

**UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA**

Cu titlul de manuscris

C.Z.U: [544.222.3:544.4]:577.334(043.3)

**BOLOCAN NATALIA**

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

**144.01 – CHIMIE FIZICĂ**

Rezumatul tezei de doctor în științe chimice

**CHIȘINĂU, 2023**

Teza a fost elaborată în cadrul Institutului de Chimie, laboratorul Chimia Fizică și Cuantică.

**Conducător științific:**

**DUCA Gheorghe**      academician, doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar

**Referenți oficiali:**

**POVAR Igor**      doctor habilitat în științe chimice, conferențiar universitar,

**CIMPOEȘU Fănică**      doctor în științe chimice, profesor universitar, România

**Componența consiliului științific specializat:**

**GONȚA Maria**      doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar – președinte;

**BUNDUCHI Elena**      doctor în științe chimice, conferențiar universitar – secretar științific;

**STURZA Rodica**      doctor în științe chimice, doctor habilitat în științe tehnice, profesor universitar  
– membru;

**BĂLAN Iolanta**      doctor în științe chimice, conferențiar cercetător – membru;

**ARSENE Ion**      doctor în științe chimice, conferențiar universitar – membru.

Susținerea va avea loc la *25 mai 2023*, ora *14:00* în ședința Consiliului științific specializat D 144.01-22-10 în cadrul Universității de Stat din Moldova, str. A. Mateevici 60, blocul 4, aula 222, or. Chișinău, MD-2009.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Națională a Republicii Moldova, biblioteca Universității de Stat din Moldova și pe pagina web a ANACEC (<http://www.cnaa.md>).

Rezumatul a fost expediat la **18 aprilie 2023**

**Secretar științific al consiliului științific specializat,**

dr.

BUNDUCHI Elena

**Conducător științific**

acad., dr. hab. în științe chimice, prof. univ.

DUCA Gheorghe

**Autor**

BOLOCAN Natalia

© Bolocan Natalia, 2023

## CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII .....	4
1. ACIDUL DIHIDROXIFUMARIC: TRANSFORMĂRI CHIMICE, PARTICULARITĂȚI, IMPORTANȚA ÎN ORGANISMELE VII ȘI PROCESE TEHNOLOGICE .....	7
2. MATERIALE, ECHIPAMENT, METODE ȘI SINTEZA ORGANICĂ .....	8
3. STUDIUL EXPERIMENTAL AL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A DFH <sub>4</sub> ȘI A DERIVAȚILOR SĂI CU RADICALII DPPH• ȘI ABTS <sup>+</sup> .....	9
4. STUDII COMPUTAȚIONALE ALE DFH <sub>4</sub> ȘI A DERIVAȚILOR SĂI .....	17
CONCLUZII GENERALE .....	26
RECOMANDĂRI .....	27
BIBLIOGRAFIA .....	28
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘTIINȚIFICE .....	30
ADNOTARE .....	32
ANNOTATION .....	33
АННОТАЦИЯ .....	33

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

### *Actualitatea și importanța temei abordate*

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

Radicalii liberi sunt specii care posedă unul sau mai mulți electroni necupați pe orbitalii exteriori, fapt ce le conferă reactivitate înaltă la interacțiunea cu alte molecule din necesitatea de a cupla electronii și a forma un compus mai stabil. Organismele aerobe s-au adaptat pentru utilizarea cu succes atât a oxigenul molecular, cât și a produselor de reducere ale acestuia și astfel radicalii liberi au un rol esențial în mai multe procese biologice normale *in vivo*.

Totuși, în cantități mari, aceste specii devin periculoase. Interacțiunea acestor specii cu membranele lipidelor, acizii nucleici, proteine și enzime sau alte molecule mici conduce inevitabil la leziuni celulare. Leziunile cauzate celulelor de către radicalii liberi sunt considerate a fi unul dintre cei mai importanți factori care duc la îmbătrânire și boli degenerative, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, cataracta, bolile ficatului, inflamații, insuficiența renală ș.a.

Pe de altă parte, anume speciilor reactive de oxigen li se datorează și deteriorarea oxidativă a alimentelor, care implică oxidarea atât în faza apoasă (de exemplu, proteine), cât și în faza lipidică (de exemplu, lipide polinesaturate). În acest caz, mai întâi are loc formarea radicalilor liberi, care este deseori asociată cu faza apoasă.

Antioxidanții au capacitatea de a stabili sau dezactiva radicalii liberi, fiind prezenți în cantități mult mai mici față de substrat. Pentru organismele vii, acest proces înseamnă prelungirea vieții celulei, iar pentru alimente - garantarea calității adecvate și prelungirea termenului de păstrare.

Încă în anii '80 ai secolului trecut, de către echipa Acad. Duca, a fost observat faptul că DFH<sub>4</sub> participă în procesele oxidative ale vinului și restabilește formele oxidate ale polifenolilor, îmbunătățind calitatea vinurilor. Grație caracterului său antioxidant, DFH<sub>4</sub> 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 unor alimente și prevenirea formării *N*-nitrozaminelor (substanțe puternic cancerigene), în procesul de fabricare a țigărilor. Surse importante de precursori ai *N*-nitrozaminelor sunt alimentele preparate din carne, berea, cașcavalurile, peștele preparat, peștele uscat și laptele praf, toate aceste produse prezentând potențiale domenii de utilizare a DFH<sub>4</sub>.

Dezavantajele utilizării DFH<sub>4</sub> sunt câteva, și acestea derivă din structura acidului: același fragment enediolic care este responsabil pentru activitatea antioxidantă avansată, poate tautomeriza în forma cetonică care decarboxilează foarte ușor. În general, fragmentul enediolic este destul de labil, și DFH<sub>4</sub> se distruge foarte ușor în soluție, prin autocondensare sau oxidare, în special în prezența metalelor de tranziție. În acest context, sinteza derivaților DFH<sub>4</sub> prezintă un interes practic deosebit, scopul principal fiind obținerea compușilor stabili prin înlocuirea fragmentului carboxilic.

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. Teza este susținută în cadrul proiectului 20.8009.5007.27 “Mecanisme fizico-chimice a proceselor redox cu transfer de electroni implicate în sisteme vitale, tehnologice și de mediu” (2020-prezent).

***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 DFH<sub>4</sub>;
- determinarea activității antioxidante/antiradicalice a substanțelor cercetate cu utilizarea radicalilor DPPH• și ABTS<sup>•+</sup>;
- studiul legăturilor cinetice ce descriu reacțiile dintre DFH<sub>4</sub> și derivații acestuia cu radicalul stabil DPPH•;
- utilizarea metodelor cuantico-chimice pentru cercetarea proceselor de izomerizare și tautomerizare a DFH<sub>4</sub>, pentru calculul descriptorilor de reactivitate globală și locală a DFH<sub>4</sub> și a derivaților săi *in vacuo* și solvent; pentru determinarea celui mai probabil mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă a DFH<sub>4</sub>;
- estimarea prin metode computaționale a proprietăților farmaco-cinetice, a toxicității și a biodisponibilității derivaților cercetați;
- utilizarea metodei de andocare moleculară pentru modelarea efectului inhibitor al compușilor cercetați asupra proteazei principale a virusului SARS-CoV-2.

***Noutatea și originalitatea științifică*** rezidă în elaborarea unor metode noi de obținere a zece de derivați stabili ai DFH<sub>4</sub> (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, DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> există date limitate cu privire la sinteza derivaților aminici, inclusiv a celor cu un fragment heterociclic. În același timp, derivați ai DFH<sub>4</sub> 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 derivați benzimidazolici posedă diferite efecte farmacologice (antihistaminic, antiulcer, antihipertensiv) și sunt pe larg utilizați în tratamentul clinic. Derivatul anilinei pe bază de DFH<sub>4</sub> 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<sup>•</sup> 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, stoechiometriei și ordinului de reacție pentru etapa inițială a reacției, inaccesibilă până acum.

Cercetările cuanto-chimice au permis identificarea, pentru prima dată a celor trei izomeri ai DFH<sub>4</sub>, 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 DFH<sub>4</sub> 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 pot fi obținuți derivați ai acidului dihidroxifumaric 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, absorbția, 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<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>. Rezultatele au confirmat posibilitatea obținerii derivaților cu caracteristici antiradicalice pe baza DFH<sub>4</sub>, 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 DFH<sub>4</sub>, dintre care nouă compuși sunt noi, iar patru compuși posedă activitate antioxidantă/antiradicalică pronunțată față de radicalii DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup> demonstrată experimental și argumentată teoretic, având proprietăți similare medicamentelor, prezeze computațional, inclusiv proprietăți farmaco-cinetice și de toxicitate, precum și o bună 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 substanțele cu caracter antioxidant/antiradicalic și radicalii DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup> în cadrul Laboratorului de Chimie Fizică și Cuantică. Rezultatele obținute pot fi interesante pentru firmele farmaceutice și 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.

**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 derivaților, 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 pentru cercetările cuanto-chimice (orbitali de frontieră, reactivitate globală și locală, potențial electrostatic, etc.), metode moderne de modelare a proprietăților farmacocinetice și metoda andocării moleculare.

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

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 [1]. O cantitate mărită de radicali liberi copleșește capacitatea organismului de a-i regla, și ca rezultat apare afecțiunea cunoscută sub numele de stres oxidativ [2], corelată cu o incidență mărită a bolilor degenerative, cum ar fi cancerul, bolile cardiovasculare, cataracta, bolile ficatului, inflamații, insuficiența renală ș.a. [3]. O altă direcție semnificativ influențată de formarea radicalilor liberi, la fel de importantă și strâns legată de sănătatea omului, este industria alimentară, cele mai susceptibile produse fiind carnea, mezelurile, uleiurile vegetale, lactatele și produsele de panificație [4].

În acest context, trebuie subliniată importanța cercetărilor referitor la obținerea derivaților cu caracteristici antioxidante/antiradicalice pe bază de DFH<sub>4</sub>, lărgind astfel baza compușilor cu potențial aplicativ în ramurile industriei ce au impact direct asupra sănătății omului și a calității vieții.

Acidul dihidroxifumaric, numit acidul (*E*)-2,3-dihidroxibut-2-enedioic conform IUPAC [5], este un *trans*-dihidroxiacid dicarboxilic, care se obține din acid tartric prin dehidrogenare lentă sau procese de oxidare. În soluție, DFH<sub>4</sub> există în două forme tautomerice aflate în echilibru dinamic, iar concentrația formelor tautomerice depinde de pH-ul soluției [6,7].

În sisteme naturale, în mod similar cu alți hidroxiacizi, precum acizii malic, lactic, glicolic, citric, tartric, DFH<sub>4</sub> are un rol important în natura vie, fiind un cunoscut intermediar în ciclurile acizilor di- și tricarboxilici [6]. Acidul 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 [7].

Cercetările privind originea vieții pe Pământ efectuate în cardul chimiei prebiotice din ultimii decenii, susțin ideea așa-numitului „scenariului glioxalic” postulat de Eschenmoser [8], conform căruia glioxalul și dimerul acestuia, DFH<sub>4</sub>, sunt priviți ca molecule centrale de la care a pornit sinteza

moleculelor biogene în „bulionul primordial” din care a apărut viața. Astfel, interesul față de acidul dihidroxifumaric a sporit semnificativ în ultimii ani, în încercarea cercetătorilor de a examina mai detaliat această ipoteză prin confirmarea unor secvențe mecanistice presupuse teoretic, cum ar fi de exemplu reacțiile în soluții apoase dintre dihidroxifumarat și câteva aldehide cu lanț scurt, unde s-a arătat că produsele de reacție (dihidroxiacetona, tetruloza și două pentuloze) s-au format cu o conversie cantitativă practic completă, ceea ce confirmă faptul că reacțiile dintre DFH<sub>4</sub> și aldehide ar putea constitui o cale de formare a carbohidraților [9].

În sinteza organică, pe lângă aplicații la sinteza de molecule mici, autorii [10] atestă posibilitatea implementării DFH<sub>4</sub> în sinteza totală. De exemplu, scheletul dimerului liniar al DFH<sub>4</sub> se regăsește în produse naturale complexe, cum ar fi acizii zaragozici (squalostatine). Aceștia 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* [11].

Pe lângă importanța DFH<sub>4</sub> în metabolismul organismelor vii și sinteza organică, interesul din perspectiva chimiei prebiotice, trebuie menționată și importanța acestui acid în industria alimentară [12], în special în oenologie, contribuind semnificativ la formarea calității vinurilor [13].

Sub acțiunea DFH<sub>4</sub> are loc micșorarea conținutului agenților de nitrozare, ceea ce duce la reducerea conținutului N-nitrozaminelor, substanțe puternic cancerigene, ce se pot forma în prezența aminelor în timpul fermentării diferitelor alimente și tutunului de țigări, precum și prin reacția *in vivo* a nitriflorilor (utilizați în calitate de conservanți în alimente) cu amine, în condițiile acide din tractul gastro-intestinal [14].

## 2. MATERIALE, ECHIPAMENT, METODE ȘI SINTEZA ORGANICĂ

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<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>; prezentarea tehnicilor de sinteză utilizate pentru obținerea celor zece derivați ai DFH<sub>4</sub>, descrierea softului computațional utilizat pentru efectuarea calculelor cuanto-chimice.

Metoda cu radicalul DPPH<sup>•</sup> este recunoscută pe larg și poate fi cu succes aplicată pentru a determina activitatea antioxidantă a multor compuși de interes, deoarece reacțiile de transfer de hidrogen sunt monitorizate prin înregistrarea schimbării benzii de absorbție vizibile DPPH<sup>•</sup> ( $\lambda_{\text{max}} = 520$  nm în 70% metanol la pH 4,0), care reflectă transformarea radicalului DPPH<sup>•</sup> în hidrazina corespunzătoare (DPPH-H) de către compusul antioxidant. Astfel, la interacțiunea radicalului DPPH<sup>•</sup> cu un antioxidant, se produce o decolorare a soluției de la violet la galben.

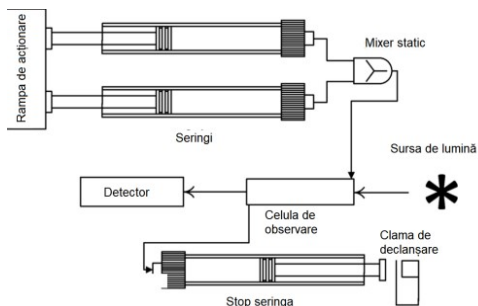
Activitatea de scindare a radicalului ABTS<sup>•+</sup> a compușilor studiați a fost determinată utilizând procedura clasică cu unele modificări. Pentru a determina capacitatea scindare a radicalului ABTS<sup>•+</sup> a compușilor studiați în raport cu standardul Trolox, a fost trasată curba de etalonare al acestuia, permițând determinarea capacității antioxidante în echivalenți Trolox (TEAC).

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. Sistemul de detecție se amplasează 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 2.1). 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 [15].

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 iar seringă II conținea soluție de compus cercetat de diferite concentrații. 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.



**Fig. 2.1. Reprezentarea grafică a principiului de lucru al aparatului stopped-flow**

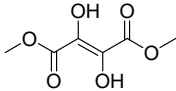
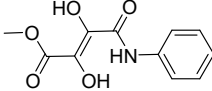
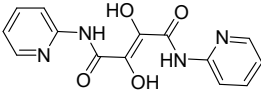
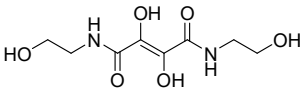
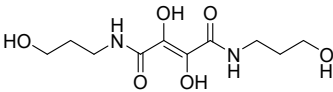
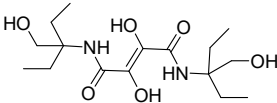
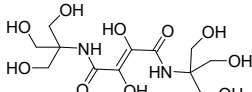
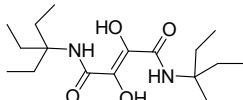
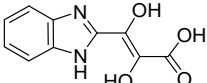
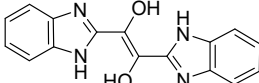
Studiile teoretice au fost efectuate cu ajutorul programului ORCA [16], care este un soft de determinare a structurii electronice de uz general. Statistica disponibilă a citărilor indică faptul că ORCA a devenit unul dintre cele mai utilizate programe din comunitatea chimică computațională. Avantajele 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 [16]. Posibilitatea de a studia influența solventului utilizând modelul universal de solvatare SMD (Solvation Model based on Density) implementat în soft.

### **3. STUDIUL EXPERIMENTAL AL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A DFH<sub>4</sub> ȘI A DERIVAȚILOR SĂI CU RADICALII DPPH<sup>•</sup> ȘI ABTS<sup>•+</sup>**

*Capitolul 3* descrie obținerea și caracterizarea derivaților sintetizați din DFH<sub>4</sub>, determinarea activității antioxidante a DFH<sub>4</sub> și a derivaților săi prin utilizarea radicalilor DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>; precum și studii legităților cinetice ce descriu reacțiile dintre acidul dihidroxifumaric și derivații acestuia cu radicalul DPPH<sup>•</sup>: viteze de reacții, constante de viteză, stoichiometria reacțiilor, ordine de reacție. Ca substanță de referință a fost studiat acidul ascorbic. Derivații obținuți sunt prezentați în Tabelul 3.1.

Având în structura sa fragmente carboxil-, hidroxil- și olefină, DFH<sub>4</sub> poate fi utilizat pentru a crea macrocicli porfirinici sau pirimidinici [17,18]. Totuși, în pofida progreselor evidente în această direcție, chimia acidului dihidroxifumaric **1**, rămâne a fi un domeniu slab studiat în multe aspecte.

**Tabelul 3.1. Structurile compușilor sintetizați din DFH<sub>4</sub>**

 <p style="text-align: center;"><b>2</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>
<p>dimetil 2,3-dihidroxi-fumarat</p>	<p>(<i>E</i>)-metil 2,3-dihidroxi-4-oxo-4-(fenilamino)but-2-enoat</p>
 <p style="text-align: center;"><b>6</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>7</b></p>
<p>2,3-dihidroxi-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-di(piridin-2-il)fumaramida</p>	<p>2,3-dihidroxi-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(2-hidroxietil)fumaramida</p>
 <p style="text-align: center;"><b>8</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>9</b></p>
<p>2,3-dihidroxi-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(2-hidroxi-propil)fumaramida</p>	<p>2,3-dihidroxi-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fumaramida</p>
 <p style="text-align: center;"><b>10</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>11</b></p>
<p>N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-bis(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2,3-dihidroxi-fumaramida</p>	<p>N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-di-tert-butil-2,3-dihidroxi-fumaramida</p>
 <p style="text-align: center;"><b>12</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>13</b></p>
<p>acidul (<i>E</i>)-3-(1H-benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)-2,3-dihidroxiacrilic</p>	<p>(<i>E</i>)-1,2-di(1H-benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)etene-1,2-diol</p>

Printre lucrările ce țin de modificarea acidului **1** există date limitate cu privire la sinteza derivaților aminici, inclusiv a celor cu un fragment heterociclic [7,19].

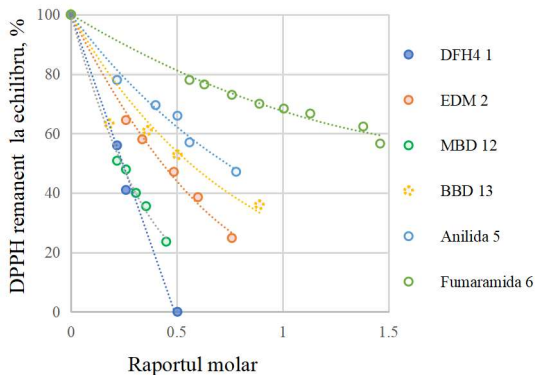
Crearea a noi compuși pe bază de acid dihidroxifumaric, căutarea a noi sintoni pentru sinteza dirijată și studiul relației "structură-proprietate" este o sarcină actuală, de mare interes practic, cărei îi este dedicată o parte din acest capitol.

În cadrul lucrării este descrisă o esterificare nouă a DFH<sub>4</sub> cu metanol sub acțiunea clorurii de trimetilsilan, cu obținerea esterului dimetilic 2. Încălzirea esterului 2 în soluția de anilină timp de două ore duce la formarea unui singur produs, a derivatului 5. Un rezultat interesant în reacția de amidare a esterului 2 a fost obținut la înlocuirea anilinei cu analogul ei ce conține azot - 2-aminopiridina. În urma reacției, a fost separat compusul 6. În cazul în care amidarea are loc la temperatura camerei cu utilizarea esterului 2 și a monoetanolaminei, produsul de reacție este bis-amidoalcoolul 7. În cadrul lucrării, a fost cercetată influența naturii omologilor monoetanolaminei asupra vitezei de reacție și a proprietăților fizico-chimice ale amidelor acidului DFH<sub>4</sub>. A fost sintetizat și caracterizat spectral omologul 8, precum și derivații 9, 10 și 11. Monobenzimidazolul a fost sintetizat prin condensarea catalizată de acid clorhidric a o-fenilenediaminei cu acidul 1 în baia de ulei la 135 °C în atmosferă de N<sub>2</sub>. Aceeași procedură poate fi utilizată pentru prepararea bis-benzimidazolului prin refluxarea a doi moli de diamină cu un mol de acid 1 în acid clorhidric de 4 N [20].

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<sup>+</sup> și radicalul DPPH<sup>•</sup>.

Curbele cinetice de consum a DPPH<sup>•</sup> la interacțiunea cu substanțele studiate 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. Legătura cinetică este determinată atât de structura moleculară a compusului studiat, cât și de stabilitatea radicalului de antioxidant format în urma reacției cu DPPH<sup>•</sup>.

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<sup>•</sup> cu 50%, numită concentrația eficientă la 50% (EC<sub>50</sub>). Pentru simplitate, deseori se utilizează valoarea 1/EC<sub>50</sub>, numită putere antiradicalică (PAR). Astfel, cu cât PAR este mai mare, cu atât antioxidantul este mai eficient.



**Fig. 3.1. Metoda grafică de determinare a constantelor stoichiometrice pentru reacția dintre DPPH<sup>•</sup> și derivații cercetați**

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<sup>•</sup>, în diapazonul de la 0,1 până la 10 (Figura 3.1.). Pentru fiecare raport molar, concentrația remanentă de DPPH<sup>•</sup> la echilibru a fost determinată și reprezentată grafic, permițând determinarea ulterioară din grafic a raportului molar care reduce jumătate din concentrația inițială de DPPH<sup>•</sup> (EC<sub>50</sub>).

O serie de compuși sintetizați au demonstrat activitate foarte redusă în testul DPPH<sup>•</sup>, scindând mai puțin de 10% de radical la o concentrație inițială a reagentului de până la 5 ori mai mare decât a radicalului DPPH<sup>•</sup>, în decurs de o oră. Aceasta se datorează probabil atât alterării structurii electronice inițiale a fragmentului enediolic, respectiv a indicilor de reactivitate globală și locală, datorită atașării anumitor fragmente structurale, cât și structurii geometrice ramificate a compușilor. Derivații cu activitate antioxidantă ne semnificativă în acest test sunt fumaramidele **7**, **8**, **9**, **10**, **11**. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 3.2.

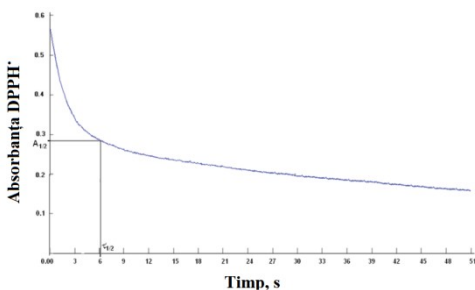
**Tabelul 3.2. Clasificarea compușilor testați în dependență de legătatea cinetică în reacția cu DPPH<sup>•</sup>, cu valorile respective ale PAR, EC<sub>50</sub> și ale constantei stoichiometrice**

	Compusul	EC <sub>50</sub>	PAR	σ, numărul de moli de DPPH <sup>•</sup> 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 <sub>4</sub> <b>1</b>	0.25	4	2	< 2 min
	Acidul MBD <b>12</b>	0.25	4	2	< 10 min
	Diolul BBD <b>13</b>	0.5	2	1	< 10 min
	EMD <b>2</b>	0.5	2	1	≈ 20-30 min
<i>Legitate cinetică lentă</i>	Anilida <b>5</b>	0.7	1.4	0.7	≈ 45-60 min
	Fumaramida <b>6</b>	2	0.5	0.25	≈ 45-60 min
	MEAD <b>7</b>	25	0.04	0.02	-
<i>Activitate antioxidantă neglijabilă</i>	MPAD <b>8</b>	10	0.1	0.05	-
	Fumaramida <b>9</b>	16.6	0.06	0.03	-
	Fumaramida <b>10</b>	8.3	0.12	0.06	-
	Fumaramida <b>11</b>	55.5	0.018	0.009	-

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

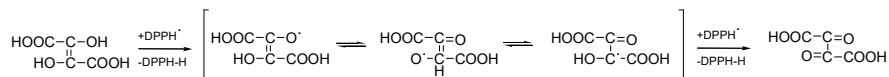
Pentru DFH<sub>4</sub> a fost posibilă determinarea constantelor stoichiometrice pentru cele două etape mecanistice. Figura 3.2 prezintă curba de micșorare a concentrației DPPH<sup>•</sup> la reducerea acestuia cu DFH<sub>4</sub>, atunci când inițial se iau concentrațiile [DFH<sub>4</sub>]<sub>0</sub> = [DPPH<sup>•</sup>]<sub>0</sub>/σ. Datele obținute au permis determinarea constantelor stoichiometrice pentru etapa rapidă și cea lentă, obținându-se valorile σ<sub>rapid</sub> ~ 1 și σ<sub>lent</sub> ~ 1.

Acest fapt sugerează că în etapa rapidă tot acidul dihidroxifumaric reacționează în raport de 1:1 cu DPPH<sup>•</sup>, după care radicalul format de DFH<sub>4</sub> se transformă într-un intermediar activ care interacționează cu radicalul rămas de DPPH<sup>•</sup> în raport de 1:1, însă mult mai lent. Trebuie menționat faptul că deși pentru DFH<sub>4</sub> **1**, constanta stoichiometrică  $\sigma$  corespunde cu numărul grupărilor OH, cercetările RMN nu au confirmat



**Fig. 3.2. Mișcarea concentrației de DPPH<sup>•</sup> la reducerea acestuia cu DFH<sub>4</sub>, atunci când inițial  $[DFH_4]_0 = ([DPPH^{\bullet}]_0/\sigma)$ , unde  $\sigma = 2$**

mecanismul propus anterior [20], dat de schema de mai jos (Figura 3.3), deoarece în urma reacției rapide molecula este scindată într-un șir de substanțe ce urmează a fi determinate în studiile viitoare.



**Fig. 3.3. Mecanismul ipotetic al reacției dintre DFH<sub>4</sub> și DPPH<sup>•</sup> 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<sup>•</sup> de asemenea prezintă două etape ce pot fi vizual deosebite pe grafic, valoarea constantei stoichiometrice  $\sigma$  pentru etapa rapidă este mai mică decât 1, ceea ce sugerează o mai mare complexitate a mecanismelor de reacție.

#### *Determinarea ordinilor de reacție față de reactanți și a constantelor de viteză*

În reacția antioxidantilor cu radicalul DPPH<sup>•</sup>, viteza ( $v$ ) reacției complete dintre  $\sigma$  moli de DPPH<sup>•</sup> și un mol de antioxidant (AH), în funcție de timp, poate fi definită conform ecuației:

$$v = \frac{-dC_{DPPH}}{\sigma \times dt} = k \times [DPPH^{\bullet}]_0^x \times [AH]_0^y \quad (3.1)$$

unde  $k$  este constanta de viteză a reacției;  $[DPPH^{\bullet}]_0$  și  $[AH]_0$  sunt concentrațiile inițiale a radicalului și, respectiv, a antioxidantului;  $\sigma$  este constanta stoichiometrică totală a reacției;  $x$  și  $y$  sunt ordinele de reacție față de DPPH<sup>•</sup> și AH, respectiv.

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

$$v = \frac{-dC_{DPPH}}{\sigma \times dt} = k_1 \times [DPPH^{\bullet}]_0^{x_1} \times [AH]_0^{y_1} + k_2 \times [DPPH^{\bullet}]_0^{x_2} \times [AH]_0^{y_2} \quad (3.2)$$

unde  $k_1$  este constanta de viteză a reacției rapide;  $k_2$  este constanta de viteză a reacției mai lente;  $[DPPH^{\bullet}]_0$  și  $[AH]_0$  sunt concentrațiile inițiale a radicalului sau antioxidantului, respectiv;  $\sigma$  este constanta stoichiometrică totală a reacției;  $x_1, y_1$  și  $x_2, y_2$  sunt ordinele de reacție față de DPPH<sup>•</sup> 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.

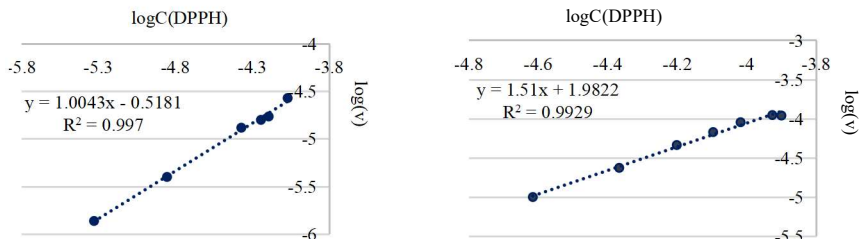
Pentru determinarea ordinilor parțiale de reacție a fost utilizată metoda vitezelor inițiale. Astfel, pentru determinarea ordinului de reacție pentru DPPH<sup>•</sup>, a fost calculată viteza inițială pentru câteva concentrații inițiale ale DPPH<sup>•</sup>, menținând constantă concentrația antioxidantului. Deși aplicarea acestei metode este limitată în cazul reacțiilor rapide, în cadrul studiilor de față a fost posibilă datorită utilizării metodei stop-flow, care a permis înregistrarea absorbției soluției de DPPH<sup>•</sup> din primele secunde ale reacției.

Ecuația (3.2) în forma logaritmică permite reprezentarea grafică a dependenței  $\log(v)$  în funcție de  $\log([DPPH^{\bullet}]_0)$ , 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<sup>•</sup>, 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 (3.2) cu condiția inițială  $[AH]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0/\sigma$ , iar prin conversia logaritmică ulterioară se ajunge la forma:

$$\log(v) = \log\left(\frac{k}{\sigma^y}\right) + (x + y) \times \log([DPPH^{\bullet}]_0) \quad (3.3)$$

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

Conform celor menționate mai sus, pentru DFH<sub>4</sub> 1, ecuațiile dreptelor din Figura 3.4 permit determinarea ordinilor de reacție parțiale și a constantei de viteză. Astfel, conform rezultatelor obținute, ordinul de reacție față de DPPH<sup>•</sup> este  $x = 1$ , și ordinul de reacție față de DFH<sub>4</sub> 1 este  $y = 0.5$ . Luând în considerație  $[DFH_4]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$  M și  $\log(k_{obs}) = -0.5181$ , se găsește valoarea constantei de viteză  $k = 15.2 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .



**Fig. 3.4. Determinarea ordinului de reacție  $x$  față de DPPH<sup>•</sup> (a), și a ordinului total de reacție  $x+y$  (b) în reacția radicalului DPPH<sup>•</sup> cu DFH<sub>4</sub> 1, unde  $[DFH_4]_0 = 2 \cdot 10^{-5}$  M (a) și  $[DFH_4]_0 = [DPPH^{\bullet}]_0/\sigma$  (b), la timpul de reacție  $t = 0.3$  s**

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.

În mod analogic au fost efectuate calcule cinetice pentru ceilalți compuși de interes. 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.

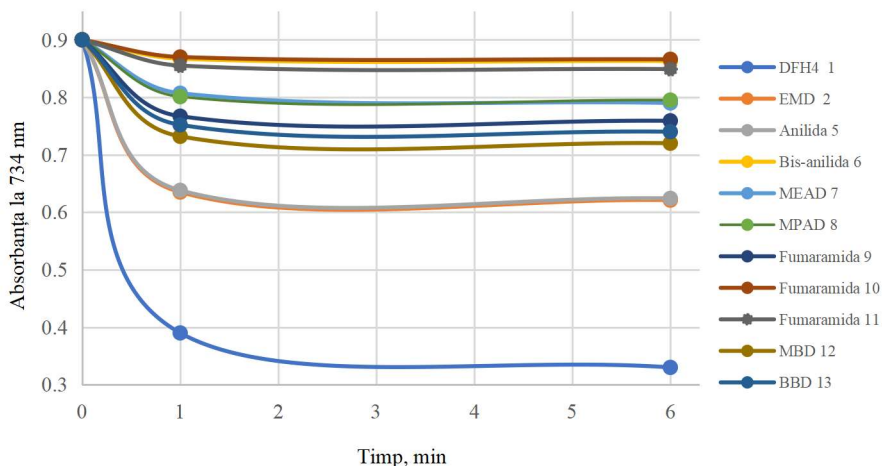
Rezultatele sumarizate ale calculelor cinetice sunt prezentate în Tabelul 3.3.

**Tabelul 3.3. 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, mol·L <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>	Constanta stoichiometrică (nr. de moli de DPPH' scindați)
<i>rapidă</i>	AAs	0.5	1	45.6·10 <sup>3</sup>	2
<i>mixtă (rapidă + lentă)</i>	DFH <sub>4</sub> <b>1</b>	0.5	1	15.2·10 <sup>3</sup>	2
	MBD <b>12</b>	1	1	29.3·10 <sup>3</sup>	2
	BBD <b>13</b>	1	1	16.7·10 <sup>3</sup>	1
	EMD <b>2</b>	1	1	3.7·10 <sup>3</sup>	1
<i>lentă</i>	Anilida <b>5</b>	1	1	26.5	0.7

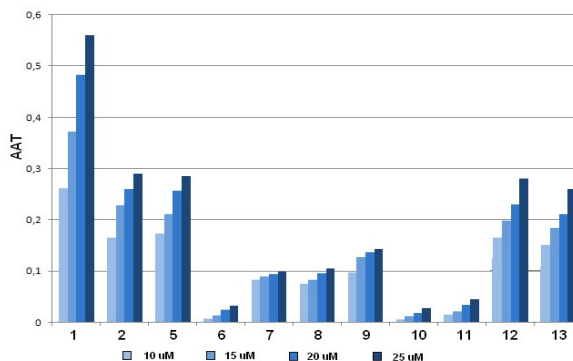
Conform rezultatelor obținute, doar în cazul a trei compuși, un mol de antioxidant scindează doi moli de radical DPPH' (acidul ascorbic, acidul dihidroxifumaric **1** și acidul MBD **12**). Un mol de ester dimetilic **2** și diol BBD **13** scindează câte un singur mol de radical, iar anilida **5** - 0.7 moli de DPPH'. Reacțiile antioxidanților 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. Cea mai mare constantă de viteză este caracteristica acidului ascorbic (45.6·10<sup>3</sup>), după care urmează MBD **12** (29.3·10<sup>3</sup>), DFH<sub>4</sub> și BBD **13** (15.2·10<sup>3</sup> și respectiv 16.7·10<sup>3</sup>), fiind urmați de esterul EMD **2** (3.7·10<sup>3</sup>) și anilida **5** (26.5).

Activitatea de captare a radicalilor ABTS<sup>+</sup> a compușilor studiați a fost determinată prin procedura clasică cu unele modificări. Curba de etalonare a fost trasată față de standardul Trolox (concentrațiile au variat între 0-15 mM și au fost diluate în etanol 95%), absorbanta a fost măsurată la 734 nm exact la 1 min și 6 min după amestecare. În Figura 3.5 este reprezentată scăderea absorbanței soluției de ABTS<sup>+</sup> în prezența antioxidanților de aceeași concentrație (25 μM) [21,22]. Din datele obținute (Figura 3.6), putem constata că la concentrația maximă testată, 25 μM, eficiența antioxidanților scade în șirul: DFH<sub>4</sub> **1** > EMD **2** ≈ anilida **5** > acidul MBD **12** > diolul BBD **13** > fumaramida **9** > MPAD **8** ≈ MEAD **7** > fumaramida **11** ≈ fumaramida **6** ≈ fumaramida **10**.



**Fig. 3.5. Descreșterea absorbantei soluțiilor de ABTS<sup>+</sup> în funcție de natura reducătorilor, pentru [Red]<sub>0</sub>= 25 μM**

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 DHF<sub>4</sub> 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**.



**Fig. 3.6. Dependența AAT de natura și concentrația reducătorilor**

În general, rezultatele obținute în testele cu DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>+</sup> 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 nesemnificativă în testul cu ABTS<sup>+</sup> iar derivații **7**, **8** și **9**, posedă dimpotrivă, o activitate semnificativ mai mare decât în testul cu DPPH<sup>•</sup>. Acest lucru demonstrează încă o dată specificitatea metodelor utilizate și necesitatea utilizării metodelor cât mai diverse pentru obținerea rezultatelor exhaustive.



#### 4. STUDII COMPUTAȚIONALE ALE DFH<sub>4</sub> ȘI A DERIVAȚILOR SĂI

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 cercetată utilizând testele cu radicalul DPPH<sup>•</sup> și cationul radical ABTS<sup>•+</sup> și s-a constatat că unele substanțe sintetizate au prezentat o activitate antioxidantă/antiradicală scăzută, deși structura fragmentului ene-diolic a fost păstrată [7,21,22].

Metodele computaționale ce permit modelarea moleculară prezintă o aplicabilitate extinsă în domeniul sistemelor chimice, fizice, biologice, întrucât acestea sunt capabile să precizeze 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 [23].

În pofida interesului de care se bucură recent DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub>. Grație structurii sale, în cazul DFH<sub>4</sub>, 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 DFH<sub>4</sub> și stările de tranziție (TS) corespunzătoare au fost optimizate fără constrângeri de simetrie la nivelul teoriei B3LYP, separat. Toate calculele au fost efectuate folosind pachetul de chimie cuantică ORCA.

Frecvențele vibraționale armonice calculate au arătat existența a 22 de structuri enediolice și 23 de structuri cetonice ale DFH<sub>4</sub> în punctele staționare în faza gazoasă. Izomerii enediolici au fost notați prin E1–E22 iar formele cetonice prin K1–K23.

Energia electronică (*E*), entalpia (*H*) și energia Gibbs (*G*) ale fiecărui conformer au fost calculate la 298.15 K *in vacuo* și în apă. Rezultatele arată că formele enediolice ale DFH<sub>4</sub> sunt mai stabile decât formele cetonice. Structura enediolului E1 a DFH<sub>4</sub> este cea mai stabilă formă și această stabilitate poate fi atribuită prezenței efectului legăturii de hidrogen intramoleculare, prezentă în structura E1 mai mult decât în altele, precum și stabilizării interacțiunilor orbitalilor datorită orientării *anti*-periplanare a hidroxil hidrogenului față de ceto-oxigen. În apă, cel mai stabil izomer este E2.

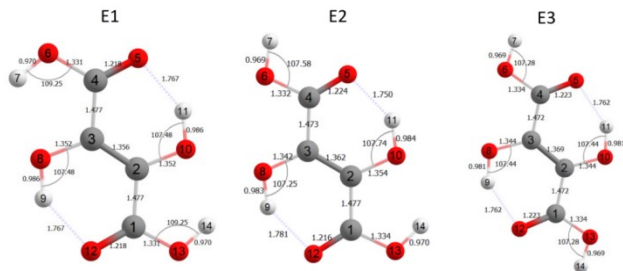
Rezultatele calculelor utilizând ecuația Boltzmann arată că în fază gazoasă, 99.78% din DFH<sub>4</sub> sunt reprezentate de trei structuri enediolice (Figura 4.1), după următoarea distribuție: izomerul cel mai stabil E1 reprezintă 87.4%, urmat de izomerul E2 cu o abundență relativă de 10.98%, apoi izomerul E3 cu un indice de abundență relativă de 1.4%. În apă, distribuția izomerilor este diferită, și anume: E1 - 31.%; E2 - 38.4% și E3 - 27%, cu un total de 97.2%.

Atât *in vacuo*, cât și în apă, structurile enediolice ale DFH<sub>4</sub> 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.

În continuare s-au cercetat 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. Interconversiile dintre formele de enediol și dintre formele cetonice au loc

atât prin transferul de proton, cât și prin rotație internă (rotație C–C și O–H. În transformările enediol-enediol, energiile de activare ale transferului de proton sunt în intervalul 135-160 kJ·mol<sup>-1</sup> iar pentru calea de rotație sunt în intervalul 5-75 kJ·mol<sup>-1</sup>. Pentru interconversiile dintre formele cetonice, energiile de activare sunt în intervalul 139–153 kJ·mol<sup>-1</sup> pentru calea de transfer al protonului și de 0.15–52 kJ·mol<sup>-1</sup> pentru rotația internă.



**Fig. 4.1. Structurile geometrice optimizate ale celor mai stabile trei structuri enediolice, in vacuo**

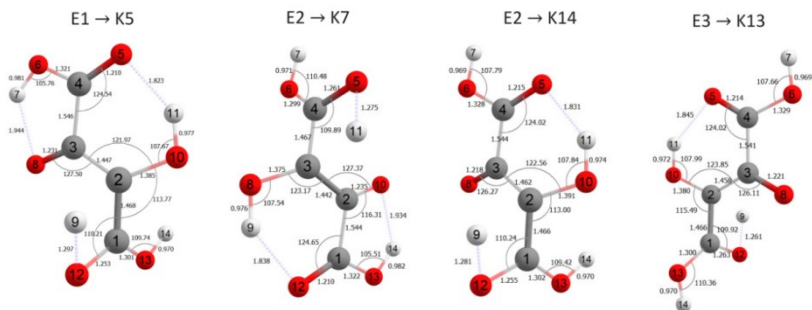
În cazul izomerilor enediolici și cetonici care poartă cel puțin o grupare carboxilică cu hidrogen orientat *sin*-periplanar, există o serie de transformări care au loc pe ambele căi, transfer de protoni și rotație internă, iar aceste interconversii pot fi considerate ca fiind reacții competitive. Cu 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.

Conform așteptărilor, rotația internă C–C are frecvența minimă (aproximativ –40 cm<sup>-1</sup>... –100 cm<sup>-1</sup>), fiind aproape o vibrație rotațională pură. Frecvența imaginară a reacției de transfer de proton este în jur de –1900 cm<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> ...–600 cm<sup>-1</sup>, 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 DFH<sub>4</sub>, 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 ( $E_a$ ) ale reacțiilor de transfer de hidrogen sunt mai mari în apă, decât în vid, probabil datorită stabilizării structurilor prin legături suplimentare de hidrogen cu moleculele de apă din mediul de solvent implicit.

Tautomerizarea ceto-enolică a fost cercetată pentru cele mai stabile trei structuri enediolice ale DFH<sub>4</sub> care reprezintă 99.78% în faza gazoasă și 97.3% în mediu apos. Structurile de tranziție optimizate în fază gazoasă sunt prezentate în Figura 4.2.

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



**Fig. 4.2. Structurile geometrice optimizate ale stărilor de tranziție în tautomeria ceto-enolică a celor mai stabili trei izomeri ai DFH<sub>4</sub>, 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  $\Delta G^\ddagger$  (energia liberă de activare Gibbs) sunt mai mici cu 50-80 kJ·mol<sup>-1</sup> în apă, decât în gaz, ceea ce indică faptul că apa participă în procesul de transfer de H, ușurându-l. Structurile ST arată că oxigenul carboxilic care formează legătura de hidrogen în structura enediolului este implicat în mecanismul transferului de protoni (Figura 4.2).

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

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (4.1),$$

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

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

$$K_{eq} = \exp(-\Delta G / RT) \quad (4.2),$$

Unde  $\Delta G = G_{298}^{produs} - G_{298}^{reactant}$  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 4.1 rezumă datele cinetice și termodinamice pentru stările de tranziție ale reacțiilor de izomerizare și tautomerizare ale celor mai stabile trei forme enediolice, în fază gazoasă și în apă. În faza gazoasă, E1 este specia cea mai stabilă, iar reacțiile de izomerizare  $E1 \leftrightarrow E2$  și  $E2 \leftrightarrow E3$  sunt caracterizate prin constante de echilibru de 0.13. În apă, izomerul cel mai stabil este E2, iar reacțiile de izomerizare  $E1 \leftrightarrow E2$  și  $E2 \leftrightarrow E3$  sunt caracterizate prin constante de echilibru de 1.21 și, respectiv, 0.61.

**Tabelul 4.1. Datele cinetice și termodinamice pentru stările de tranziție în procesele de izomerizare și tautomerizare a celor mai stabile trei structuri enediolice, în vid și în apă. Energiile sunt prezentate în  $\text{kJ mol}^{-1}$  iar constantele de viteză în  $\text{s}^{-1}$ .**

	Izomerie				Tautomerie ceto-enolică							
	$E1 \leftrightarrow E2$		$E2 \leftrightarrow E3$		$E1 \leftrightarrow K5$		$E2 \leftrightarrow K7$		$E2 \leftrightarrow K14$		$E3 \leftrightarrow K13$	
	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă	<i>In vacuo</i>	Apă
$\Delta E$	5.18	-0.59	5.24	-0.01	60.67	35.61	57.66	39.97	65.28	35.84	61.54	39.78
$\Delta H$	5.26	-0.53	5.27	0.58	59.55	40.44	56.50	42.57	63.70	35.38	59.77	42.12
$\Delta G$	5.07	-0.48	4.98	1.24	54.84	39.07	51.30	37.42	58.29	35.64	52.99	36.52
$Keq$	0.13	1.21	0.13	0.61	$2.46 \cdot 10^{-10}$	$1.41 \cdot 10^{-7}$	$10.29 \cdot 10^{-10}$	$2.73 \cdot 10^{-7}$	$0.61 \cdot 10^{-10}$	$5.61 \cdot 10^{-7}$	$5.21 \cdot 10^{-10}$	$3.93 \cdot 10^{-7}$
$\Delta G_1^\ddagger$	47.50	39.90	47.01	40.19	275.13	261.20	272.36	260.72	289.43	270.23	287.50	267.2
$\Delta G_2^\ddagger$	42.43	40.38	42.03	38.96	220.29	222.13	220.99	223.29	231.14	234.59	234.51	230.7
$k_1$	$2.96 \cdot 10^4$	$6.29 \cdot 10^5$	$3.61 \cdot 10^4$	$55.98 \cdot 10^4$	$3.91 \cdot 10^{-36}$	$1.01 \cdot 10^{-33}$	$1.19 \cdot 10^{-35}$	$1.23 \cdot 10^{-33}$	$1.22 \cdot 10^{-38}$	$2.66 \cdot 10^{-35}$	$2.66 \cdot 10^{-38}$	$8.96 \cdot 10^{-35}$
$k_2$	$2.29 \cdot 10^5$	$5.18 \cdot 10^5$	$2.69 \cdot 10^5$	$9.19 \cdot 10^5$	$1.59 \cdot 10^{-26}$	$71.85 \cdot 10^{-26}$	$1.19 \cdot 10^{-26}$	$4.49 \cdot 10^{-27}$	$1.99 \cdot 10^{-28}$	$4.70 \cdot 10^{-29}$	$5.11 \cdot 10^{-29}$	$2.26 \cdot 10^{-28}$

Rezultatele arată că prezența solventului (apa) influențează atât parametrii termodinamici, cât și cinetici. În soluție apoasă,  $\Delta E$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta G_1^\ddagger$  și  $\Delta G_2^\ddagger$  scad cu aproximativ 2-7  $\text{kJ mol}^{-1}$  în reacțiile de izomerizare și cu aproximativ 10-30  $\text{kJ mol}^{-1}$  în reacțiile de tautomerism. În faza gazoasă, constantele de echilibru ale transformărilor ceto-enol  $E1 \leftrightarrow K5$ ,  $E2 \leftrightarrow K7$ ,  $E2 \leftrightarrow K14$  și  $E3 \leftrightarrow K13$  sunt egale cu  $2.46 \cdot 10^{-10}$ ,  $10.29 \cdot 10^{-10}$ ,  $0.61 \cdot 10^{-10}$  și  $5.21 \cdot 10^{-10}$ , respectiv. În apă, aceste valori sunt de  $1.41 \cdot 10^{-7}$ ,  $2.73 \cdot 10^{-7}$ ,  $5.61 \cdot 10^{-7}$ ,  $3.93 \cdot 10^{-7}$ , respectiv, ceea ce demonstrează o creștere semnificativă a vitezelor reacțiilor directe.

Teoria DFT oferă instrumente extraordinare ce permit de a explica calitativ și de a prezice cantitativ reactivitatea chimică globală și locală a moleculelor. Pentru DFH<sub>4</sub> și toți derivații acestuia au fost calculați descriptorii globali, care măsoară susceptibilitatea totală a unui sistem la diferite tipuri de reacții, de exemplu, atacuri electrofile sau nucleofile, și atribuie o singură valoare întregii molecule. Au fost calculați primul potențial de ionizare  $I$ ; afinitatea față de electroni,  $A$ ; potențialul chimic ( $\mu$ ); electronegativitatea ( $\chi$ ); electrorigiditatea globală ( $\eta$ ) și electrofilicitatea ( $\omega$ ).

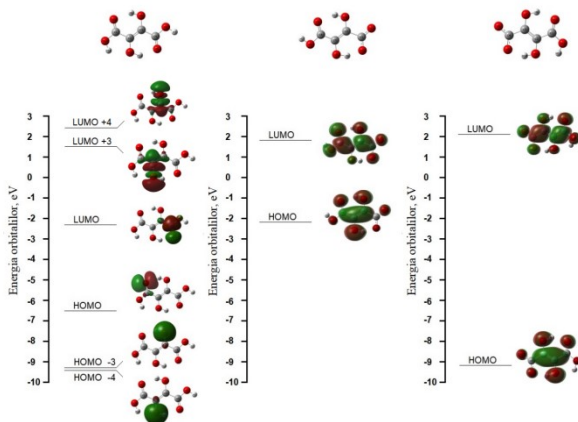
Pentru a valida utilizarea energiilor orbitalilor moleculari Kohn-Sham de frontieră pentru a calcula descriptorii de reactivitate calculați conform teoriei DFT conceptuale („teorema lui Koopman în cadrul DFT” [24]), descriptorii globali au fost calculați folosind ambele tehnici, potențialele de ionizare

$I$  și afinitățile electronice  $A$  (în eV), precum și energiile HOMO și LUMO, în fază gazoasă și în solvent (apă și metanol), folosind modelul de solvatare SMD. Rezultatele sugerează că Procedura KID este valabilă și poate fi utilizată în studii ulterioare ale compușilor înrudiți în solvent (apă, metanol). Calculele demonstrează că acidul DFH<sub>4</sub> **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**.

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

Pentru DFH<sub>4</sub> și toți derivații acestuia au fost calculate funcțiile Fukui, descriptorul dual, funcțiile Parr, descriptorul diferenței de reactivitate locală, potențialul electrostatic. Analiza rezultatelor a arătat că cele mai reactive situsuri sunt atomii de oxigen hidroxilici și atomii de carbon din legătura dublă a fragmentului enediolic, care s-au dovedit a fi în aproape în toate cazurile situsuri cu comportament ambifil (în apă și metanol). Compușii cercetați pentru care atomii de oxigen hidroxilici sunt situsurile cele mai reactive au arătat cea mai puternică activitate antiradicalică în experimentele efectuate, iar compușii pentru care atomii de carbon sunt situsurile cele mai reactive, nu au demonstrat activitate antiradicalică în testul cu DPPH, cu excepția compusului BBD **13**.

În continuare a fost aplicată teoria orbitalilor moleculari de frontieră (FMO), propusă de Kenichi Fukui în anii 1950. S-a calculat localizarea și energia orbitalilor HOMO și LUMO pentru compușii cercetați, precum și diferența de energie dintre aceștia. În cazul acidului DFH<sub>4</sub>, s-a descoperit că în solvent disocierea acidului scade bariera energetică dintre orbitalii de frontieră în special în cazul apei (Figura 4.3).

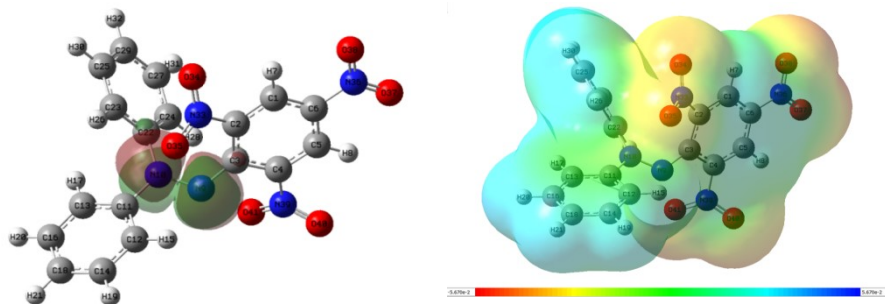


**Fig. 4.3. Energia orbitalilor și unii orbitali moleculari de frontieră ai izomerului E2 (stânga) al acidului DFH<sub>4</sub>, anionul cu hidrogenul din poziția *anti*- disociat (centru) și anionul cu hidrogenul din poziția *syn*- disociat (dreapta)**

Rezultatele demonstrează că pentru formele anionice ale DFH<sub>4</sub>, situsurile atomice ambifile O8 și O10 se află pe nivelele HOMO și LUMO (Figura 4.3), iar energia orbitalilor 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. Pentru calculele efectuate în metanol s-a utilizat geometria izomerului E3, care este cel mai abundent izomer în acest solvent. 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.

În cadrul lucrării au fost calculată energia orbitalilor moleculari de frontieră HOMO și LUMO, precum și unii orbitali responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea situsurilor O8 și O10 pentru toți derivații cercetați, în apă și metanol.



**Fig. 4.4. Geometria optimizată a DPPH• (a), orbitalii moleculari  $\beta$ -LUMO +3 responsabili pentru acceptul electronului de la antioxidant (b) și harta potențialului molecular electrostatic (c)**

Figura 4.4 prezintă orbitalii moleculari  $\beta$ -LUMO +3 ai DPPH• responsabili pentru acceptul electronului de la antioxidant, cu energia de -3.65 eV (stânga) și harta potențialului molecular electrostatic (dreapta). Radicalul DPPH• este un radical stabil din cauză că electronul liber este delocalizat deasupra moleculei, și astfel este evitată formarea dimerului. Din Figura 4.4 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 greutăți în procesul de apropiere pentru a reacționa.

Cercetarea a continuat cu calculul valorilor BDE, IP, PDE, PA și ETE într-un efort de a elucida cel mai probabil mecanism prin care DFH<sub>4</sub> își manifestă activitatea antioxidantă față de radicali liberi. Cu acest scop, au fost utilizate valorile entalpiilor calculate la 298.15 K la nivelul de teorie B3LYP/6-311+G(d,p), și au fost studiate prin metode computaționale cele trei mecanisme de acțiune prin care antioxidanții își pot manifesta rolul protector, și anume: mecanismul de transfer al atomului de hidrogen (HAT), mecanismul de transfer al unui electron, urmat de transferul de protoni (SET-PT) și mecanismul de transfer inițial al protonului, urmat de transferul electronului (SPLET) [25].

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<sup>-1</sup>) fiind mult mai mică decât valorile obținute pentru primele etape ale mecanismelor SET-PT (IP = 864.81 kJ mol<sup>-1</sup>) și SPLET (PA = 1357.21 kJ mol<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>, în timp ce valorile pentru IP sunt în jur de 500 kJ mol<sup>-1</sup>. Astfel, cel mai

probabil mecanism prin care se manifestă activitatea antioxidantă în soluție este mecanismul SPLET, iar cea mai activă specie este izomerul E1 ( $PA = 81.41 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), urmat îndeaproape de izomerul E2 ( $PA = 84.75 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). 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<sup>•</sup> 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  $PA = 84.75 \text{ kJ mol}^{-1}$ , față de structura din Figura 4.17(6), cu  $PA = 96.39 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Astfel, cel mai ușor este cedat radicalului anume hidrogenul din gruparea OH legată de carbonul adiacent grupării carboxilice cu orientare *syn*-.

În continuare au fost estimate proprietățile de absorbție, distribuție, metabolism, excreție și toxicitate a compușilor cercetați, utilizând serverele SwissADME [26] și pkCSM [27] care oferă modele computerizate ce permit evaluarea proprietăților farmacocinetice fără a recurge la studii experimentale costisitoare și de durată, determinând astfel probabilitatea ca derivații cercetați să devină potențiali candidați pentru dezvoltarea medicamentelor.

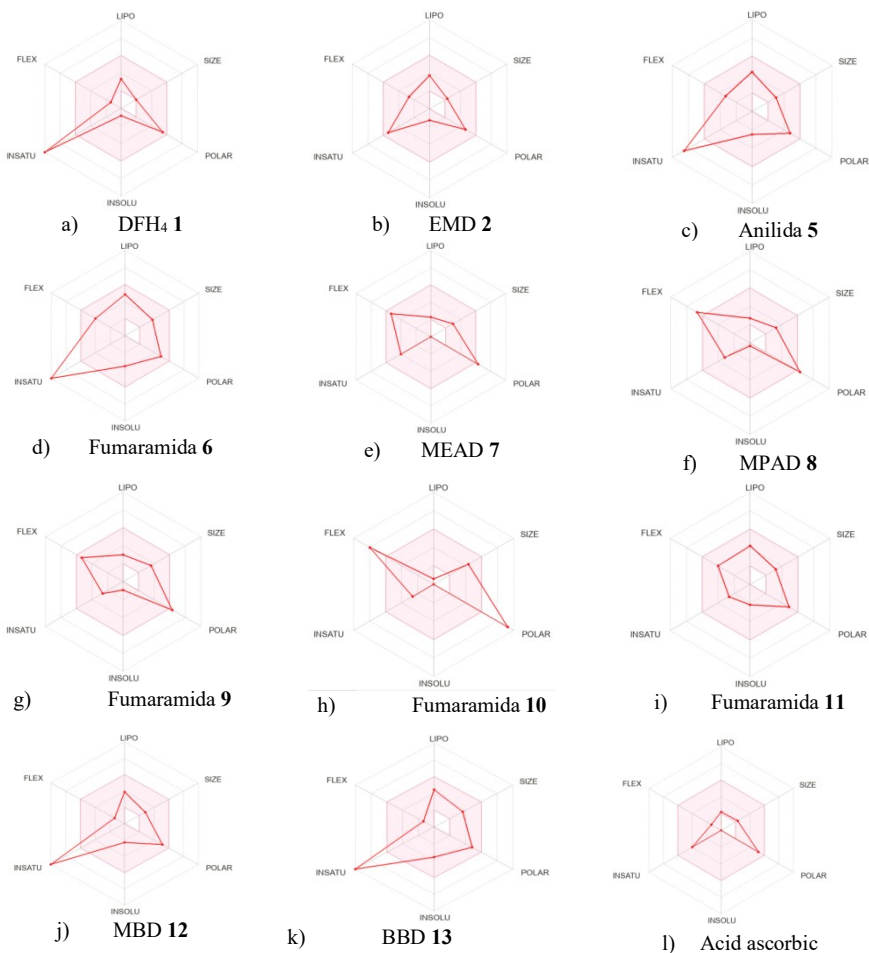
S-a constatat că majoritatea structurilor cercetate îndeplinesc *regula de cinci a lui Lipinski*, și satisfac filtrele Ghose, Veber și Egan, atingând un scor bun de biodisponibilitate, de 0.56, identic acidului ascorbic. Conform rezultatelor, se poate observa că majoritatea compușilor sunt foarte solubili în apă și au o penetrabilitate bună a pielii. Toți compușii, inclusiv acidul ascorbic, au valori mici de permeabilitate pentru Caco-2 (valori  $\log P_{app} < 0.90 \text{ cm/s}$ ), absorbție intestinală bună (în afară de DFH4), nu traversează bariera sanguină a creierului, sau sistemul nervos central.

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

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

Pentru a obține informații suplimentare despre biodisponibilitatea și asemănarea cu medicamentele ale substanțelor cercetate, au fost estimate rezultatele radarului de biodisponibilitate (Figura 4.5), care au demonstrat proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor.

Zona colorată a radarului reprezintă suprafața fizico-chimică potrivită pentru biodisponibilitatea orală. Notațiile pe figuri se descifrează după cum urmează: LIPO (lipofilicitate):  $-0.7 < XLOGP3 < +5.0$ ; SIZE (dimensiune):  $150\text{g/mol} < \text{greutate moleculară} < 500\text{g/mol}$ ; POLAR (polaritate):  $20\text{\AA}^2 < TPSA < 130\text{\AA}^2$ ; INSOLU (insolubilitate):  $-6 < \log S \text{ (ESOL)} < 0$ ; INSATU (nesaturație):  $0.25 < \text{fracțiunea de atomi de C în hibridizarea } sp3 < 1$ ; FLEX (flexibilitate):  $0 < \text{nr. de legături ce pot fi rotite} < 9$ .



**Fig. 4.5. Radarele de biodisponibilitate pentru substanțele cercetate: (a) acidul DFH<sub>4</sub> 1, (b) esterul EDM 2, (c) anilida 5, (d) fumaramida 6, (e) MEAD 7, (f) MPAD 8, (g) fumaramida 9, (h) fumaramida 10, (i) fumaramida 11, (j) MBD 12, (k) BBD 13, (l) acidul ascorbic**

Se observă din Figura 4.5 că majoritatea substanțelor se înscriu în totalitate în zona colorată a radarului, iar cele care nu se înscriu, o depășesc de regulă într-un singur criteriu, demonstrând proprietăți semnificativ asemănătoare medicamentelor.

Luând în considerație materialul expus anterior, în special rezultate legate de utilitatea DFH<sub>4</sub> și a derivaților lui pentru aplicații în vinificație, industria alimentară, de producere a tutunului, precum și rezultatele pozitive ale modelării ADMET, în etapa următoare a fost efectuată simularea prin metoda molecular docking a interacțiunii dintre compușii menționați și proteaza principală Mpro a virusului SARS-CoV-2.



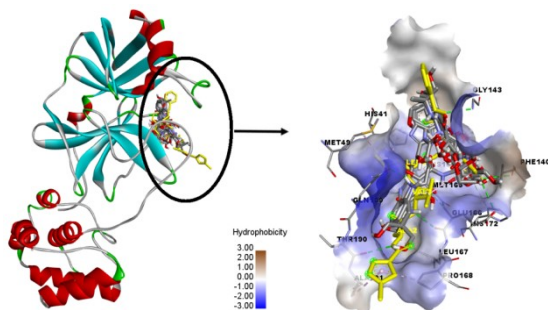
În cadrul cercetării de față a fost utilizat programul CB-Dock2, elaborat în cadrul Academiei de Științe Chineze [28]. Procedeu utilizat de acest program constă în identificarea automată a locurilor de legare, calculul centrului și dimensiunii, personalizarea dimensiunii casei de andocare în funcție de liganzii cercetați și apoi realizarea andocării moleculare cu ajutorul softului AutoDock Vina [29].

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 [30]. Astfel, inhibarea sau dezactivarea acestei proteaze va duce la moartea virusului.

În cercetarea de față a fost utilizată structura cristalină a  $M^{pro}$  cu codul PDB: 6LU7 [31], iar această structură cristalografică este codificată în genomul viral în combinație cu inhibitorul N3.

Pe baza valorilor energiei de legare (Tabelul 4.2), 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** ( $-30.12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), urmat de fumaramida **6** ( $-29.29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Conform rezultatelor simulării computaționale, conformațiile cu cele mai mari afinități de legare pentru toți compușii cercetați se plasează în același buzunar al protezei  $M^{pro}$  ca și inhibitorul N3 (Figura 4.6).

Pentru toți compușii cercetați au fost reprezentate structurile tridimensionale și bidimensionale ale acestor interacțiuni, au fost identificate numărul și tipurile legăturilor formate. Figura 4.7. prezintă interacțiunile dintre compusul BBD **13**, care a prezentat cea mai înaltă valoare a afinității de legare.



**Fig. 4.6. 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 4.2. Rezultatele andocării moleculare a compușilor cercetați la proteaza principală a virusului SARS-COV-2**

Compusul cercetat	Afinitatea de legare, $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
DFH4 <b>1</b>	-22.18
Esterul <b>2</b>	-20.92
Anilida <b>5</b>	-26.36
Fumaramida <b>6</b>	-29.29
MEAD <b>7</b>	-22.59
MPAD <b>8</b>	-23.01
Fumaramida <b>9</b>	-28.03
Fumaramida <b>10</b>	-25.10
Fumaramida <b>11</b>	-27.61
MBD <b>12</b>	-28.03
BBD <b>13</b>	-30.12
Acidul ascorbic	-22.18

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



**Fig. 4.7. Reprezentarea interacțiunii cu cel mai mare scor de andocare între compusul cercetat și proteaza principală a virusului SARS-CoV-2 (imagine 3D - pe stânga și 2D - pe dreapta), pentru BBD 13**

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

## CONCLUZII GENERALE

**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  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  (*capitolul 2, pp. 48-50 și capitolul 3, pp. 51-60, [28,94,103,105]*).

2. În premieră pentru Republica Moldova au fost aplicate metodele computaționale pentru calculul indicilor de reactivitate globală a moleculelor studiate, pentru demonstrarea validității procedurii KID în apă și metanol, pentru calculul comparativ al indicilor de reactivitate locală a moleculelor studiate pe baza funcțiilor Fukui, descriptorului dual, funcțiilor Parr și indicelui local al diferenței de reactivitate în vid, în apă și metanol (*capitolul 4, pp. 92-115, [124]*).

3. Pentru DFH<sub>4</sub> și derivații obținuți a fost cercetată activitatea antiradicalică cu DPPH' și s-au determinat constantele stoichiometrice, timpul de reacție până la echilibru, valorile PAR și EC<sub>50</sub> 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<sup>•</sup> cu DFH<sub>4</sub> și derivații acestuia (*capitolul 3, pp. 60-75, [88,99,100,102,103]*).

4. În testul cu ABTS<sup>•+</sup> au fost identificați patru derivați din șirul substanțelor sintetizate, care au demonstrat o bună activitate antiradicalică și prezintă interes pentru cercetări ulterioare: esterul EDM 2, anilida 5, acidul MBD 12 și diolul BBD 13 (*capitolul 3, pp. 75-79, [104,105]*).

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 enediolici, a fost determinată abundența relativă a lor în gaz, apă și metanol. De asemenea, a fost studiat procesul de izomerizare și tautomerizare a celor mai stabili trei izomeri ai DFH<sub>4</sub>, s-au determinat parametrii cinetici și termodinamici, a fost calculată energia orbitalilor responsabili pentru nucleofilicitatea și electrofilicitatea atomilor de oxigen hidroxilici din fragmentul enediolic pentru derivații cercetați, în apă și metanol (*capitolul 4, pp. 80-92 și 115-122, [109,110,111]*).

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 (*capitolul 4, pp. 123-127, [137]*).

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 (*capitolul 4, pp. 127-135*).

## RECOMANDĂRI

1. Se recomandă laboratoarelor de sinteză aplicarea metodelor computaționale de andocare moleculară, determinare a profilului ADMET și a biodisponibilității, 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 formularea produselor și menținerea calității acestora.

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

4. Se recomandă complementarea cursurilor de licență/masterat/doctorat cu privire la cercetarea reactivității substanțelor chimice de interes prin metode cuanto-chimice cu utilizarea funcțiilor Fukui și Parr, a descriptorului dual, precum și a indicelui local al diferenței de reactivitate.

## 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. 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>.
3. 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.
4. 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>.
5. 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.
6. 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.
7. 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](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/12135/datacite).
8. 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>.
9. 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>.
10. 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>.
11. 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>.
12. 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"*, Institut. Oncol. din Moldova, 1997, p. 111.
13. 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.
14. GONȚA, M. *Transformarea nitraților, nitriților, formarea N-nitrozaminelor și utilizarea inhibitorilor în procese redox*: tz. de doct. hab. în chimie. Chișinau, 2009.
15. 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).
16. 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>.
17. 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>.
18. GOLDBERG, D. P., MICHEL, S. L., WHITE, A. J., WILLIAMS, D. J., BARRETT, A. G., HOFFMAN, B. M. Molybdocene porphyrazines: 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>.
  19. DREHER, D.D. US Patent 0090668. Disponibil: <https://www.freepatentsonline.com/y2005/0090668.html>.
  20. 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).
  21. MACAEV, F., SECARA, N., DUCA, GH. Antioxidant Activity of Dihydroxyfumaric Acid and its Derivatives: an Analysis by the ABTS<sup>+</sup> Decolorization Assay. *Chemistry&Biology Interface*. 2013, nr. 3(4), pp. 253–263. ISSN: 2249-4820
  22. 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.
  23. MARTÍNEZ-ARAYA, J.I., SALGADO-MORÁN, G., GLOSSMAN-MITNIK, D., Computational Nutraceutics: Chemical Reactivity Properties of the Flavonoid Naringin by Means of Conceptual DFT. *Journal of Chemistry*. 2013, Article ID 850297. Disponibil: <https://doi.org/10.1155/2013/850297>.
  24. 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>.
  25. BAJ, A., CEDROWSKI, J., OLCHOWIK-GRABAREK, E., RATKIEWICZ, A., WITKOWSKI, S. Synthesis, DFT calculations, and in vitro antioxidant study on novel carba-analogs of vitamin E. *Antioxidants*, 2019, nr. 8(12), 589. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/antiox8120589>
  26. 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>.
  27. 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>.
  28. YANG LIU, XIAOCONG YANG, JIANHONG GAN, SHUANG CHEN, ZHI-XIONG XIAO, YANG CAO. 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>.
  29. 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>.
  30. 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>.
  31. 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>.

## 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 Babeș-Bolyai Chimia*. 2021, 4, pp. 341-353. ISSN 1224-7154. Disponibil: [10.24193/subbchem.2021.4.25](https://doi.org/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](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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](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<sup>+</sup> 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](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, Rusia, 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-pyrcrylhydrazine 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-pyrcrylhydrazyl 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 methoxydehydroxilation 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 DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> 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.

## 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<sup>•+</sup> 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 DFH<sub>4</sub>; determinarea activității antioxidante/antiradicalice prin utilizarea radicalilor DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>; studiul legăturilor cinetice ce descriu reacțiile dintre DFH<sub>4</sub> și derivații acestuia cu radicalul DPPH<sup>•</sup>, cercetări cuanto-chimice a izomerizării și tautomerizării DFH<sub>4</sub> în diferite medii; calculul descriptorilor de reactivitate globală și locală a DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> (dintre care 9 sunt derivați noi) cu proprietăți antiradicalice, cu potențial de utilizare în diferite ramuri ale industriei, precum industria alimentară, viti-vinicolă și farmaceutică. Cercetările cuanto-chimice au permis identificarea, pentru prima dată a celor trei izomeri ai DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> cu proprietăți antioxidante/antiradicalice, și stabilirea experimentală a legăturilor cinetice de interacțiune a acestor compuși cu radicalul DPPH<sup>•</sup>, 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-vinicolă și farmaceutică.

**Semnificația teoretică:** Rezultatele cercetării contribuie la fundamentarea cunoștințelor în domeniul cineticii chimice a reacțiilor dintre antioxidanți și radicalii DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup>. S-a confirmat posibilitatea obținerii derivaților cu caracteristici antioxidante pe bază de DFH<sub>4</sub>, 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 DFH<sub>4</sub>, dintre care patru compuși posedă activitate antioxidantă/antiradicalică pronunțată față de radicalii DPPH<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup> demonstrată experimental, și proprietăți similare medicamentelor (inclusiv farmaco-cinetice, de biodisponibilitate și toxicitate) prezise 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<sup>•</sup> și ABTS<sup>•+</sup> 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<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, 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 DFH<sub>4</sub>; determination of antioxidant/antiradical activity using the radicals DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>; study of the kinetic laws describing the reactions between DFH<sub>4</sub> and its derivatives with DPPH<sup>•</sup>; quantum-chemical research of the isomerization and tautomerization processes of DFH<sub>4</sub> in different media; calculation of the global and local reactivity descriptors of DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> 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<sup>•</sup>, 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<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals. The results confirmed the possibility of obtaining derivatives with antioxidant/antiradical characteristics based on DFH<sub>4</sub>, 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 DFH<sub>4</sub> based derivatives were obtained, of which four compounds have experimentally demonstrated pronounced antioxidant/antiradical activity in DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> 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<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> 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<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> катион-радикал, stop-flow, расчётные методы, глобальная/локальная реакционная способность, НОМО/LUMO орбитали, молекулярный докинг.

**Цель диссертации:** заключается в исследовании кинетических и квантовохимическими методами антирадикальной активности DFH<sub>4</sub> и десяти ее производных, полученных автором.

**Задачи исследования:** получение и характеристика новых производных DFH<sub>4</sub>; определение антиоксидантной активности с использованием радикалов DPPH<sup>•</sup> и ABTS<sup>•+</sup>; изучение кинетических закономерностей, описывающих реакции DFH<sub>4</sub> и его производных с радикалом DPPH<sup>•</sup>; квантово-химические исследования процессов изомеризации и таутомеризации DFH<sub>4</sub> в различных средах; расчёт глобальных и локальных дескрипторов реактивности DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub> 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 DFH<sub>4</sub>, обладающих антиоксидантными/антирадикальными свойствами, в экспериментальном установлении кинетических закономерностей взаимодействия этих соединений с радикалом DPPH<sup>•</sup>, 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<sup>•</sup> и ABTS<sup>•+</sup>. Полученные результаты подтвердили возможность получения производных с антирадикальными свойствами на основе DFH<sub>4</sub>, 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 DFH<sub>4</sub>, 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<sup>•</sup> и ABTS<sup>•+</sup> 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.

**BOLOCAN NATALIA**

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

**144.01 – CHIMIE FIZICĂ**

Rezumatul tezei de doctor în științe chimice

---

Aprobat spre tipar: 11.04.2023

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Coli de tipar.: 2,2

Formatul hârtiei 60x84<sup>1/16</sup>

Tiraj 30 ex.

Comanda nr. 80

---

Centrul Editorial-Poligrafic al USM  
str. Al. Mateevici, 60, Chișinău, MD, 2009  
e-mail: cep1usm@mail.ru; usmcep@mail.ru