, S. Chemistry, safety, and challenges of the use of organic acids and their derivative salts in meat preservation. *Journal of Food Quality*. 2021, Article ID 6653190, 20 pagini. Disponibil: <https://doi.org/10.1155/2021/6653190>.
21. GOYAL, N., JEROLD, F. Biocosmetics: Technological Advances and future outlook. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023, nr. 30, pp. 25148–25169. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17567-3>.
22. 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.
23. FENTON, H. Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894, nr. 65, pp. 899-910. Disponibil: <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>.
24. FENTON, H. The Formation and Properties of a New Organic Acid. *British Association for the Advancement of Science Report*. 1895, pp. 663-671. Disponibil: <https://archive.org/details/reportofbritisha95brit/page/n19/mode/2up>.
25. FENTON, H., WILKS, W.A. Studies on Certain Aliphatic Hydroxy-acids. *Journal of the American Chemical Society*. 1912, nr. 101, pp. 1570-1582. Disponibil: <https://doi.org/10.1039/CT9120101570>.
26. HARTREE, E. F. On the Configuration of the So-called Dihydroxymaleic Acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1953, nr. 75(24), pp. 6244-6249. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja01120a041>.
27. 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, nr. 264(26), pp. 2130.
28. SECARĂ, N., DUCA, GH., MACAEV, F. Occurrence and chemistry of dihydroxyfumaric acid. *Chemistry Journal of Moldova*. 2011, nr. 6(1), pp. 29-44. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/12135/datacite.
29. WIELAND, H., FRANKE, W. Über den mechanismus der oxydationsvorgänge. XIV. Die activierung des sauerstoffs durch eisen, *Justus Liebigs Ann. Chem*. 1928, nr. 464, pp. 101–226. Disponibil: doi.org/10.1002/jlac.19284640109.
30. CHOW, C.T., VENNESLAND, B. The Nonenzymatic Decarboxylation of Diketosuccinate and Oxaloglycolate (Dihydroxyfumarate), *J. Biol. Chem*. 1958, nr. 233, pp. 997–1002. Disponibil: [doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64693-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64693-9).
31. FRANKE, W., BRATHUN, G. Über die Decarboxylierung der Dioxymaleinsäure, *Justus Liebigs Ann. Chem*. 1931, nr. 487, pp. 1–52. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/jlac.19314870102>.

32. HAY, R.W., HARVIE S.J. The uncatalysed and nickel(II) catalysed decarboxylation of dihydroxyfumaric acid. *Australian Journal of Chemistry*. 1965, nr. 18, pp. 1197-1209. Disponibil: <https://doi.org/10.1071/CH9651197>.
33. SECARĂ, N. Dihydroxyfumaric acid transformation, *Chemistry Journal of Moldova*. 2008, nr. 1(3), pp. 118-119. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/6787.
34. MÜLLER, D., PITSCH, S., KITTAKA, A., WAGNER, E., WINTNER, C. E., ESCHENMOSER, A. Chemie von α -Aminonitrilen†. Aldomerisierung von Glycolaldehydphosphat zu racemischen Hexose-2,4,6-triphosphaten und (in Gegenwart von Formaldehyd) racemischen Pentose-2,4-diphosphaten: rac -Allose-2,4,6-triphosphat und rac -Ribose-2,4-diphosphat sind die Reaktionshauptprodukte. *Helv. Chim. Acta*. 1990, nr. 73, pp. 1410–1468.
35. NAIDU SAGI, V., KARRI, P., HU, F., KRISHNAMURTHY, R. Diastereoselective Self-Condensation of Dihydroxyfumaric Acid in Water: Potential Route to Sugars. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, nr. 50(35), pp. 8127–8130. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/anie.201102045>.
36. ESCHENMOSER, A. The search for the chemistry of life's origin. *Tetrahedron*. 2007, nr. 63, pp. 12821–12844. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.10.012>.
37. WU, J., SERIANNI, A.S. Ring-opening kinetics of the d-pentofuranuronic acids. *Carbohydrate Research*. 1991, vol. 211, nr. 2, pp. 207-217, Disponibil: [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)80092-2](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)80092-2).
38. WARD, G. *Prebiotic inspiration to functional application: Synthetic and mechanistic investigations of glyoxylate and its formal dimer dihydroxyfumaric acid*: tz. de doct.în chimie. SUA, 2018, 270 pg. Disponibil: <https://smartech.gatech.edu/handle/1853/60796>.
39. GOODWIN, S., WITKOP, B. Chemistry of Dihydroxyfumaric Acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1954, nr. 76(22), pp. 5599-5603. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja01651a600>.
40. YALPANI, M., WILKE, G. Hydrated oxocarbons, IV. Silylation of 1, 1-dihydroxy compounds. *Chemische Berichte*. 1985, nr. 118(2), pp. 661-669. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/cber.19851180225>.
41. NEUBERG, C., SCHWENK, E. Die Gärung der Dioxymaleinsäure. *Biochem. J*. 1915, nr. 71, pp. 104-113.
42. NAIDU SAGI, V., PUNNA, V., HU, F., MEHER, G., KRISHNAMURTHY, R. *J. American Chemical Society*. 2012, nr. 134(7), pp. 3577–3589. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja211383c>.
43. ARMSTRONG, A., BLENCH, T.J. Recent synthetic studies on the Zaragozic Acids (squalostatins). *Tetrahedron*. 2002, nr. 58(46), pp. 9321–9349. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(02\)00993-6](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(02)00993-6).
44. NICEWICZ, D.A., SATTERFIELD, A.D., SCHMITT, D.C., JOHNSON, J.S. Self-consistent synthesis of the squalene synthase inhibitor Zaragozic acid C via controlled oligomerization. *Journal of the American Chemical Society*. 2008, nr. 130(51), pp. 17281 – 17283. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja808347q>.
45. 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, nr. 65(11), pp. 1303–1315. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1884-8>.
46. ALANNAN, M., FAYYAD-KAZAN, H., TRÉZÉGUET, V., MERCHED, A. Targeting lipid metabolism in liver cancer. *Biochemistry. American Chemical Society*. 2020, nr. 59(41), pp.3951-3964. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00477>.

47. BANGA, I., SZENT-GYORGYI, A. Dioxymaleinsäure-Oxydase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*. 1938, nr. 255(1-3), pp. 57–60. Disponibil: <https://doi.org/10.1515/bchm2.1938.255.1-3.57>.
48. BANGA, I., PHILIPPOT, E. Über die Dioxymaleinsäureoxydase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*. 1939, nr. 258(4), pp. 147–159. Disponibil: <https://doi.org/10.1515/bchm2.1939.258.4.147>.
49. SWEDIN, B., THEORELL, H. Dioximaleic Acid Oxidase Action of Peroxidases. *Nature*. 1940, nr. 145, pp. 71–72. <https://doi.org/10.1038/145071b0>.
50. DUCA, GH. *Mecanismeale proceselor ecochimice în mediul acvatic*, tz. de doct.în chimie. Chişinău, 1979, 150 p.
51. STAFFORD, H.A., MAGALDI, A., VENNESLAND, B. Enzymatic Oxidation of DPNH by Diketosuccinate and Dihydroxyfumarate. *Science*. 1954, nr. 120, pp. 265-266. Disponibil: <https://doi.org/10.1126/science.120.3111.2>.
52. STEPANOW, A., KUSIN. A. Synthesis of a carbohydrate chain by means of enzymes. 6. Resynthesis of glycogen in muscle. *Bernd. deutsch. chem. Gesellsch.* 1934, nr 67, pp. 723-726.
53. FUKUNAGA, K. Studies on the metabolism of dihydroxyfumarate, hydroxypyruvate and their related compounds, I. Enzymatic formation of xylulose in rat liver. *Journal of Biochemistry*. 1960, nr. 47(6), pp. 741-744. Disponibil: https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/47/6/47_6_741/_pdf.
54. MOROWITZ, H.J., KOSTELNIK, J. D., YANG, J., CODY, G.D. The origin of intermediary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, nr. 97, pp. 7704 – 7708. Disponibil: <https://doi.org/10.1073/pnas.110153997>.
55. ESCHENMOSER, A. On a Hypothetical Generational Relationship between HCN and Constituents of the Reductive Citric Acid Cycle, *Chemistry and Biodiversity*. 2007, nr. 4, pp. 554–573. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790050>.
56. NAIDU SAGI, V., PUNNA, V., HU, F., MEHER, G., KRISHNAMURTHY, R. *Journal of American Chemical Society*. 2012, nr. 134(7), pp. 3577–3589. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja211383c>.
57. ROHLFING, D.L. The catalytic decarboxylation of oxaloacetic acid by thermally prepared poly-alpha-amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1967, nr. 118(2), pp. 468-474. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90375-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90375-x).
58. BUTCH, C., COPE, E.D., POLLET, P., GELBAUM, L., KRISHNAMURTHY, R., LIOTTA, C. L. Production of tartrates by cyanide-mediated dimerization of glyoxylate: A potential abiotic pathway to the citric acid cycle. *Journal of the American Chemical Society*. 2013, nr. 135(36), pp. 13440–13445. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja405103r>.
59. BUTCH, C., WANG, J., GU J., VINDAS, R., CROWE, J., POLLET, P., GELBAUM, L., LESZCZYNSKI, J., KRISHNAMURTHY, R., LIOTTA, C. pH-controlled reaction divergence of decarboxylation versus fragmentation in reactions of dihydroxyfumarate with glyoxylate and formaldehyde: parallels to biological pathways. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2016, nr. 29(7), pp. 352–360. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/poc.3542>.
60. MENOR-SALVAN, M. R., MARIN-YASELI, A. New Route for the Prebiotic Synthesis of Nucleobases and Hydantoins in Water/Ice Solutions Involving the Photochemistry of Acetylene, *Chemistry A European Journal*. 2013, nr. 19, pp. 6488 – 6497. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/chem.201204313>.
61. GUZMAN, I., MARTIN, S. T. Photo-production of lactate from glyoxylate: how minerals can facilitate energy storage in a prebiotic world. *Chemical Communications*. 2010, nr. 46, pp. 2265–2267. Disponibil: <https://doi.org/10.1039/B924179E>.

62. ZUBAREV, D.Y., RAPPOPORT, D., ASPURU-GUZIK, A. Uncertainty of prebiotic scenarios: the case of the non-enzymatic reverse tricarboxylic acid cycle. *Scientific Reports*. 2015, nr. 5(1), pp. 8009. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/srep08009>.
63. LYNEN, F., SCHERER, H. Die Darstellung der Oxalbernsteinsäure und das Fermentsystem ihrer Decarboxylierung. Zum biologischen Abbau der Essigsäure. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*. 1948, nr. 560(2), pp. 163-190. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/jlac.19485600202>.
64. BOMSTEIN, R. A., JOHNSON, M. J. The mechanism of formation of citrate and oxalate by *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*. 1952, nr. 198(1), pp.143-153. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55565-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55565-4).
65. WEINHOUSE, S., FRIEDMANN, B. Metabolism of labeled 2-carbon acids in the intact rat. *Journal of Biological Chemistry*. 1951, nr. 191(2), pp. 707-717. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55975-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55975-5).
66. McMURRY, J., BEGLEY, T.P. *The Organic Chemistry of Biological Pathways*. Roberts and Company Publishers: Greenwood Village, CO, USA, 2005. ISBN-13: 978-1936221561.
67. RODOPULO, A. K. *Bases of winemaking biochemistry* (in Russian). Moscow: Light and food industry Publishing, 1983.
68. XU, J., DUCA, G., AHMED, S. E., GARCÍA MÁRQUEZ, F. P., HAJIYEV, A. (Eds.). *Proceedings of the Fourteenth International Conference on Management Science and Engineering Management. Advances in Intelligent Systems and Computing*. 2021, 320p. Electronic ISSN 2194-5365. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-49889-4>.
69. GONTA, M., SYCHEV, A., DUCA, GH., BATIR, D. Efectul acidului dihidroxifumaric asupra oxidării (+) catechinei cu reactivul Fenton. *Chimia Coordinativă (în limba rusă)*. 1991, nr. 19 (12), pp. 1654-1657.
70. FERRER-GALLEGO, R., PUXEU, M., MARTÍN, L., NART, E., HIDALGO, C., ANDORRÀ, I. Microbiological, physical, and chemical procedures to elaborate high-quality SO₂-free wines. *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*. 2018. Disponibil: <https://doi.org/10.5772/intechopen.71627>.
71. JAGATIĆ KORENIKA, A.-M., BILOŠ, J., KOZINA, B., TOMAZ, I., PREINER, D., JEROMEL, A. Effect of different reducing agents on aromatic compounds, antioxidant and chromatic properties of Sauvignon Blanc wine. *Foods*. 2020, nr. 9(8), pp. 996. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/foods9080996>.
72. 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, p. 173.
73. SYCHEV, A., DUCA, GH. Utilizarea acidului dihidroxifumaric pentru îmbunătățirea calității vinurilor seci. *Horticultura, viticultura și vinificație în Moldova (în limba rusă)*. 1985, nr. 12, pp. 38-40.
74. SYCHEV, A., DUCA, GH. Cataliza oxidării acidului dihidroxifumaric. V. Mecanismul oxidării acidului dihidroxifumaric cu oxigenul în prezența ionilor de cupru. *Revista de chimie fizică (în limba rusă)*. 1983, nr. 57(8), pp. 1938-1941.
75. DUCA, GH., SCUTARU, I., SYCHEV, A. Cinetica interacțiunii iodului cu acidul dihidroxifumaric. *Revista de chimie fizică (în limba rusă)*. 1987, nr. 61(8), pp. 2266-2268.
76. SYCHEV A., POSTOLATII T., DUCA, GH., GONȚA, M. *Metodă de stabilizare a materialelor vitivinicole*, Certificat de autor URSS, Nr. 1159946. Moscova, 1985.
77. CLARK, A. C. The production of yellow pigments from (+)-catechin and dihydroxyfumaric acid in a model wine system. *European Food Research and Technology*. 2007, nr. 226(4), pp. 925–931. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0615-y>.

78. GONȚA, M. *Transformarea nitraților, nitriților, formarea N-nitrozaminelor și utilizarea inhibitorilor în procese redox*: tz. de doct. hab. în chimie. Chisinau, 2009.
79. 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"*. Chișinău: Institut. Oncol. din Moldova, 1997, p. 111.
80. GONTA, M. The role of the natural antioxidants in the oxihemoglobin oxidation and the diminution of nitrite concentration. *Chemistry Journal of Moldova*. 2007, nr. 1(2), pp. 67-77. ISSN 1857-1727. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/6715.
81. PORUBIN, D., HECHT, S.S., LI, Z.-ZE, GONTA, M., STEPANOV, I. Endogenous formation of N'-nitrosornicotine in F344 rats in the presence of some antioxidants and grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, nr. 55(17), pp. 7199–7204. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jf0712191>.
82. PORUBIN, D. *Utilizarea compușilor obținuți din produse secundare vinicole în inhibiția proceselor de formare a N-nitrozoaminelor*: tz de doct. în chimie. Chișinău, 2009.
83. IONITA, P. The chemistry of DPPH· free radical and congeners. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, nr. 22(4), 1545. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/ijms22041545>.
84. BRAND-WILLIAMS, W., CUVÉLIER, M.E., BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lwt - Food Science and Technology*. 1995, nr. 28, pp. 25-30. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
85. BONDET, V., BRAND-WILLIAMS, W., BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *Lwt - Food Science and Technology*. 1997, nr. 30, pp. 609-615. Disponibil: 10.1006/FSTL.1997.0240.
86. GABER, N.B., EL-DAHY, S.I., SHALABY, E.A. Comparison of ABTS, DPPH, permanganate, and methylene blue assays for determining antioxidant potential of successive extracts from pomegranate and guava residues. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2023, nr.13, pp. 4011–4020. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01386-0>.
87. BAGSHAW, C. R. Stopped-flow techniques. *Encyclopedia of Biophysics*. 2013, pp. 2460–2466. ISBN: 978-3-642-16712-6. Disponibil: https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_59.
88. DUCA, GH., SECARĂ, N., DUCA, D. Physical methods of fast reactions investigation. *Chemistry Journal of Moldova*. 2008, nr. 3(1), pp. 22-30. Disponibil: [https://doi.org/10.19261/cjm.2008.03\(1\).15](https://doi.org/10.19261/cjm.2008.03(1).15).
89. NEESE, F., WENNMÖHS, F., BECKER, U., RIPLINGER, C. The Orca Quantum Chemistry Program Package. *The Journal of Chemical Physics*. 2020, nr. 152(22), pp. 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
90. NEESE, F. Software update: The orca program system—version 5.0. *WIREs Computational Molecular Science*. 2022. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/wcms.1606>.
91. BELLEC, N., GARRIDO MONTALBAN, A., WILLIAMS, D.B., COOK, A.S., ANDERSON, M.E., FENG, X., BARRETT, A.G., HOFFMAN, B.M. Porphyrzinediols: synthesis, characterization, and complexation to group IVB metallocenes. *The Journal of Organic Chemistry*. 2000, nr. 65(6), pp. 1774–1779. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jo9916840>.
92. GOLDBERG, D. P., MICHEL, S. L., WHITE, A. J., WILLIAMS, D. J., BARRETT, A. G., HOFFMAN, B. M. Molybdocene porphyrzines: A peripheral dithiolene metallacycle fused to a porphyrinic core. *Inorganic Chemistry*. 1998, nr. 37(9), pp. 2100–2101. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ic971498h>.
93. DREHER, D.D. US Patent 0090668. Disponibil: <https://www.freepatentsonline.com/y2005/0090668.html>.

94. **SECARĂ, N.**, DUCA, GH., MACAEV, F. Trimethylsilyl chloride catalized methoxy-dehydroxylation of the dihydroxyfumaric acid. *The Intern. Conf. dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Inst. of Chem. of AȘM*. Book of abstracts. Chisinau: CEP USM, 2009, p. 213.
95. BENAVIDES, J., SCHOEMAKER, H., DONA, C., CLAUSTRE, Z., DELAHAYE, M., PROUTEAU, M., MANOURY, P., ALLEN, J., SCATTON, B., LANGER, S., ARBILLA, S. In vitro and in vivo interaction of the novel selective histamine H1 receptor antagonist Mizolastine with H1 receptors in the rodent. *Arzneimittelforschung Drug Research*. 1995, vol 45, p. 551-558.
96. ISHIHARA, K., ICHIKAWA, T., KOMURO, Y., OHARA, S., HOTTA, K. Effect on gastric mucus of the proton pump inhibitor leminoprazole and its cytoprotective action against ethanol-induced gastric injury in rats. *Arzneimittelforschung Drug Research*. 1994, nr. 44(7), pp. 827-30. Disponibil: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7945516/>
97. KUBO, K., KOHARA, Y., IMAMIYA, E., SUGIURA, Y., INADA, Y., FURUKAWA, Y., NISHIKAWA, K., NAKA, T. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis and biological activity of benzimidazolecarboxylic acids. *Journal of medicinal chemistry*. 1993, nr. 36(15), pp. 2182–2195. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jm00067a016>.
98. SINGH, P.K., SILAKARI, O. Benzimidazole: Journey From Single Targeting to Multitargeting Molecule. *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules*. 2018, pp. 31-52, Disponibil: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102083-8.00002-9>.
99. **SECARĂ, N.** Stopped-flow spectrophotometric studies of the kinetics of interaction of dihydroxyfumaric acid with the dpph free radical, *Chemistry Journal of Moldova*. 2010, nr. 5(2), pp. 83-87. Disponibil: [https://doi.org/10.19261/cjm.2010.05\(2\).11](https://doi.org/10.19261/cjm.2010.05(2).11).
100. **SECARĂ, N.** Stopped-flow investigation of the interaction of the dihydroxyfumaric acid with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. *The Intern. Conf. dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Inst. of Chem. of AȘM, Chișinău*. Book of abstracts. Chisinau: CEP USM, 2009, p. 197.
101. ERDEM, G., ÖNER, C., ÖNAL, A.M., KISAKUREK, D., ÖGÜS, A. Free radical mediated interaction of ascorbic acid and ascorbate/Cu(II) with viral and plasmid dnas. *Journal of Bioscience*. 1994, nr. 19(1), pp. 9-17. Disponibil: <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/019/01/0009-0017>.
102. **BOLOCAN, N.**, DUCA, GH. Stopped-flow studies of the interaction of DFH₄ and its derivatives with DPPH'. *National conference with international participation "Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community"*. Chisinau, 29-30 septembrie, 2022. Book of abstracts. Chisinau: Editura USM, 2022, p. 205.
103. **SECARĂ, N.** Structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine and its inclusion complex with ethanol. *The Intern. Conf. dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Inst. of Chem. of AȘM, Chișinău*. Book of abstracts. Chisinau: CEP USM, 2009, p. 148.
104. **SECARĂ, N.**, DUCA, G., VLAD, L., MACAEV, F. Observations on the antioxidant activity of novel dihydroxyfumaric acid derivatives, *Chemistry Journal of Moldova*. 2010, nr. 5(2), pp. 59-67. Disponibil: [https://doi.org/10.19261/cjm.2010.05\(2\).08](https://doi.org/10.19261/cjm.2010.05(2).08).
105. MACAEV, F., **SECARA, N.**, DUCA, GH. Antioxidant Activity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives: an Analysis by the ABTS⁺ Decolorization Assay. *Chemistry&Biology Interface*. 2013, nr. 3(4), pp. 253-263. ISSN: 2249-4820
106. **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, p. 253-256.
107. RACZYŃSKA, E., KOSIŃSKA, W., OŚMIAŁOWSKI, B., GAWINECKI, R. Tautomeric equilibria in relation to pi-electron delocalization. *Chemical reviews*. 2005, nr. 105(10), pp. 3561–3612. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/cr030087h>.
 108. TRAVIN, S., KEMP, T. D., MUR, P. *Khim. Fiz. (USSR)*. 1986, nr. 5, pp. 1393-1404.
 109. TIRADO-RIVES, J., JORGENSEN, W. L. Performance of B3LYP density functional methods for a large set of organic molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008, nr. 4(2), pp. 297–306. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ct700248k>.
 110. BOLOCAN, N., DUCA, GH. DFT study of geometric isomerization and keto– enol tautomerization of dihydroxyfumaric acid. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*. 2021, nr. 4, pp. 341-353. ISSN 1224-7154. Disponibil: <https://doi.org/10.24193/subbchem.2021.4.25>.
 111. BOLOCAN, N., DUCA, GH. Geometric isomerization of dihydroxyfumaric acid. A DFT study in gas and solvent (water). *Modern directions of scientific research development. Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference*. Chicago, USA: BoScience Publisher, 2021, pp. 101-105.
 112. BOLOCAN, N., DUCA, G. DFT study of keto-enol tautomerism of dihydroxyfumaric acid in gas and water. *Innovations and prospects of world science. Proceedings of the 1st International scientific and practical conference*. Vancouver, Canada: Perfect Publishing, 2021, pp. 65-69.
 113. MARTÍNEZ-ARAYA, J.I., SALGADO-MORÁN, G., GLOSSMAN-MITNIK, D., Computational Nutraceuticals: Chemical Reactivity Properties of the Flavonoid Naringin by Means of Conceptual DFT. *Journal of Chemistry*. 2013, Article ID 850297. Disponibil: <https://doi.org/10.1155/2013/850297>.
 114. JANAK, J. F. Proof that $\delta E_{\delta n_i} = \epsilon$ in density-functional theory. *Physical Review B*. 1978, nr.18(12), pp. 7165–7168. Disponibil: 10.1103/PhysRevB.18.7165.
 115. 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, nr. 48(4), pp. 39–47. Disponibil: <https://doi.org/10.1155/2013/850297>.
 116. CRAMER, C. J. *Essentials of Computational Chemistry—Theories and Models*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, 2004, 2nd edition.
 117. MORELL, C., GRAND, A., TORO-LABBÉ, A. New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005, nr. 109(1), pp. 205–212, Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jp046577a>.
 118. PARR, R.G., YANG, W. Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity. *Journal of the American Chemical Society*. 1984, nr. 106(14), pp. 4049–4050. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ja00326a036>.
 119. CHATTARAJ, P. K., CHAKRABORTY, A., GIRI, S. Net electrophilicity. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2009, nr. 113(37), pp. 10068–10074. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jp904674x>.
 120. GORELSKY, S. AOMix Program for Molecular Orbital Analysis—Version 6.5, Ottawa, Canada, University of Ottawa. Disponibil: <http://www.sg-chem.net/>
 121. DOMINGO, L. R., PÉREZ, P., SÁEZ, J. A. Understanding the local reactivity in polar organic reactions through electrophilic and nucleophilic Parr functions. *RSC Advances*. 2003, nr. 3(5), pp. 1486–1494. Disponibil: <https://doi.org/10.1039/c2ra22886f>.
 122. CHATTARAJ, P. K., DULEY, S., DOMINGO, L. R. Understanding local electrophilicity/nucleophilicity activation through a single reactivity difference index.

- Organic & Biomolecular Chemistry*. 2002, nr. 10(14), pp. 2855. Disponibil: <https://doi.org/10.1039/c2ob06943a>.
123. 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, nr. 113(30), pp. 8660–8667. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jp902792n>.
 124. FUENTEALBA, P., FLOREZ, E., TIZNADO, W. Topological analysis of the Fukui function. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2010, nr. 6(5), pp. 1470–1478. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/ct100022w>.
 125. DUCA, GH., **BOLOCAN**, N. Understanding the Chemical Reactivity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives through Conceptual DFT. *Revista de Chimie*. 2021, nr. 72(4), pp. 162-174. Disponibil: <https://doi.org/10.37358/Rev.Chim.1949>.
 126. AYERS, P. W., MORRISON, R. C., ROY, R. K. Variational principles for describing chemical reactions: Condensed reactivity indices. *The Journal of Chemical Physics*. 2002, nr. 116(20), pp. 8731–8744. Disponibil: <https://doi.org/10.1063/1.1467338>.
 127. MORELL, C., GRAND, A., TORO-LABBE, A. Theoretical support for using the $\Delta f(r)$ descriptor. *Chemical Physics Letters*. 2006, nr. 425(4–6), pp. 342–346. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.05.003>.
 128. SZELAĞ, M., URBANIAK, A., BLUYSSSEN, H.A.R. A theoretical antioxidant pharmacophore for natural hydroxycinnamic acids. *Open Chemistry*. 2014, nr. 13(1). Disponibil: <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0001>.
 129. 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, nr. 2, pp. 37–51. Disponibil: http://fez.schk.sk/eserv/changeme:5011/acs_0045.pdf
 130. BAJ, A., CEDROWSKI, J., OLCZOWIK-GRABAREK, E., RATKIEWICZ, A., WITKOWSKI, S. Synthesis, DFT calculations, and in vitro antioxidant study on novel carba-analogs of vitamin E. *Antioxidants*. 2019, nr. 8(12), 589. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/antiox8120589>
 131. ÇAKMAK, E., ÖZBAKIR İŞİN, D. A theoretical evaluation on free radical scavenging activity of 3-styrylchromone derivatives: The DFT study. *Journal of Molecular Modeling*. 2020, nr. 26(5). Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04368-7>
 132. 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, nr. 7(1). Disponibil: <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
 133. KOLA, I., LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004, nr. 3(8), pp. 711–716. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/nrd1470>.
 134. LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, nr. 46(1-3), pp. 3–26. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
 135. GHOSE, A.K., VISWANADHAN, V.N., WENDOLOSKI, J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 1998, nr. 1(1), pp. 55–68. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
 136. VEBER, D.F., JOHNSON, S.R., CHENG, H.-Y., SMITH, B.R., WARD, K. W., KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates.

- Journal of Medicinal Chemistry*. 2002, nr. 45(12), pp. 2615–2623. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
137. EGAN, W.J., MERZ, K.M., BALDWIN, J.J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000, nr. 43(21), pp. 3867–3877. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jm000292e>.
 138. MUEGGE, I., HEALD, S.L., BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like Chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001, nr. 44(12), pp. 1841–1846. Disponibil: <https://doi.org/10.1021/jm015507e>.
 139. SZAKÁCS, G., VÁRADI, A., ÖZVEGY-LACZKA, C., SARKADI, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–TOX). *Drug Discovery Today*. 2008, nr. 13(9-10), pp. 379–393. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>.
 140. DI, L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2014, nr. 10(3), pp. 379–393. Disponibil: <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.876006>.
 141. YAP, C. W., LI, Z. R., CHEN, Y. Z. Quantitative structure–pharmacokinetic relationships for drug clearance by using statistical learning methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2006, nr. 24(5), pp. 383–395. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.10.004>.
 142. BOLOCAN, N., DUCA, GH. Estimation of ADMET properties of DFH₄ and its novel derivatives. *National conference with international participation "Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community"*. Chisinau, 29-30 septembrie, 2022. Book of abstracts. Chisinau: Editura USM, 2022, p. 206.
 143. HAN, Y., ZHANG, J., HU, C. Q., ZHANG, X., MA, B., ZHANG, P. In silico ADME and toxicity prediction of ceftazidime and its impurities. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, nr. 10. ISSN: 1663-9812. Disponibil: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00434>.
 144. BELHASSAN, A., CHTITA, S., ZAKI, H., ALAQARBEH, M., ALSAKHEN, N., ALMOHTASEB, F., LAKHLIFI, T., BOUACHRINE, M. In silico detection of potential inhibitors from vitamins and their derivatives compounds against SARS-CoV-2 main protease by using molecular docking, molecular dynamic simulation and ADMET profiling. *Journal of Molecular Structure*. 2022, nr. 1258, pp. 132652. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132652>.
 145. WU, C., LIU, Y., YANG, Y., ZHANG, P., ZHONG, W., WANG, Y., WANG, Q., XU, Y., LI, M., LI, X., ZHENG, M., CHEN, L., LI, H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>.
 146. KITCHEN, D. B., DECORNEZ, H., FURR, J. R., BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004, nr. 3, pp. 935–949. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/nrd1549>.
 147. LIU, Y., YANG, X., JIANHONG, G., SHUANG, C., ZHI-XIONG, X., YANG, C. CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Research*. 2022, nr. 50(W1), pp. W159–W164. Advance online publication. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac394>.
 148. 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, nr. 31(2), pp. 455–461. Disponibil: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

149. YANG, X., LIU, Y., GAN, J., XIAO, Z.-X., CAO, Y. FitDock: Protein–ligand docking by template fitting. *Briefings in Bioinformatics*. 2022, nr. 23(3). Disponibil: <https://doi.org/10.1093/bib/bbac087>.
150. LIU, Y., GRIMM, M., DAI, W.-TAO, HOU, M.-CHUN, XIAO, Z.-X., CAO, Y. CB-Dock: A web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019, nr. 41(1), pp. 138–144. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0228-6>.
151. TAHIR UL 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, nr. 10, pp. 313–319. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>.
152. YOSHINO, R., YASUO, N., SEKIJIMA, M. Identification of key interactions between SARS-CoV-2 main protease and inhibitor drug candidates. *Scientific Reports*. 2020, nr. 10, pp. 12493. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69337-9>.
153. WU, C., LIU, Y., YANG, Y., ZHANG, P., ZHONG, W., WANG, Y., WANG, Q., XU, Y., LI, M., LI, X., ZHENG, M., CHEN, L., LI, H. Analysis of therapeutic targets for SARS-COV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2020, nr. 10(5), pp. 766–788. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>.
154. ROBSON, B. Computers and viral diseases. preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-COV-2 (2019-ncov, covid-19) coronavirus. *Computers in Biology and Medicine*. 2020, nr. 119, pp. 103670. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103670>.
155. 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, nr. 582(7811), pp. 289–293. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.

Anexa 1. Actul de implementare

UNIVERSITATEA DE STAT
DIN MOLDOVA



MD-2009, Chișinău
Str. A. Mateevici, 60
Tel: (+373) 022-244-810
www.usm.md, email: rector@usm.md

FACULTATEA DE CHIMIE
ȘI TEHNOLOGIE CHIMICĂ



MD-2009, Chișinău
str. A. Mateevici, 60, bl. IV. of. 321
tel: (+373) 022-244-355
www.chimie.usm.md

ACT DE IMPLEMENTARE

Denumirea propunerii pentru implementare:

Studiul prin metode computaționale a proceselor de izomerizare/tautomerizare, a proprietăților farmacocinetice și a potențialului de inhibiție a proteazelor virale, în cadrul prelegerii *Cinetica proceselor chimice și biochimice în mediul ambiant*, cursul de *Chimie ecologică*

Autor:

Natalia Bolocan

Titular de curs:

Dr. hab., acad. Gheorghe Duca - profesor universitar

Locul și perioada desfășurării lucrărilor de implementare

Departamentul de Chimie, Facultatea de Chimie și Tehnologie, Universitatea de Stat din Moldova

Data: 20 septembrie 2022

Obiectul lucrărilor de implementare:

Utilizarea calculelor cuanto-chimice pentru modelarea teoretică a proceselor de izomerizare și tautomerizare a compușilor organici, pe exemplul acidului dihidroxifumaric; utilizarea metodelor computaționale pentru prognozarea proprietăților farmacocinetice ale compușilor de interes, precum și pentru modelarea interacțiunii dintre compușii cu activitate antioxidantă/antiradicalică și proteazele virale, pe exemplul proteazei principale a virusului SARS-CoV-2.

Conținutul lucrărilor de implementare și rezultatele obținute:

Pe baza acidului dihidroxifumaric, luat ca exemplu, a fost demonstrată determinarea detaliată a parametrilor geometrici de structură și a celor termodinamici pentru toți izomerii moleculei cercetate, precum și utilizarea unor ecuații fundamentale în chimia fizică (ex. Ecuația Boltzman, Eyring, etc.) în determinarea prin calcul atât a abundenței speciilor izomerice, cât și parametrilor cinetici și termodinamici pentru reacțiile de izomerizare și tautomerizare.

Luând ca exemplu acidul dihidroxifumaric și zece derivați noi ai acestuia, a fost demonstrată prognozarea proprietăților de absorbție, distribuție, metabolism excreție, toxicitate, biodisponibilitate și similitudine cu medicamentul prin utilizarea metodelor computaționale. De asemenea, pentru fiecare din substanțele menționate s-a demonstrat utilizarea metodei de andocare moleculară (molecular docking) la proteaza virală (unde ca exemplu a fost examinată proteaza principală a virusului SARS-Cov-2), demonstrându-se cum are loc legarea moleculelor de interes de structura proteică virală și inhibiția virusului.

Concluzie:

A fost demonstrată utilitatea calculelor cuanto-chimice și a metodele computaționale moderne pentru rezolvarea unui spectru larg de sarcini ale chimiștilor, inclusiv cu caracter aplicativ.

21.11.2022

Decanul Facultății de Chimie și Tehnologie Chimică
Dr., conf. univ.

Șef Departamentul Chimie Industrială și Ecologică
"Academician gheorghe Duca"
Dr. conf. univ.



Viorica Gladchi

Elena Bunduchi

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Natalia Bolocan, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice.

Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Natalia Bolocan



Data

18.04.2023

CV-ul CANDIDATULUI

Numele Bolocan
Prenumele Natalia
Data nașterii 27 octombrie 1984
Email Natalia_secara@yahoo.com
Telefon 069068281
Adresa instituțională Laboratorul de Chimie Fizică și Cuantică, Institutul de Chimie, str. Academiei 3, MD 2028, Chișinău, R. Moldova

[Google Scholar](#)

[ORCID](#)

Studii și activitatea profesională

2006 -2012, Cercetător științific, Institutul de Chimie, Chișinău
2021 - prezent
2007 - 2013, Redactor de limbă engleză, revista *Chemistry Journal of Moldova*, editată de Institutul de Chimie, Chișinău
2016 - prezent
2006-2009 Doctorantura în Chimie Fizică la Institutul de Chimie, Chișinău
2008-2009 Profesor, obiectul *Introducerea în specialitate (în limba engleză)*, Liceul Academiei de Științe a Moldovei, Chișinău
2002 - 2006 Licență în *Chimie și Tehnologie Chimică*, Universitatea de Stat din Moldova

Domenii de interes științific

Cinetica reacțiilor chimice, chimie computațională, studiul activității antioxidante prin metode experimentale și teoretice, cercetarea reactivității globale și locale a substanțelor antioxidante, modelarea computațională a proprietăților de adsorbție, metabolism, distribuție, excreție și toxicitate a compușilor antioxidanți.

Stagii

Februarie 2012 Stagiu în cadrul proiectului nr.324/11 "Acquisition of Services to Collect, Transportation and Neutralized / Dispose of the Toxic Wastes (identifiable and unidentifiable chemicals, Including original packaging ITS) performed in Moldova, organizat de SAVA GmbH & Co.KG, Germany
Martie 2011 TrainMiC Training of New Trainers (Belgia, or. Geel) organizat de către Comisia Europeană, Centrul Comun de Cercetare (JRC), Institutul pentru Materiale și Măsurători de Referință (IRMM)

Decembrie 2010 Sesiune internațională inovatoare a tinerilor specialiști din țările CSI Organizată de către Ministerul Sportului, Turismului și Politicii de Tineret al Rusiei, Rossotrudnichestvo (Agenția Federală pentru Afaceri CSI, compatrioți care locuiesc în străinătate și cooperare umanitară internațională), Consiliul Tineretului din statele membre CSI, cu sprijinul Fondului de Cooperare Umanitară Interstatală (IGSF) și cu asistența Centrului Internațional de Inovare pentru Nanotehnologie al Commonwealth-ului și a Universității de Stat din Moscova „Lomonosov”.

Cunoașterea limbilor

Limba maternă Română
Limbi străine Rusă (foarte bine), Engleză (foarte bine), Franceză (suficient).

Participarea în proiecte naționale

2020 - prezent 20.80009.5007.27. Mecanisme fizico-chimice a proceselor redox cu transfer de electroni implicate în sistemele vitale, tehnologice și de mediu

2011 Participant în echipa de tehnoredactare a *Dicționarului Poliglot de Chimie Ecologică*, editat de către Academia de Științe, 2012

2008 - 2009 Proiectul pentru tineri cercetători cu crearea primei baze de date a chimiștilor din Moldova și a primei biblioteci virtuale pentru chimiști cu acces liber *cheminfo.asm.md* (director de proiect)

2008 06.407.33T Implementarea tehnologiei de obținere a fungicidului de contact pe bază de cupru. Conducător al proiectului: dr. Aliona Mereuță

Participarea în proiecte internaționale

2009 - 2010 Bursa oferită de către Federația Mondială a Savanților

2006 - 2008 Proiect INTAS Ref. Nr. 05-104-7505
Optimization of tartaric acid and enotannins extraction from winery wastes and their utilization for the synthesis of new compounds with biological activity and antioxidant properties

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘTIINȚIFICE

1. Articole în diferite reviste științifice

1.1. în reviste internaționale cotate ISI și SCOPUS

1. **BOLOCAN, N.**, DUCA, GH. DFT study of geometric isomerization and keto– enol tautomerization of dihydroxyfumaric acid. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*. 2021, 4, pp. 341-353. ISSN 1224-7154. Disponibil: 10.24193/subbchem.2021.4.25.
2. **SECARĂ, N.**, DUCA, GH., MACAEV, F. Occurrence and chemistry of dihydroxyfumaric acid. *Chemistry Journal of Moldova*. 2011, 6(1), pp. 29-44. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/12135/datacite.
3. **SECARĂ, N.**, DUCA, GH., VLAD, L., MACAEV, F. Observations on the antioxidant activity of novel dihydroxyfumaric acid derivatives. *Chemistry Journal of Moldova*. 2010, 5(2), pp. 59-67. Disponibil:10.19261/cjm.2010.05(2).08.
4. **SECARĂ, 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), pp. 83-87. Disponibil:10.19261/cjm.2010.05(2).11.
5. DUCA, GH., **SECARĂ, N.**, DUCA, D. Physical methods of fast reactions investigation, *Chemistry Journal of Moldova*. 2008, 3(1), pp. 22-30. DOI:10.19261/cjm.2008.03(1).15
6. **SECARĂ, N.** Dihydroxyfumaric acid transformation. *Chemistry Journal of Moldova*. 2008, 1(3), pp. 118-119. Disponibil: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/6787.

1.2. în reviste din străinătate recunoscute

1. DUCA, GH., **BOLOCAN, N.** Understanding the Chemical Reactivity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives through Conceptual DFT. *Revista de Chimie*. 2021, 72(4), pp. 162-174. Disponibil: <https://doi.org/10.37358/Rev.Chim.1949>.
2. MACAEV, F., **SECARA, N.**, DUCA, GH. Antioxidant Activity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives: an Analysis by the ABTS⁺ Decolorization Assay. *Chemistry&Biology Interface*. 2013, 3 (4), 253-263. ISSN: 2249-4820.

1.3. în reviste naționale, categoria B

1. **SECARĂ, N.**, DUCA, GH. Radicalii liberi în sistemele biologice: mecanisme de formare și de protecție a celulelor. *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2010, 4(19), pp. 115-118. Disponibil: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/1623.

2. Articole în culegeri științifice

2.1. culegeri de lucrări ale conferințelor internaționale

1. **BOLOCAN, N.**, DUCA, GH. Geometric isomerization of dihydroxyfumaric acid. A DFT study in gas and solvent (water). *Modern directions of scientific research development*.

Proceedings of the 3rd International scientific and practical conference. Chicago, USA: BoScience Publisher, 2021, pp. 101-105.

2. **BOLOCAN, N., DUCA, GH.** DFT study of keto-enol tautomerism of dihydroxyfumaric acid in gas and water. Innovations and prospects of world science. *Proceedings of the 1st International scientific and practical conference.* Vancouver, Canada: Perfect Publishing, 2021, pp. 65-69.
3. **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, Russia, 2011, p. 253-256.

3. Teze ale conferințelor științifice

3.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

1. **SECARĂ, N.** Structure of 2,2-diphenyl-1-pycrylhydrazine and its inclusion complex with ethanol. *The Intern. Conf. dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Inst. of Chem. of AȘM, Chișinău.* Book of abstracts. Chisinau: CEP USM, 2009, p. 14
2. **SECARĂ, N.** Stopped-flow investigation of the interaction of the dihydroxyfumaric acid with the 2,2-diphenyl-1-pycrylhydrazyl free radical. *The Intern. Conf. dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Inst. of Chem. of AȘM, Chișinău.* Book of abstracts. Chisinau: CEP USM, 2009, p. 197.
3. **SECARĂ, N., DUCA, GH., MACAEV, F.** Trimethylsilyl chloride catalized methoxy-dehydroxilation of the dihydroxyfumaric acid. *The Intern. Conf. dedicated to the 50th anniversary from the foundation of the Inst. of Chem. of AȘM.* Book of abstracts. Chisinau: CEP USM, 2009, p. 213.
4. **BOLOCAN, N., DUCA, Gh.** Keto-enol tautomerism and geometrical isomerism of dihydroxyfumaric acid. A DFT study in gas and water. Abstract Book of *the 7th International Conference of Ecological and Environmental Chemistry, 3-4 March, 2022.* Chisinau: CEP USM, 2022, 1, p. 212. ISBN 978-9975-159-06-7.

3.2. în lucrările conferințelor științifice naționale

1. **BOLOCAN, N., DUCA, GH.** Stopped-flow studies of the interaction of DFH₄ and its derivatives with DPPH. *National conference with international participation "Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community". Chisinau, 29-30 septembrie, 2022.* Book of abstracts. Chisinau: Editura USM, 2022, p. 205.
2. **BOLOCAN, N., DUCA, GH.** Estimation of ADMET properties of DFH₄ and its novel derivatives. *National conference with international participation "Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community". Chisinau, 29-30 septembrie, 2022.* Book of abstracts. Chisinau: Editura USM, 2022, p. 206.