









D. P. IGA

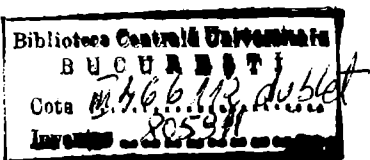
SILVIA IGA

54/i-38

# CHIMIE BIOORGANICĂ

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI  
1996

Referenți științifici: Dr. ing. VASILE MIHĂILĂ  
Dr. STELIAN NICULESCU



Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universității București.  
Orice reproducere sau traducere, fie și parțială, precum și  
contrafacerea de orice tip intră sub incidența legii penale.

ISBN: 973-9160-67-0.

## CUPRINS

<i>Introducere</i> .....	5
<i>Abrevieri</i> .....	8
<b>CAPITOLUL 1. NOȚIUNI INTRODUCATIVE DE CHIMIE BIOORGANICĂ</b> .....	9
1.1. Teoria lui Avogadro asupra moleculelor .....	9
1.2. Metode de determinare a masei moleculare .....	10
1.3. Metode de purificare ale compușilor organici .....	23
1.4. Metode de investigare a structurii compușilor organici .....	29
1.5. Izomeria .....	62
1.5.1. Izomeria structurală .....	62
1.5.2. Stereoizomeria .....	63
1.5.2.1. Izomeria optică .....	63
1.5.2.2. Izomeria geometrică .....	76
1.6. Compuși heterociclici cu caracter aromatic .....	77
1.6.1. Heterocicli cu cinci atomi, monoheteroatomici .....	80
1.6.2. Cicluri de cinci atomi, poliheteroatomice .....	84
1.6.3. Cicluri de șase atomi, monoheteroatomice .....	85
1.6.4. Cicluri de șase atomi, poliheteroatomice .....	88
1.7. Terpenoidele .....	97
1.7.1. Metode generale de obținere ale terpenoidelor .....	97
1.7.2. Monoterpenoidele .....	97
1.7.3. Sesquiterpenoidele .....	100
1.7.4. Diterpenoidele .....	101
1.7.5. Triterpenoidele .....	102
1.7.6. Difenilpolienele, model structural pentru carotenoizi .....	103
1.7.7. Tetraterpenoidele (Carotenoizii) .....	104
<b>CAPITOLUL 2. MOLECULE MONOMERE</b> .....	107
2.1. Hidrații de carbon (Glucidele) .....	107
2.1.1. Monozaharidele .....	107
2.1.2. Oligoglucidele .....	128
2.2. Amino-acizii .....	135
2.3. Lipidele .....	150

2.3.1. Acizii grași . . . . .	151
2.3.2. Steroizii . . . . .	168
2.3.3. Esteri ai colesterolului . . . . .	182
2.3.4. Fosfolipidele . . . . .	183
2.4. Glicolipide . . . . .	201
2.4.1. Glicosfingolipide neutre (Hexozil-ceramide) . . . . .	201
2.4.2. Sulfato-glicosfingolipidele . . . . .	204
2.5. Nucleotidele . . . . .	206
<b>CAPITOLUL 3. REACTIVI NATURALI SPECIALI (VITAMINE, COENZIME) . . . . .</b>	<b>215</b>
3.1. Fosfocreatina (creatin fosfatul) . . . . .	215
3.2. Adenozin trifosfatul (ATP) . . . . .	216
3.3. Coenzima A și fosfopanteteina . . . . .	217
3.3.1. Derivați S-acil ai coenzimei A . . . . .	220
3.4. Biotina . . . . .	221
3.5. Tiamina (vitamina B1) . . . . .	226
3.6. Piridoxina și compușii naturali înrudiți (vitamina B6) . . . . .	230
3.7. Piridin nucleotidele . . . . .	232
3.8. Flavin coenzime . . . . .	240
3.9. Acidul lipoic (acidul tioctic) . . . . .	247
3.10. Grupa acidului folic . . . . .	250
3.11. S-Adenozil-L-Metionina (A-ME; S-(5'-Deoxiadenozin-5')-L-metionina) . . . . .	253
3.12. 3',-Fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS, „sulfat activ"...) . . . . .	255
3.13. Uridin 5'-difosfat glucoza (UDP-glucoza, UDPG) . . . . .	256
3.14. Uridin difosfo-N-acetilgalactozamin 4-sulfat (UDP-GalNAc-4-S) . . . . .	258
3.15. Citidin difosfat diacil glicerol (CDP-diacil glicerol) . . . . .	259
3.16. (-)- Carnitina . . . . .	260
<b>CAPITOLUL 4. VITAMINE LIPOSOLUBILE . . . . .</b>	<b>263</b>
4.1. Vitamina A (retinol, axeroftol) . . . . .	263
4.2. Vitamina D (Calciferol) . . . . .	266
4.3. Vitamina E (Tocoferol) . . . . .	270
4.4. Vitamina K (Filochinone și menachinone) . . . . .	272
<b>CAPITOLUL 5. UNITĂȚI METABOLICE . . . . .</b>	<b>276</b>
5.1. Esteri fosfat ai glucidelor și metaboliților lor (intermediari ai glicolizei) . . . . .	276
5.2. Ciclul acizilor tricarboxilici (Ciclul Krebs) . . . . .	288
5.3. Metaboliți ai aminoacizilor . . . . .	291



## INTRODUCERE

În ciuda diversității enorme și crescânde a structurilor moleculare și a modului de acțiune a compușilor biologic activi, metodele de cercetare ale acestora sunt puțin numeroase. În general comportarea unei populații de molecule este studiată, alternativ, prin următoarele modalități:

I. Față de o altă populație de molecule. Aici sunt cuprinse reacțiile chimice.

II. Față de un câmp electric și/sau magnetic. Aici intră spectroscopia în IR, UV-vizibil, Raman, microunde, RMN, RES, spectroscopia de masă, electroforeza.

III. Față de organele celulare: nucleii, mitocondrii, lizozomi, membrane celulare etc.

IV. Față de o populație de celule (culturi de celule).

V. Față de un organ, detașat sau nu din organismul respectiv. De exemplu perfuzia, acțiunea pe musculatură netedă etc.

VI. Față de un organism întreg (trebuie precizat că un organism viu având, practic, o diversitate infinită de modalități de răspuns, nu se comportă niciodată ca un tot unitar: de regulă acționează numai anumite segmente iar altele nu).

VII. Față de un grup de organisme identice sau diferite.

Sistematizarea compușilor biologic activi trebuie să aibă în vedere aceste modalități de studiu în sensul că același răspuns pentru doi sau mai mulți compuși diferiți determină gruparea lor în aceeași categorie. Totodată, în exercitarea criteriilor I-VII o anumită categorie se desface și se reface de la un criteriu la altul; întrucât o sistematizare este un tablou static acesta ia naștere întotdeauna prin prevalarea, obiectivă sau subiectivă, a unor criterii asupra altora.

În tentativa unei sistematizări cuprinzătoare a compușilor biologic activi autorii relevă un număr de funcții de nivel molecular inspirate în bună măsură din biologie. Totodată, polifuncționalitatea pare să fie o lege a naturii, determinată de îndeplinirea funcțiilor complexe pe care le implică fenomenul vieții. Iată care sunt aceste funcții:

1. *Molecule monomere.* Moleculele de acest tip sunt integrate, prin condensare sau agregare, în structuri macromoleculare sau supramoleculare: monoglucidele în poliglucide, amino acizii în proteine, nucleotidele în acizi nucleici, lipidele în structuri de tip membranar. Prin urmare monoglucidele, amino acizii, nucleotidele, lipidele, sunt molecule monomere. O proprietate comună a moleculelor monomere rezultă din faptul că conțin două sau mai multe grupări chimice reactive („funcțiuni chimice”) care permit dezvoltarea liniară și/sau tridimensională a structurii macromoleculare sau supramoleculare respective: hidroxilul glicozidic și hidroxilul aglicon la monoglucide; gruparea carboxil și gruparea amino la amino acizi; două grupări hidroxil ale acidului orto-fosforic ce leagă, prin legături fosfodiesterice, gruparea hidroxil din poziția 3 a unei molecule de riboză cu gruparea hidroxil din poziția 5 a altei molecule de riboză, obținându-se structuri polinucleotidice; fracțiunea hidrofobă (nepolară) și fracțiunea hidrofilă (polară) în cazul lipidelor de membrană. În toate cazurile

de mai sus există încă cel puțin o posibilitate de formare de legături noi: monoglucidele, în cadrul poliglucidelor, se pot lega prin legături de hidrogen; catenele laterale, dar chiar și atomii legăturii peptidice, ale aminoacizilor participă la legături de hidrogen în cadrul structurilor polipeptidice; în structurile polinucleotidice bazele azotate participă la legături de hidrogen, între ele sau cu alte molecule; legăturile van der Waals dintre fracțiunile hidrofobe ale lipidelor fiind disperse, în comparație cu legăturile covalente care sunt precis orientate și direcționate, dezvoltarea tridimensională este ușor de înțeles.

2. *Reactivi naturali speciali* (D. Metzler, 1977). Acești compuși constituie, alături de enzime, „instrumentul chimic” prin care sunt realizate reacțiile chimice în organismele vii. Astfel de compuși sunt: NAD, NADP și FAD care servesc la transportul hidrogenului; nucleozidele trifosforilate care transportă gruparea fosfat; adenzil-metionina care realizează reacția de metilare; fosfoadenozin monofosfosulfatul care servește la reacția de sulfatare; UDP-Glc, care servește la reacția de glicozilare, etc.

3. *Molecule-semnal*. Sunt molecule semnal acele molecule ce acționează în cantități și concentrații care din punct de vedere energetic sunt practic nule. (Este vorba despre căldura de combustie a moleculelor semnal, de un anumit tip, raportată la valoarea calorică a hranei; valoarea acestui raport este evident, extrem de mică). Acești compuși se testează în raport cu sisteme complexe: celule, organe, organisme întregi. (Testarea lor față de o populație de molecule este practic nerelevantă). În același timp moleculele semnal sunt capabile să declanșeze sistemele de amplificare ale organismelor vii, organelor sau celulelor. Hormonii constituie un exemplu edificator de molecule-semnal.

4. *Componente ale unităților metabolice*. Unitățile metabolice (sau unități enzimatică (A. Lehninger, 1975)) constituie dovada că și la nivel molecular procesul de coordonare este un atribut al structurii, chiar dacă nu în exclusivitate. Exemplu de unități metabolice: glicoliza, ciclul acizilor tricarboxilici, ciclul ureogenezei, ciclul gamma-glutamil, spirala  $\beta$ -oxidării etc.

5. *Biocatalizatorii*. Cei mai perfecționați biocatalizatori pe care îi cunoaștem astăzi sunt enzimele. Este extrem de probabil că „strămoșii” enzimelor sunt o clasă de compuși deosebiți fundamental de enzime în privința compoziției și anume ionii metalici.

Într-adevăr, ionii metalici imită, catalitic, uneori cu o fidelitate remarcabilă, activitatea enzimatică. Fără îndoială că asocierea celor două entități a constituit o etapă importantă în evoluția activității enzimatică.

6. *Funcția de reglare*. Reglarea este un fenomen complex care implică o diversitate de biomolecule precum și structuri supramoleculare de anvergură ce funcționează ca un tot unitar. Cu toate acestea se pare că adevăratele componente active în procesul de reglare sunt proteinele alosterice care exercită această funcție prin mobilitatea lor conformațională foarte pronunțată, unică. Totodată s-a constatat că unii compuși ce prezintă izometrie cis-trans sunt implicați deasemenea în fenomenul de reglare. Autoreglarea, o particularitate majoră a metabolismului, este reprezentată mecanistic de către componentele reglatoare.

7. *Funcția de matriță (template)*. Moleculele matriță reprezintă la nivel molecular o calitate esențială a organismelor vii, autoreproducerea. Cele mai perfecționate molecule matriță sunt acizii nucleici. În plus trebuie menționat că

conceptul de matriță este din ce în ce mai răspândit în chimia organică: tot mai multe sinteze chimice se realizează prin intermediul unei structuri-matriță. Se poate prevedea că acest tip de sinteză se va dezvolta într-o manieră remarcabilă în anii viitori.

### *Structurarea Chimiei Bioorganice*

Prezentul curs de Chimie Bioorganică conține cinci capitole. **Capitolul 1** tratează câteva noțiuni introductive de chimie bioorganică: conceptul de moleculă, determinarea masei moleculare, purificarea substanțelor chimice, investigarea structurii compușilor organici, izomeria. Compușii heterociclici aromatici și terpenoidele sunt tratate în capitolul introductiv din două motive: pe de o parte complexitatea relativ redusă a acestor două clase de compuși față de alte clase de compuși. Astfel unele terpenoide sunt hidrocarburi iar celelalte conțin una sau cel mult două grupări chimice reactive („grupări funcționale”). Pe de altă parte, înțelegerea structurii și proprietăților heterociclicilor aromatici este ușor accesibilă în momentul când este precedată de studiul stării aromatice. Aceste două clase de substanțe, precedate de studiul hidrocarburilor și a grupărilor chimice reactive, oferă o deschidere extrem de largă spre abordarea claselor de compuși cu structură mai complicată.

**Capitolul 2** se ocupă de unități monomere: monoglucidele, amino acizii, lipidele, glicolipidele, nucleotidele.

**Capitolul 3** vizează rezultatele cercetărilor privind Reactivii naturali speciali (vitamine, coenzime). Această generalizare a lui D. Metzler asupra unor studii de fiziologie, biologie celulară și biochimie, cuprinde un număr impresionant, ca diversitate structurală și mod de acțiune, de compuși biologic activi.

În mod distinct (cel puțin în momentul actual) sunt tratate vitaminele liposolubile, în **Capitolul 4**. S-a constatat, de exemplu, că vitamina E (tocoferolii) sunt antioxidanți extrem de eficienți (cedând atomul de hidrogen fenolic devin radicali stabili). Această comportare fizico-chimică justifică clasificarea vitaminelor liposolubile printre Reactivii naturali speciali. Pe de altă parte, alte vitamine liposolubile (vitamina A, vitamina D) și derivații acestora (acidul retinoic, respectiv 1,25-dihidroxicolecalciferolul) au un mod de acțiune complet diferit. Este extrem de probabil că într-un viitor apropiat reprezentanții grupului ce cuprinde actualmente vitaminele liposolubile vor fi tratați în clase diferite.

**Capitolul 5** descrie structura, prepararea și proprietățile unor intermediari metabolici ai amino acizilor.

Reprezentanții celorlalte categorii de compuși biologic activi vor fi tratați separat într-o altă lucrare.

În încheiere am dori să mulțumim tuturor celor care au contribuit, prin discuții utile, la elaborarea schemei de sistematizare a prezentului curs: acad. prof. dr. M. Șerban, prof. dr. Adalgiza Ciobanu de la Universitatea din București, prof. dr. K. Sandhoff de la Universitatea din Bonn, prof. dr. M. Tammi de la Universitatea din Kuopio (Finlanda), Prof. dr. S. Niculescu, Prof. Dr. V. Mihăilă.

Eventualele sugestii vor fi trimise autorilor pe adresa Facultății de Biologie, București.

*Autorii*

## ABREVIERI

<b>Ac</b>	= acetil, $\text{CH}_3\text{CO}-$
<b>Ad</b>	= adenină
<b>AG</b>	= acid gras
<b>Boc</b>	= terț-butil-oxi-carbonil, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-$
<b>Bu</b>	= butil
<b>Bu<sup>t</sup></b>	= terț-butil
<b>Bz</b>	= benzil, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$
<b>desc.</b>	= descompunere
<b>DMSO</b>	= dimetil sulfoxid, $\text{O}=\text{S}(\text{CH}_3)_2$
<b>Et</b>	= etil
<b>Gal</b>	= galactoză
<b>GalNAc</b>	= N-acetilgalactozamină
<b>GAP</b>	= D-gliceraldehid 3-fosfat
<b>Glc</b>	= glucoză
<b>GSH</b>	= glutation redus
<b>p.f.</b>	= punct de fierbere
<b>Ph sau <math>\phi</math></b>	= fenil, $\text{C}_6\text{H}_5-$
<b>Pi</b>	= fosfat anorganic, $\text{H}_3\text{PO}_4$
<b>p.t.</b>	= punct de topire
<b>Py</b>	= piridină, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$
<b>THF</b>	= tetrahidrofuran
<b>Ts</b>	= tosil, acid p-toluensulfonic

## CAPITOLUL 1

# NOȚIUNI INTRODUCATIVE DE CHIMIE BIOORGANICĂ

### 1. 1. TEORIA LUI AVOGADRO ASUPRA MOLECULELOR

Un salt calitativ apreciabil s-a realizat în domeniul științelor naturii datorită teoriei lui Avogadro privind existența moleculelor.

#### 1. 1. 1. Legea volumelor constante a lui Gay-Lussac

Analizând raporturile de combinare ale elementelor în fază gazoasă Gay-Lussac a găsit, între altele, următoarele rezultate:

2 volume hidrogen + 1 volum oxigen = 2 volume vapori de apă

3 volume hidrogen + 1 volum azot = 2 volume amoniac

1 volum hidrogen + 1 volum clor = 2 volume acid clorhidric

Este important să menționăm că volumele reactanților și produșilor erau măsurate în aceleași condiții de temperatură și presiune; bineînțeles că în cazul primei reacții măsurătorile s-au realizat la temperaturi de peste 100°C, pentru ca apa să existe integral sub formă gazoasă.

Din determinări precum cele de mai sus a fost descoperită legea volumelor constante a lui Gay-Lussac a cărui formulare este următoarea: *raporturile volumetrice de combinare ale gazelor, precum și raporturile volumetrice dintre reactanți și produși constituie numere întregi și mici.*

#### 1. 1. 2. Teoria lui Avogadro

Teoria lui Avogadro a apărut în primul rând din necesitatea de a explica legea volumelor constante a lui Gay-Lussac, lege care prin apariția ei a curmat existența teoriei lui Dalton asupra atomilor.

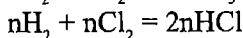
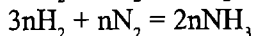
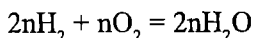
Postulatele teoriei lui Avogadro sunt următoarele:

1. Gazele elementare se găsesc sub formă de agregate numite molecule și formate din doi atomi.

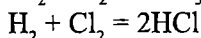
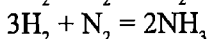
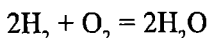
2. Substanțele compuse au moleculele formate din 2, 3 etc., mai mulți atomi.

3. Volume egale de gaze aflate în aceleași condiții de temperatură și presiune conțin un număr egal de molecule.

Să reformulăm acum reacțiile de mai sus în lumina postulatelor teoriei lui Avogadro:



unde  $n$  este numărul de molecule din volumul experimental al gazelor respective; simplificând cu  $n$  ajungem la formularea utilizată și astăzi a ecuațiilor chimice:



### 1. 1. 3. Consecințe ale teoriei lui Avogadro

(a) O primă consecință a teoriei lui Avogadro a constituit-o evaluarea corectă a masei atomice a o serie de elemente, în primul rând a oxigenului. În cazul acestui element s-a găsit că masa atomică este 16, dacă masa atomică a hidrogenului este unu. (b) În al doilea rând, teoria lui Avogadro a permis determinarea masei moleculare (Vezi 1. 2. Metode de determinare a masei moleculare) la o serie de substanțe compuse facilitând cunoașterea formulei moleculare. (c) Teoria lui Avogadro a permis o primă evaluare a capacității de combinare numită *valență* a elementelor. Astfel, dacă: în molecula HCl un atom de clor se combină cu un atom de hidrogen, în molecula  $\text{H}_2\text{O}$  un atom de oxigen se combină cu doi atomi de hidrogen, în molecula  $\text{NH}_3$  un atom de azot se combină cu trei atomi de hidrogen, rezultă că atomul de clor este monovalent (în HCl), oxigenul este bivalent (în  $\text{H}_2\text{O}$ ), azotul este trivalent (în  $\text{NH}_3$ ) etc. (d) A fost elaborată noțiunea de *moleculă-gram* sau *mol*, concomitent cu presupunerea că un mol din fiecare element sau substanță compusă conține același număr de atomi sau de molecule. Acest număr, a cărui primă evaluare s-a realizat la începutul secolului nostru, a și fost numit *numărul lui Avogadro*.

## 1. 2. METODE DE DETERMINARE A MASEI MOLECULARE

O constantă fizico-chimică, reală sau virtuală, dar oricum importantă, a compușilor chimici este masa moleculară.

## 1. 2. 1. Determinarea masei moleculare din legile gazelor

Determinarea masei moleculare cu ajutorul ecuației generale a gazelor se aplică la toate substanțele simple sau compuse care în condiții normale se găsesc sub formă de gaze, precum și lichidelor și solidelor care pot fi vaporizate fără descompunere la presiune normală. Trebuie adăugat că a fost elaborată o metodă care permite determinarea masei moleculare chiar la compușii care, concomitent cu vaporizarea, se descompun (vezi metoda Victor

Meyer în „Chimia Generală”, C. D. Nenițescu, 1979).

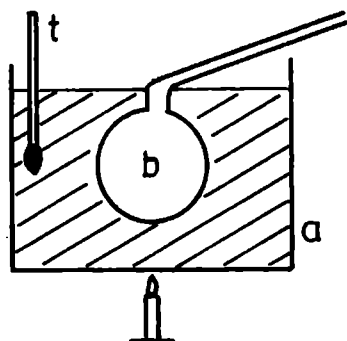
Metoda prezentată în continuare se aplică lichidelor și solidelor care pot fi aduse în stare de vapori fără descompunere. Se utilizează un balon de sticlă cu capacitatea de aproximativ 0,25 litri prevăzut cu gât efilat (Fig. 1. 1). În balon se pune aproximativ un mililitru de substanță a cărei masă moleculară urmează să fie determinată. Balonul se cufundă apoi într-o baie care permite încălzirea acesteia cu cel puțin 20–30°C deasupra p. f. al compusului studiat. Prin încălzire substanța din balon se vaporizează gonind afară aerul din balon; excesul de substanță este de asemenea eliminat astfel că în balon rămân exact atâția vapori câți ocupă volumul respectiv, V, la presiunea P și temperatura T (măsurată cu ajutorul unui termometru cufundat în baia de încălzire). În acest moment balonul se scoate din baie, se închide imediat prin sudare în flacără și se cântărește.

Volumul V al balonului se determină prin umplerea acestuia cu apă, cântărirea apei și calcularea câtului dintre cantitatea de apă și densitatea acesteia la temperatura camerei în momentul experimentului. Cunoscând volumul V al balonului, prin cântărirea acestuia umplut cu aer, se determină masa balonului gol.

Disponem acum de toate datele pentru determinarea masei moleculare din ecuația generală a gazelor:

$$P \cdot V = \frac{m}{M} \cdot R \cdot T \quad (1.1) \text{ de unde}$$

$$\text{rezultă } M = \frac{m \cdot R \cdot T}{P \cdot V} \quad (1.2.)$$



unde m este masa vaporilor din balon, iar R constanta gazelor.

Fig. 1.1. Determinarea masei moleculare; (a) baie de încălzire; (b) balon cu gât efilat; (t) termometru.

## 1. 2. 2. Echilibrul fazelor

Există trei metode de determinare a masei moleculare care se aplică în condiții de echilibru a două faze majore (lichid-gaz sau lichid-solid):

- scăderea presiunii de vapori
- metoda ebulioscopică
- metoda crioscopică

Cele trei metode se aplică îndeosebi la determinarea masei moleculare a micromoleculilor. Asta deoarece, în cazul macromoleculilor, obținerea soluțiilor, chiar a celor diluate, care să permită decelarea efectului respectiv, implică dizolvarea de cantități prea mari de substanță. *Comparație:* realizarea unei soluții de molalitate 0,01 presupune dizolvarea de 1,8 g glucoză (în 1000 g apă), dar necesită 130 g în cazul mioglobinei și 670 g în cazul hemoglobinei.

Mai trebuie precizat că cele trei metode sunt valabile pentru soluții diluate de neelectroliți.

### 1. 2. 2. 1. Scăderea presiunii de vapori

Discuția ce urmează se referă la soluții formate dintr-un solvent volatil și un solvat nevolatil, astfel că presiunea de vapori a soluției se datorează practic numai solventului. S-a constatat că, la aceeași temperatură, presiunea de vapori a soluțiilor este mai mică decât presiunea de vapori a solventului pur. Dacă  $P_0$  este presiunea de vapori a solventului pur, iar  $P$  este presiunea de vapori a soluției se definește *coborârea absolută* a presiunii de vapori prin diferența  $\Delta P = P_0 - P$ ; *coborârea relativă* a presiunii de vapori se definește prin relația  $\Delta P/P_0$ .

O lege stabilită empiric de Raoult afirmă că coborârea relativă a presiunii de vapori este numeric egală cu fracția molară a solvatului,  $x_2$ :

$$\frac{\Delta P}{P_0} = x_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2} \quad (1.3.)$$

unde  $n_1$  reprezintă numărul de moli de solvent, iar  $n_2$  este numărul de moli de solvat din soluție.

Raportul  $\Delta P/P_0$  nu depinde de valorile absolute ale  $P$  și  $P_0$  și nici de temperatură, ci numai de fracția molară a substanței dizolvate. Soluții echimolare de diferite substanțe, în oricare solvent, păstrează aceeași valoare a raportului  $\Delta P/P_0$ . În același solvent se obține aceeași presiune de vapori  $P$ , indiferent de natura chimică a solvatului (neelectrolit).

De fapt, legea lui Raoult se aplică soluțiilor diluate de neelectroliți. Tabelul 1. 1 ilustrează aceasta prezentând valorile experimentale medii ale raportului



$\Delta P/P_0$  pentru diferite substanțe dizolvate în solvenții respectivi, fracția molară având în fiecare caz valoarea  $x_2 = 0,01$ . Se observă că abaterile de la legea lui Raoult sunt de ordinul procentelor.

Tabela 1. 1.

Valorile lui  $\Delta P/P_0$  pentru diferite soluții, toate având  $x_2 = 0,01$ , în solvenții menționați.

Solvent	Apă	Metanol	Eter	Benzen	$CCl_4$	Acetonă	$CS_2$
$\Delta P/P_0$	0,0102	0,0102	0,0101	0,0096	0,0106	0,0105	0,0105

Având în vedere că se lucrează cu soluții diluate, valoarea lui  $n_2$  este neglijabil de mică în raport cu valoarea lui  $n_1$ . Pe de altă parte, explicitând valorile lui  $n_2$  și  $n_1$  obținem, introducând în relația (1. 3):

$$x_2 = \frac{n_2}{n_1 + n_2} \approx \frac{n_2}{n_1} \quad (1.4) \text{ sau } x_2 = \frac{g_2}{M_2} \cdot \frac{M_1}{g_1} \quad (1.5)$$

unde  $g_2$  și  $g_1$  sunt masele, în grame, de solvat și respectiv solvent, iar  $M_2$  și  $M_1$  sunt masele moleculare corespunzătoare. Relația (1. 3) devine:

$$\frac{\Delta P}{P_0} = \frac{g_2}{M_1} \cdot \frac{M_1}{g_1} \quad (1.6) \text{ sau } M_2 = g_2 \cdot \frac{M_1}{g_1} \cdot \frac{P_0}{\Delta P} \quad (1.7)$$

Determinând presiunea de vapori a solventului,  $P_0$ , a soluției  $P$  și lucrând cu un solvent cu masa moleculară  $M_1$  cunoscută dispunem de toate datele pentru determinarea masei moleculare a solvatului,  $M_2$ .

### 1. 2. 2. Ebulioscopie, crioscopie

Se știe că soluțiile fierb mai sus și îngheață mai jos decât solventul pur. (Această comportare este de asemenea consecința faptului că soluția are presiunea de vapori mai scăzută decât solventul pur). Expresia cantitativă a celor două fenomene a fost de asemenea găsită de către Raoult. Pentru creșterea p. f. a soluțiilor s-a observat că diferența  $\Delta T_f$  dintre temperatura de fierbere a soluției și cea a solventului pur este direct proporțională cu molalitatea soluției:

$$\Delta T_f = E \cdot b \quad (1. 8)$$

unde  $E$  este constanta ebulioscopică (de la ebulire = a fierbe în l. latină), iar  $b$  molalitatea (numărul de moli de substanță dizolvată în 1000 g solvent). Se observă că pentru  $b = 1$  rezultă  $\Delta T_f = E$ ; de aici denumirea lui  $E$  drept *ridicarea molală* a p. f. În mod practic, se determină valori  $\Delta T_f$  pentru soluții diluate (molalitate

în jur de 0,01) și se obține constanta ebulioscopică  $E$  prin calcul. Se demonstrează, atât pe cale termodinamică, cât și pe cale cinetică, faptul că:

$$E = \frac{R \cdot T_f^2}{L_f} \quad (1.9)$$

unde:  $E$  este constanta ebulioscopică;  $R$  constanta gazelor;  $T_f$  temperatura de fierbere a solventului (în K);  $L_f$  căldura latentă de vaporizare a unui mol de solvent.

Considerând relația (1. 8) pentru soluții de molalitate unu în diferiți solvenți rezultă, prin calcul, în solventul respectiv, valoarea lui  $\Delta T$  și implicit a constantei ebulioscopice  $E$ . În tabelul 1. 2 se prezintă câteva constante ebulioscopice, precum și o comparație între valoarea calculată și valoarea determinată experimental a acestor constante.

Pentru coborârea punctului de congelare este valabilă o lege asemănătoare:

$$\Delta T_s = -K \cdot b \quad (1. 10)$$

unde  $\Delta T_s$  este diferența dintre temperatura de solidificare a soluției și respectiv, a solventului (semnul minus provine de la faptul că ultima este mai mare decât prima);  $K$  este *constantă crioscopică* (de la *hrios* = gheață, în l. greacă) sau *coborârea molală* a punctului de congelare. Se demonstrează corelația dintre  $K$  și alte mărimi termodinamice:

$$K = \frac{R \cdot T_s^2}{L_s} \quad (1.11)$$

unde  $R$  este constanta gazelor;  $T_s$ , temperatura de congelare a solventului;  $L_s$ , căldura latentă de topire a unui mol de solvent. În tabelul 1. 3 se prezintă câteva valori ale lui  $K$ , precum și o comparație între valorile teoretice și cele determinate experimental.

Tabelul 1.2.

Constante ebulioscopice

Solvent	E, grade	
	Calculat	Măsurat
Apă	0,513	0,515
Acetonă	1,72	1,73
Etanol	1,19	-
Eter	2,20	2,16
Benzen	2,63	2,64
Dioxan	3,22	3,13
Cloroform	3,76	3,80

Tabelul 1.3.

Constante crioscopice

Solvent	K, grade	
	Calculat	Măsurat
Apă	1,859	1,860
Acid acetic	3,8	3,9
Benzen	5,07	5,12
Nitrobenzen	6,9	6,9
KCl	25,2	25,0
Camfor	40,7	40,0

**Determinarea masei moleculare.** Determinarea masei moleculare se poate realiza aplicând relațiile (1. 8) pentru metoda ebullioscopică și (1. 10) pentru metoda crioscopică. Mai practice sunt însă relațiile de tipul:

$$M_2 = E \cdot \frac{1000 \cdot g_2}{\Delta T \cdot g_1} \quad (1.12)$$

$$M_2 = K \cdot \frac{1000 \cdot g_2}{\Delta T \cdot g_1} \quad (1.13)$$

unde semnificațiile mărimilor sunt cele cunoscute.

Ecuatiile (1. 12) și (1. 13) se obțin din raționamentul următor: o soluție care conține  $M_2$  grame de solvat în 1000 grame solvent va determina o creștere a p. f. (respectiv, o scădere a p. t.) egală cu  $E^\circ C$  (respectiv,  $K^\circ C$ ). O soluție formată din  $g_2$  grame solvat în  $g_1$  grame solvent va determina valorile  $\Delta T$  respective. Prin urmare:

$$\frac{M_2}{1000} \text{ determină } \dots \dots \dots \text{ valoarea } E \text{ (respectiv } K)$$

$$\frac{g_2}{g_1} \text{ determină } \dots \dots \dots \text{ valoarea } \Delta T$$

Rezultă:

$$\Delta T = E \cdot \frac{1000 \cdot g_2}{M_2 \cdot g_1} \quad (1.14) \text{ \u00c2 respectiv}$$

$$\Delta T = K \cdot \frac{1000 \cdot g_2}{M_2 \cdot g_1} \quad (1.15)$$

din care se deduc relațiile (1. 12) și (1. 13).

În relația (1. 13) obținem valori pozitive pentru că se ia ca  $T$  diferența între temperatura de congelare a solventului și soluției.

### 1. 2. 3. Presiunea osmotică

Înțelegerea osmozei ca fenomen fizico-chimic implică noțiunea de membrană semipermeabilă. La studiul soluțiilor, precum și la studiul sistemelor coloidale, se numește *membrană semipermeabilă*, o membrană permeabilă pentru solvent, dar impermeabilă pentru substanța dizolvată. (i) Excelente membrane

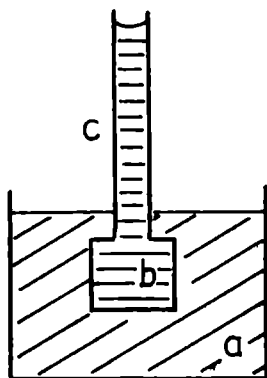
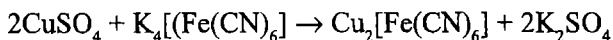


Fig. 1. 2. Determinarea presiunii osmotice; (a) vas cu apă distilată; (b) incintă cu pereți poroși (conținând soluția); (c) tub de sticlă.

semipermeabile, și de o mare complexitate, sunt membranele celulelor vii. (ii) O membrană semipermeabilă satisfăcătoare pentru unele experimente simple o constituie celofanul. (iii) O bună membrană semipermeabilă se obține prin metoda lui Pfeffer. O incintă de porțelan poros se umple cu o soluție diluată de sulfat de litiu și se cufundă într-o soluție similară. Se trece un curent electric; în acest fel aerul este îndepărtat din porii celulei osmotice. După spălare aceasta se umple cu o soluție de ferocianură de potasiu și se așează într-o soluție de sulfat de cupru. În interiorul incintei se introduce un catod de platină, iar în soluția de sulfat de cupru un catod de cupru. Între cei doi electrozi se trece un curent electric ce are rolul de a transporta cele două tipuri de ioni, cupru și ferocianură, unii spre alții și în peretele celulei osmotice. Are loc reacția:



Precipitatul de ferocianură de cupru, insolubil în apă, constituie un excelent sistem semipermeabil. Incinta poroasă se sudează apoi la un tub de sticlă (Fig. 1. 2).

Fenomenul osmotic se observă în felul următor: în recipientul cu pereți semipermeabili se introduce o soluție după care aceasta se cufundă în apă astfel încât nivelul soluției și al apei să fie același. În timp, se observă că apa urcă în tub până la o înălțime  $h$  deasupra nivelului lichidului (Fig. 1.2). Trecerea apei prin membrana semipermeabilă în experimentul de mai sus se numește *osmoză* (din grecescul *osmosis* = a împinge). Echilibrul se atinge când meniscul din tub se află la o anumită înălțime  $h$  deasupra nivelului apei pure ceea ce înseamnă că presiunea în soluție este mai mare decât presiunea în apa pură; diferența de presiune se numește *presiune osmotică* a soluției. Neglijând mica diferență dintre densitatea apei și densitatea soluției presiunea osmotică  $\pi$  este egală cu presiunea exercitată de coloana de lichid  $h$  și este dată de produsul:

$$\pi = \rho \cdot g \cdot h \quad (1.16)$$

unde  $h$  este înălțimea (cm);  $\rho$ , densitatea lichidului ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );  $g$ , accelerația gravitațională ( $980 \text{ cm}/\text{sec}^2$ ).

Expresia presiunii osmotice se demonstrează pe cale termodinamică:

$$\pi = n \cdot \frac{R \cdot T}{V} \quad (1.17)$$

Conținutul relației (1.17) poate fi enunțat în modul următor: presiunea osmotică a unei soluții diluate este egală cu presiunea exercitată de un gaz perfect care se află la aceeași temperatură și ocupă același volum ca soluția și conține un număr de moli egal cu numărul de moli al substanțelor dizolvate în soluție.

Presiunea osmotică se mai definește ca fiind presiunea ce ar trebui exercitată asupra soluției din celula de dializă pentru ca soluția să nu urce în tub. Presiunea osmotică este o proprietate coligativă a soluțiilor: mărimea ei nu depinde de natura chimică a moleculelor de solvat ci numai de numărul acestora per unitatea de volum. Două soluții care prezintă aceeași valoare a presiunii osmotice se numesc *izotonice* sau izoosmotice. Relația (1.17) (corectată) este utilizată la determinarea masei moleculare atât a micromoleculelor cât și a macromoleculelor.

*Determinarea masei moleculare.* Vom discuta în continuare determinarea masei moleculare prin măsurarea presiunii osmotice, aplicată la macromolecule. Se utilizează soluții de polimer având diferite concentrații. Rezultatele se reprezintă apoi în forma raportului  $\pi/c$  în funcție de  $c$  unde  $\pi$  este presiunea osmotică iar  $c$  este concentrația (în  $g/cm^3$ ). Se utilizează ecuația:

$$\pi/c = R \cdot T \cdot \left( \frac{1}{M} + B \cdot c \right) \quad (1.18)$$

unde:  $R$  este constanta gazelor;  $T$ , temperatura absolută;  $M$ , masa moleculară;  $B$ , coeficientul virial secund.

Ordonata la origine a reprezentării de mai sus este  $RT/M$ . Coeficientul unghiular al dreptei este  $B$ , coeficientul virial secund.

Masa moleculară a unui sistem polidispers, obținută prin măsurători de presiune osmotică, este o masă moleculară medie, deoarece proprietățile coligative depind numai de numărul de particule prezente. Este unul dintre motivele pentru care presiunea osmotică este utilizată mai puțin în măsurători de mase moleculare a biopolimerilor și în special a polielectroliților ca de ex. glicoproteinele și proteoglicanii.

Deoarece presiunea osmotică depinde de acțiunea membranei semipermeabile, care conține de-o parte componente macromoleculare, la echilibru există efectul Donan care trebuie luat în calculul masei moleculare. Efectul Donan este de obicei eliminat prin utilizarea unui electrolit, cum ar fi NaCl în concentrație 0,1-0,3 M, în mediu. Un alt dezavantaj al acestei metode



este timpul lung (de la câteva ore la câteva zile) necesar pentru stabilirea echilibrului; un astfel de timp poate favoriza schimbări nedorite cum ar fi depolimerizarea, în soluții diluate. Pentru acest motiv se utilizează mai frecvent așa numita *metoda osmometrică dinamică*. În cadrul acestei metode se măsoară viteza de difuzie a solventului la presiunea hidrostatică constantă iar masa moleculară a unei probe poate fi determinată în cel mult 10 ore.

#### 1.2.4. Metode chimice

Metodele chimice de determinare a masei moleculare se aplică, similar cu metodele osmotice, atât micromoleculilor cât și macromoleculilor.

##### 1.2.4.1. Metode titrimetrice

Metodele titrimetrice de determinare a masei moleculare se aplică fie direct titrând de ex. o cantitate determinată dintr-un acid monocarboxilic cu o soluție de NaOH cu titru cunoscut fie hidrolizând esterul cu un exces dintr-o astfel de soluție și în final titrând excesul cu un acid cu titru cunoscut. Metoda se pretează la acizii monocarboxilici sau policarboxilici, la trigliceride, la fosfolipide etc. În cazul amestecurilor eterogene se obține o masă moleculară medie.

##### 1.2.4.2. Metaloproteine

Masa moleculară a metaloproteinelor poate fi determinată măsurând procentul de metal. În alte cazuri metoda chimică trebuie corelată cu o altă metodă

De ex, hemoglobina de cal deshidratată conține 0,328% fer. Pe de altă parte s-a găsit că o soluție conținând 80 g hemoglobină la litru dă o presiune osmotică  $\pi = 0,026$  atm la 4°C.

Conținutul de fer dă pentru hemoglobină o masă moleculară de 17.000 Da de patru ori mai scăzută decât masa moleculară reală (dar este corectă pentru mioglobină a cărei moleculă este formată dintr-un singur lanț polipeptidic conținând un atom de fer).

Presiunea osmotică dă pentru hemoglobină valoarea 70.000 ceea ce demonstrează că molecula hemoglobinei native este formată din patru lanțuri polipeptidice, conținând fiecare un atom de fer. În cazul mioglobinei masă moleculară obținută din măsurarea presiunii osmotice dă practic aceeași valoare ca determinarea chimică.

### 1.2.5. Analiza sedimentării

Utilizând ultracentrifuga se obțin câmpuri centrifugale intense care determină macromoleculele să sedimenteze în soluție. Difuzia, care menține în mod normal macromoleculele dispersate uniform, este compensată de forța centrifugală. Se utilizează trei tipuri de măsurători de sedimentare pentru determinarea masei moleculare:

- viteza de sedimentare
- echilibrul de sedimentare
- tendința spre echilibrul de sedimentare

În metoda vitezei de sedimentare macromoleculele care migrează spre fundul tubului lasă în urmă solvent pur. Se formează astfel o graniță netă iar migrarea acestei limite de separație este urmărită fie prin măsurători de absorbție UV fie prin măsurători ale indicelui de refracție. Când se obține o viteză de deplasare constantă înseamnă că forța centrifugală contrabalansează rezistența fricțională.

Constanta de sedimentare  $S$  este dată de ecuația:

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 \cdot \chi} \quad (1.19)$$

unde  $\chi$  este distanța de la centrul de rotație;  $t$ , timpul în secunde;  $\omega$ , viteza unghiulară în radiani pe secundă. Constanta de sedimentare, dată în unități de  $1 \cdot 10^{-13}$  sec, se numește *unitate Svedberg*. Aceasta este proporțională cu masa moleculară dar este influențată de conformația moleculei și de coeficientul fricțional. Cu toate acestea dacă, pe lângă constanta de sedimentare, se determină și coeficientul de difuzie a soluției respective de polimer, masa moleculară  $M$  a acestuia este dată de relația:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot S_0}{D_0(1 - \bar{v} \cdot \rho)} \quad (1.20)$$

unde  $M$  este masa moleculară, în Da;  $R$ , constanta gazelor;  $T$ , temperatura absolută;  $S_0$  este constanta de sedimentare iar  $D_0$  coeficientul de difuzie, ambele obținute ca valori experimentale prin extrapolarea concentrației la zero;  $\bar{v}$  este volumul specific parțial iar  $\rho$  este densitatea soluției. Dependența lui  $S$  și  $D$  de concentrație se conformează unei ecuații de tipul:

$$\frac{1}{S} = \frac{1}{S_0} \cdot (1 + k \cdot c) \quad (1.21)$$

Ecuția (1.21) permite cunoașterea lui  $S_0$  și  $D_0$  prin reprezentarea lui  $1/S$ , respectiv  $1/D$  în funcție de  $c$ .

Precizia metodei bazate pe viteza de sedimentare este determinată de precizia cu care este cunoscut volumul parțial specific,  $\bar{v}$ ; această metodă se pretează cel mai bine la molecule sferice.

În tabelul 1.4 se prezintă câteva valori  $M$ ,  $S$  și  $D$  ale proteinelor; se observă că  $S$  nu depinde strict proporțional de  $M$ .

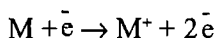
Tabelul 1.4.

Constante fizice ale unor proteine (A. Lehninger, 1975)

Proteina	M	D x 10 <sup>7</sup>	S
Citocrom c (din inimă bovină)	13.370	11,4	1,17
Mioglobina (inimă de cabaline)	16.900	11,3	2,04
Chimotripsinogen (pancreas bovin)	23,240	9,5	2,54
$\beta$ - Lactoglobulina (lapte de capră)	37.100	7,48	2,85
Albumină serică (umană)	68.500	6,1	4,6
Hemoglobină (umană)	64.500	6,9	4,46
Catalaza (ficat de cabaline)	247.500	4,1	11,3
Ureaza (soia)	482.700	3,46	18,6
Fibrinogen (uman)	339.700	1,98	7,63
Miozina (cod)	524.800	1,10	6,43
Virusul mozaicului tutunului	40.590.000	198	2,03

### 1.2.6. Spectrometria de masă

Când un compus, situat în vid înalt, este bombardat cu electroni acesta este transformat în ioni pozitivi prin pierderea unui electron:



Reacția de mai sus are loc într-un spectrometru de masă. (Ionii pozitivi pot fi produși și prin alte metode).

Ionul pozitiv  $M^+$  se numește *ion molecular* sau *ion parental* și se formează când energia electronilor este egală cu aceea a potențialului de ionizare (de obicei 10-15 eV). În practică energia electronilor este 50-70 eV; în aceste condiții ionul molecular posedă un exces de energie, suficient de mare pentru a-l cliva într-un amestec de fragmente neutre și fragmente încărcate pozitiv. Ultimele, dacă posedă un exces de energie, sunt fragmentate în continuare.

Majoritatea ionilor posedă o unitate de sarcină pozitivă dar alții pot transporta o sarcină pozitivă dublă sau chiar mai mare. (Anumiți ioni pot fi chiar încărcăți negativ prin captură de lectroni). Toți ionii pozitivi sunt accelerați într-un câmp electric și separați prin trecerea lor printr-un câmp electric și ulterior printr-un



câmp magnetic. În felul acesta ionii care posedă același raport masă/sarcină ( $m/e$ ) sunt colectați în fascicule și cad pe o placă colectoare. Concomitent ionii sunt sortați conform raportului masă/sarcină și totodată pot fi determinate masele ionilor. Deoarece majoritatea ionilor posedă o singură sarcină pozitivă,  $m/e$  este echivalent cu  $m$ . În privința rezoluției spectrometrele de masă actuale pot diferenția între ioni a căror masă diferă la zecimala a treia.

Prin urmare spectrometria de masă permite, alături de determinarea masei moleculare, și evaluarea abundenței izotopice a elementelor dintr-o moleculă (Tabelul 1.5).

Spectrul de masă se reprezintă sub forma intensităților fasciculelor de ioni în funcție de raportul  $m/e$ . Fiecare compus pur are un *model de fragmentare* caracteristic, inclusiv ionul molecular.

Tabelul 1.5.

Abundența izotopică a unor elemente chimice

Element	Masă	%	Element	Masă	%
H	1	99,985	F	19	100
D	2	0,015	S	32	95,0
C	12	98,89	S	33	0,74
C	13	1,11	S	34	4,24
N	14	99,63	Cl	35	75,4
N	15	0,37	Cl	37	24,6
O	16	99,76	Br	79	50,6
O	17	0,04	Br	81	49,4
O	18	0,20	I	127	100

În cadrul spectrului de masă maximul corespunzător ionului cel mai abundent se numește *peak de bază*. Acesta este utilizat pentru a prezenta spectrele de masă într-o formă standardizată; pentru aceasta intensitățile sale i se atribuie valoarea 100 iar toate celelalte maxime sunt prezentate ca procente din maximul de bază. Un ansamblu de astfel de valori constituie modelul de clivare, care este descris fie sub formă de grafic (Fig. 1.3) fie sub forma unui tabel.

Spectrometria de masă necesită cantități de substanță foarte mici (câteva  $\mu\text{g}$ ); această metodă s-a dovedit extrem de valoroasă pentru determinarea masei moleculare (deci și a formulei moleculare), elucidarea structurii, analiza cantitativă a amestecurilor, determinarea potențialului de ionizare și a tăriei legăturii.

Tabelul 1.6 prezintă fragmentele cele mai des întâlnite la clivarea a diferiți compuși în spectrometria de masă.

## Fragmente identificate în spectrometria de masă

m/e	Fragment	m/e	Fragment	m/e	Fragment
1	H	41	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	71	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
2	H <sub>2</sub>	42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	72	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NH <sub>2</sub>
14	CH <sub>2</sub>	43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> , CH <sub>3</sub> CO	73	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
16	O, NH <sub>2</sub>	44	CO <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> = CHO, H,	74	CH <sub>2</sub> = C(OH)OCH <sub>3</sub>
17	OH		C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	77	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
18	H <sub>2</sub> O, NH <sub>4</sub>	45	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O, CH <sub>3</sub> CHO, H,	78	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>
19	F		COOH	79	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> , Br
20	HF	46	NO <sub>2</sub>	80	HBr
26	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , CN	51	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub>	83	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>
27	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> , HCN	53	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub>	85	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>
28	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , CO, N <sub>2</sub>	55	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub>	88	CH <sub>2</sub> = CH(OH)OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
29	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , CHO	56	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	91	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>
30	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> , NO	57	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CO	93	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O
31	CH <sub>2</sub> OH, CH <sub>3</sub> O	58	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> = C(OH)CH <sub>3</sub>	94	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O
32	CH <sub>3</sub> OH	59	COOCH <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CHOH, CH <sub>2</sub> = C(OH)NH <sub>2</sub>	97	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub>
33	SH		CH <sub>2</sub> = COOH <sub>2</sub>	99	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>
34	H <sub>2</sub> S	60	CH <sub>2</sub> = COOH <sub>2</sub>	105	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO
35	Cl	65	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub>	127	I
36	HCl	66	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub>	128	HI
39	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	69	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub>		
40	CH <sub>2</sub> CN	70	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>		

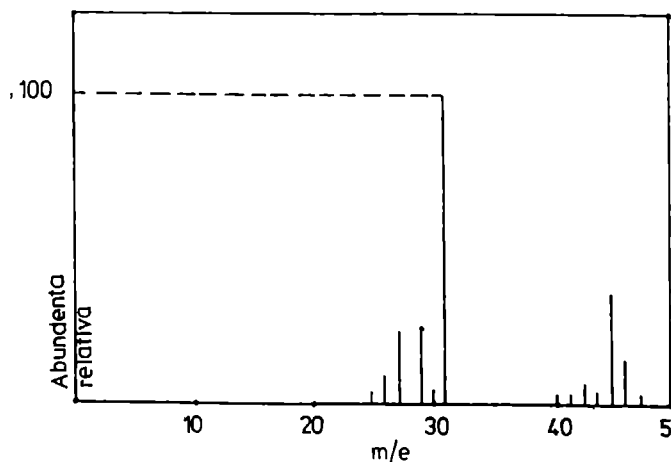


Fig. 1.3. Spectrul de masă al unui compus organic

### 1.3. METODE DE PURIFICARE ALE COMPUȘILOR ORGANICI

Încă de la începuturile chimiei a existat o îmbinare între metodele chimice și fizice utilizate în elucidarea structurii. În ultimele decenii această îmbinare a devenit o necesitate, metodele chimice și metodele fizice completându-se reciproc în sensul în care cele două științe se inspiră fiecare din problematica și conceptele celeilalte.

Metodele fizice și chimice sunt strâns împletite de-a lungul celor trei etape necesare în caracterizarea unui compus:

I. Obținerea compusului respectiv în stare pură

II. Elucidarea structurii

III. Sinteza chimică, pe o cale sau pe mai multe căi, de preferință independente.

Există de asemenea o suprapunere pronunțată a informației în cursul celor trei etape; de ex. comportarea fizico-chimică a compusului în faza de purificare ne poate furniza informații valoroase asupra structurii. Relațiile metabolice (biosinteza și/sau catabolismul) constituie de asemenea argumente structurale conturate din ce în ce mai complet. Tot în acest cadru s-au elaborat metode enzimatică de elucidare a structurii (vezi gangliozidele etc.).

Compușii organici, fie că se obțin prin sinteză chimică fie prin izolare dintr-o sursă naturală, sunt arareori puri. De obicei ei se găsesc amestecați cu cantități variabile din alte substanțe mai mult sau mai puțin înrudite ca structură, numite impurități.

Înainte ca structura și proprietățile fizico-chimice și fiziologice ale unui compus organic să poată fi investigate complet, compusul trebuie să fie pur. Metodele de purificare frecvent folosite sunt următoarele:

- cristalizarea
- distilarea
- cromatografia

#### 1.3.1. Cristalizarea

Purificarea substanțelor solide (și uneori și a celor lichide) se face prin cristalizare dintr-un solvent adecvat sau dintr-un amestec de solvenți.

Purificarea substanțelor prin cristalizare se bazează pe de o parte pe solubilitatea lor diferită într-un solvent sau într-un amestec de solvenți. Totodată cristalizarea duce la o îmbogățire în componenta respectivă datorită faptului că cristalele ca structuri ordonate nu înglobează în structura lor specii chimice străine.

Se ia în considerație faptul că solventul nu reacționează chimic cu substanța de cristalizat. Pe de altă parte solventul de cristalizare trebuie ales în așa fel încât solubilitatea substanței de purificat să fie ridicată la punctul de fierbere al solventului și scăzută la temperatura camerei sau la o temperatură mai scăzută. Dacă se utilizează doi sau mai mulți solvenți pentru cristalizare, materialul de purificat se dizolvă în solventul cu putere de dizolvare mai mare și apoi se adaugă solventul în care compusul studiat este mai puțin solubil.

De obicei cristalizarea se efectuează pe amestecuri în care impuritățile au o pondere de cel mult 5%. În aceste condiții cristalizarea duce la îndepărtarea impurităților, indiferent dacă impuritățile au o solubilitate mai mare sau mai mică decât substanța de purificat.

Procesul de cristalizare constă, în esență, din următoarele etape: (i) dizolvarea substanței impure, prin încălzire, într-un volum minim de solvent; (ii) aducerea la fierbere, câteva minute, după ce în prealabil s-a adăugat un vârf de spatulă de cărbune activ; (iii) filtrarea rapidă la cald; se va alege un filtru prin care cărbunele să nu treacă; (iv) răcirea soluției pentru ca substanța dizolvată să cristalizeze; (v) separarea cristalelor din soluția-mumă.

### 1.3.2. Distilarea

Purificarea substanțelor prin distilare se bazează pe faptul că două sau mai multe substanțe diferite ating presiuni de vapori diferite la aceeași temperatură (inclusiv la punctul de fierbere). Distilarea este considerată o metodă consacrată pentru purificarea substanțelor lichide. În diferite variante însă, distilarea este utilizată și pentru purificarea substanțelor solide și gazoase, în ultimul caz fiind bineînțeles precedată de lichefiere.

Există mai multe variante ale distilării:

(a) distilarea la presiune atmosferică

(b) distilarea cu vapori (antrenarea cu vapori)

(c) distilarea sub presiune redusă (distilarea în vid) se aplică atunci când distilarea la presiune atmosferică ar duce la degradarea substanțelor. Reducând presiunea din instalația de distilare la 0,1-30 mm Hg, p.f. al compușilor scade considerabil și pericolul descompunerii lor este eliminat.

(d) distilarea în vid înalt (distilarea moleculară) servește la purificarea unor compuși cu p.f. foarte înalt sau care sunt deosebit de sensibili la încălzire. Se lucrează în acest caz la o presiune mai scăzută sau cel mult egală cu  $10^{-5}$  mm Hg.

Particularitatea principală a instalației în care se realizează distilarea moleculară este distanța mică (de ordinul a câțiva cm) între suprafața lichidului încălzit și zona condensatorului. Mai precis spus dimensiunile instalației pentru

distilarea moleculară sunt comparabile cu *liberul parcurs mijlociu* al moleculelor supuse distilării. Se definește *liberul parcurs mijlociu* ca fiind distanța străbătută de o moleculă între două ciocniri succesive. *Liberal parcurs mijlociu* crește rapid cu scăderea presiunii. De ex. în cazul aerului:

Presiunea (mm Hg)	1,0	0,1	0,01	0,001
Liberal parcurs mijlociu (cm)	0,0056	0,0562	0,562	5,62

*Liberal parcurs mijlociu* al moleculelor organice (cu masă mai mare decât a aerului) este mai scurt și astfel devine evidentă distanța dintre vasul de distilare și condensator. Prin procesul de distilare moleculară p.f. este redus cu 100-200°C reușindu-se astfel purificarea unor compuși extrem de labili termic. Viteza de distilare are loc conform relației:

$$m = \rho \times \sqrt{\frac{1}{2\pi \cdot M \cdot R \cdot T}} \quad (1.22)$$

unde:

m, masa de substanță evaporată per cm<sup>2</sup> de lichid per secundă;

$\rho$ , densitatea vaporilor saturați la temperatura dată;

M, masa moleculară a substanței;

R, constanta gazelor;

T, temperatura absolută.

### 1. 3. 3. Cromatografia

Există câteva caracteristici comune tuturor tipurilor de cromatografie.

(I) La orice tip de cromatografie există o fază mobilă (eluantul) și o fază fixă (faza staționară).

(II) Indiferent de natura chimică sau starea de agregare, faza staționară se găsește într-o pronunțată stare de dispersie (în stare fin divizată) pentru a oferi o suprafață de contact cât mai mare.

(III) Ca mecanism de separare, orice tip de cromatografie presupune stabilirea a o serie de echilibre a căror direcție o deplasăm în sens favorabil separării și eluției de pe suportul cromatografic.

Separarea cromatografică se realizează datorită distribuției diferențiale a componentelor unui amestec între cele două faze: faza mobilă și faza staționară. Cromatografia oferă un mijloc de concentrare a produsului care se găsește într-un amestec în diluție mare, și este o metodă extrem de valoroasă pentru purificarea și identificarea constituenților amestecului respectiv.

Faza fixă poate fi o coloană, o fâșie de hârtie sau un strat subțire de material depus pe o placă de sticlă sau pe o folie de aluminiu (cromatografia în strat subțire, CSS).

Cromatografia se împarte, după mecanismul separării, în:

(a) *Cromatografie de adsorbție*. În acest caz faza fixă este constituită din silicagel, alumină, cărbune etc. Faza mobilă este un solvent sau un amestec de solvenți organici. Acest tip de cromatografie se practică atât în coloană cât și în strat subțire (CSS). Mecanismul preponderent este *adsorbția*, definită ca o creștere a concentrației unui solut (sau mai multora) la suprafața de separație a fazelor unui sistem dispers.

(b) *Cromatografia de partiție* sau distribuție. Mecanismul predominant în acest caz este partiția diferențială a componentelor de separat între faza mobilă (lichidă sau gazoasă) și faza staționară alcătuită dintr-o peliculă de lichid fixată puternic pe un solid fin divizat. Cromatografia de partiție este de două feluri: în fază directă și în fază inversată. Cromatografia pe hârtie sau pe coloană de celuloză constituie un caz de cromatografie de partiție în fază directă; în acest caz pelicula de lichid adsorbită este polară iar faza mobilă este un solvent organic.

În cazul cromatografiei de partiție în fază inversată se realizează în prealabil o hidrofobizare chimică a suportului cromatografic, kieselguhr (celită), prin tratarea acestuia cu un amestec de trimetil-clor-silan și hexametil-disilazan. Grupările hidrofile ale suportului inert reacționează după cum este indicat în Fig. 1.4. Grupările trimetil-silil, spre deosebire de grupările hidroxil, sunt puternic hidrofobe; prin urmare la expunerea particulelor de celită hidrofobizată la un solvent organic (de ex. 2, 2, 4-trimetil-pentan) acesta se va adsorbi puternic sub forma unei pelicule pe suprafața particulelor. Acum, relizând eluția cu o fază polară (de ex. un amestec de metanol și apă) acest amestec nu va avea nici un

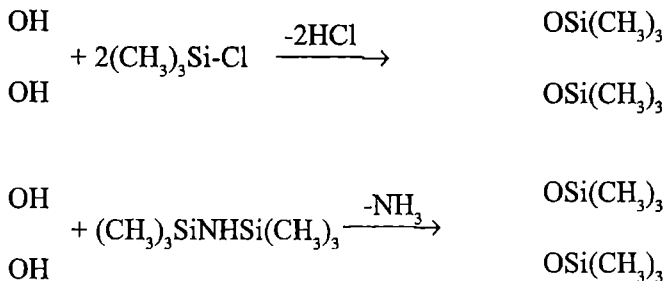


Fig. 1.4. Hidrofobizarea unui suport cromatografic.

efect asupra fazei hidrofobe iar componentele dizolvate în faza mobilă se vor distribui între cele două faze în funcție de afinitatea lor fizico-chimică pentru cele două faze. Cromatografia de partiție în fază inversată se practică și cu faza mobilă alcătuită dintr-un gaz: azot, heliu, argon etc.

(c) *Cromatografia de schimb ionic*. Schimbătorii de ioni sunt polimeri insolubili conținând un număr mare de centre ionizabile care în soluții apoase disociază electrolitic. Ei se împart după compoziția lor în:

- schimbători anorganici de ioni (cel mai adesea alcalialumosilicați);
- schimbători organici de ioni (în cea mai mare parte rășini sintetice). Aceștia au dobândit o importanță deosebită pentru chimia organică și pentru biochimie.

Schimbătorii de ioni se împart după *funcția* lor în:

- cationiți
- anioniți

Cationiții, sau schimbătorii de cationi sunt în esență anioni polimeri, polivalenți, care în soluție apoasă sunt capabili să pună în libertate cationii legați și să-i schimbe cu alții. Anioniții sunt cationi polimeri polivalenți cu proprietăți analoge.

Schimbătorii de ioni sunt furnizați în formă fin divizată obținută prin măcinare sau, mai recent, sub formă de sferoizi obținuți direct prin procesul de polimerizare-emulsionare. Schimbătorii de ioni sub formă de sferoizi sunt adecvați pentru scopuri cromatografice deoarece difuzia ionilor în interiorul granulelor se realizează uniform în toate zonele acestora. Ei au o rezistență fizico-chimică apreciabilă iar în coloanele cromatografice dau o viteză de curgere rezonabilă.

Schimbătorii organici de ioni constau în esență dintr-un schelet și din grupările funcționale - grupările active - cărora li se datorează schimbul activ. Scheletul constă cel mai adesea dintr-o rășină sintetică obținută prin policondensare. Pe acest schelet se grefează, direct sau prin intermediul punților metilenice, grupările funcționale. Acestea sunt fie acide fie bazice: schimbătorii cationici puternic acizi conțin grupări  $-SO_3H$  iar cei slab acizi conțin grupări  $-COOH$ . La schimbătorii anionici bazici grupările active sunt baze cuaternare, de ex.  $Sch-N(CH_3)_3^+HO^-$ , iar la schimbătorii slabi sau de tărie medie diferite grupări amino substituie  $-NR^2R^1$ .

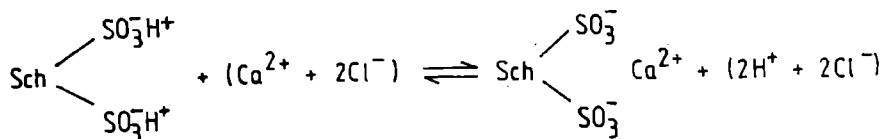
O structură de bază constând din polistiren înrețelată spațial cu divinilbenzen este printre cele mai utilizate la elaborarea schimbătorilor de ioni. Adăugând cantități variabile de divinilbenzen la polimerizare este posibil să se obțină un schelet mai compact sau mai lax. Rezultă astfel o rețea cu deschideri variabile ce permit accesul moleculelor în funcție de mărime. Numărul legăturilor transversale

din structura de bază este aproximativ proporțional cu procentul de divinilbenzen. Deosebim astfel schimbători de ioni 2%, 4%, 8% sau chiar cu un procent mai mare; procentul de 8% conferă deja o structură foarte compactă. Numărul de legături transversale, adică gradul de înrețelare, este etichetat nu în procente ci prin litera X. De ex., cationitul Dowex 50 este produs în următoarele tipuri: X 1, X 2, X 4, X 5, X 8, X 16. Schimbătorii de ioni mai puțin compacti (de ex. 2%) sunt geluri ușoare care se gonfleză puternic și care permit și accesul moleculelor mari. Cu creșterea lui X gelurile devin mai compacte, rezistența crește, gradul de gonflare scade și scade de asemenea mărimea moleculelor ce pot difuza în interiorul granulei de schimbător de ioni.

Numărul grupărilor funcționale, exprimate la unitatea de greutate sau de volum stabilesc capacitatea teoretică de schimb. Aceasta este de regulă exprimată în miliechivalenți per gram, respectiv per mililitru de schimbător și este o măsură a numărului maxim de ioni pe care schimbătorul îi poate lega (schimba). La utilizare se obțin însă valori mai scăzute: capacitatea practică a schimbătorului depinde însă de felul ionilor schimbați și de condițiile de lucru.

Dacă la grupările funcționale ale cationului se leagă protoni se spune că schimbătorul se găsește în forma  $H^+$ ; el poate de asemenea exista în forma  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  etc. Un anionit poate exista în forma bazică, adică în forma  $HO^-$ , sau în formă de sare:  $Cl^-$  sau  $HSO_4^-$ . Trecerea schimbătorului de ioni, din forma în care a fost lăsat după utilizare, în forma inițială se numește *regenerare*.

Cationiții puternic acizi au o capacitate egală de schimb pentru toți ionii (inclusiv  $H^+$ ) și din această cauză sunt utilizabili într-un domeniu larg de pH. În forma  $H^+$  ei pun în libertate acizii din soluții neutre diluate de săruri (Sch = schimbător):

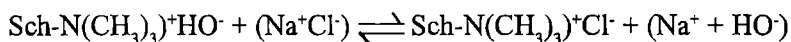


Cationiții acizi slabi disociază practic numai în soluții neutre și alcaline (sub formă de sare). Capacitatea lor de schimb variază puternic cu pH-ul. În mediu acid se găsește în forma  $H^+$ , ionizează puțin și schimbă ionii foarte încet. Cationiții acizi slabi nu scot acizii tari din sărurile lor neutre dar scot acizii slabi (acetații) din sărurile acestora. Pe această proprietate se bazează utilizarea cationiților acizi slabi (pe bază de carboxil) pentru îndepărtarea excesului de alcalii dintr-o soluție, fără a exista pericolul apariției acizilor tari. Cationiții slabi



au o afinitate selectivă pronunțată pentru ionii polivalenti; de aceea ei pot fi utilizați pentru îndepăratea acestor ioni.

O comportare asemănătoare se observă la anioniții puternic bazici sunt ionizați în orice formă și acționează într-un domeniu larg de pH cu aceeași capacitate. Din săruri neutre diluate pun în libertate bazele:



Anioniții slab bazici își schimbă capacitatea de schimb cu valoarea pH-ului. În domeniul alcalin ei nu disociază electrolitic, nu clivează sărurile bazelor tari dar scot bazele slabe din sărurile acestora (de ex. anilina). De aceea anioniții slab bazici pot fi utilizați în formă bazică pentru a îndepărta excesul de acizi tari dintr-o soluție fără să existe pericolul unei alcalinizări ulterioare puternice. Deoarece ei nu ionizează în domeniul alcalin ei nu leagă în aceste condiții acizii slabi (acid carbonic, acid salicilic) care, dimpotrivă, disociază chiar în acest domeniu de pH. Capacitatea de schimb a anioniților bazici slabi crește repede cu scăderea pH-ului.

## 1. 4. METODE DE INVESTIGARE A STRUCTURII COMPUȘILOR ORGANICI

### Introducere

Radiația electromagnetică constă din unde compuse dintr-un vector electric care este perpendicular pe un vector magnetic, ambii vectori fiind perpendiculari pe direcția de propagare. De aici derivă împărțirea studiilor spectroscopice de analiză în două tipuri.

A. Pentru absorbția luminii este îndeosebi responsabil vectorul electric și aceasta se realizează prin interacția acestui vector cu electroni și nuclei atomici încărcăți electric. Spectrele de absorbție care aparțin acestui tip sunt spectrele în ultraviolet, vizibil, infraroșu, Raman și microunde.

B. Pe de altă parte spectrele de absorbție pot fi obținute prin interacția particulelor încărcate cu câmpuri magnetice sau electrice variabile. Spectrele de absorbție care aparțin acestui tip sunt spectrele de rezonanță magnetică nucleară, rezonanță electronică de spin și spectrele de masă.

### 1.4.1. Caracteristicile radiațiilor electromagnetice. Domenii spectrale

Cele două mărimi care caracterizează radiațiile electromagnetice - lungimea de undă și frecvența - sunt legate prin relația:

$$\lambda \cdot \nu = c \quad (1.23)$$

unde  $\lambda$  este lungimea de undă,  $\nu$  frecvența radiației iar  $c$  reprezintă viteza luminii,  $3 \times 10^{10}$  cm/s. Mărimea  $1/\lambda$  se numește *număr de undă*. Energia unei radiații electromagnetice este dată de relația:

$$E = h \cdot \nu \quad (1.24)$$

unde  $E$  este energia iar  $h$  este constanta lui Planck, având valoarea  $6,626 \cdot 10^{-27}$  erg x s.

Introducând pe  $\nu$  din relația (1.23) în relația (1.24) putem scrie:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1.25)$$

Pentru un mol de fotoni care ar avea asociată lungimea de undă  $\lambda$  rezultă:

$$E = \frac{N \cdot h \cdot c}{\lambda} \quad (1.26)$$

unde  $N$ , numărul lui Avogadro, are valoarea  $6,023 \cdot 10^{23}$ ;  $h$ , constanta lui Planck  $6,625 \cdot 10^{-27}$  erg x s;  $c$  viteza luminii,  $3 \cdot 10^{10}$  cm/s. Efectuând calculele rezultă:

$$\begin{aligned} E &= \frac{11,97 \cdot 10^7}{\lambda} \text{ erg} \cdot \text{mol}^{-1} = \frac{11,97 \cdot 10^{-3}}{\lambda} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} = \\ &= \frac{2,86 \cdot 10^{-3}}{\lambda} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} = \frac{1,24 \cdot 10^{-4}}{\lambda} \text{ eV} \quad (1.27) \end{aligned}$$

Lungimea de undă  $\lambda$  se măsoară în cm. Se știe că un *electron-volt* (eV) este energia pe care o câștigă un electron accelerat prin parcurgerea liberă a unei diferențe de potențial de un volt.

$$1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-12} \text{ erg}$$

Un mol de electroni, adică  $N$  electroni ( $N$ , nr. lui Avogadro), ce străbat o diferență de potențial de un volt posedă o energie totală de:

$$1 \text{ eV} \cdot N = 3,83 \cdot 10^{-20} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} = 23,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Cu ajutorul relației (1.27) se poate calcula energia fiecărui domeniu spectral prezentat în Tabelul 1.7.

Domeniul vizibil al spectrului reprezintă radiațiile cu lungimea de undă cuprinsă între 400 nm (violet) și 760 nm (roșu) (Tabel 1.8) care produc senzația de lumină în ochiul omenesc.

Radiația care reprezintă o singură lungime de undă se numește *monocromatică*. De fapt o astfel de radiație este o idealizare; ea nu se situează la o valoare strictă ci pe un interval. De ex. linia  $^{86}\text{Kr}$  ( $\lambda = 6057 \text{ \AA}$ ) se situează pe un spectru cu lățimea de  $0,0044 \text{ \AA}$  iar radiația  $^{40}\text{Ca}$  ( $\lambda = 4226 \text{ \AA}$ ) pe un domeniu de  $0,0016 \text{ \AA}$ . În mod practic radiația monocromatică se definește ca un domeniu de lungimi de undă cu lungimea de maximum  $3 \text{ \AA}$ . De ex.  $5.000 \pm 1,5 \text{ \AA}$ . Laserul și maserul produc radiații aproape monocromatice.

Tabelul 1.7.

**Domenii spectrale**

Lungimea de undă		Energia radiației	Domenii spectrale
cm	alte unități		
$10^3$ $10^2$	1 m		unde radio
10 1 $10^{-1}$	1 cm 1 mm		microunde
$10^{-2}$	$100 \mu\text{m}$		IR îndepărtat
$10^{-3}$ $10^{-4}$	$10 \mu\text{m}$ $1 \mu\text{m}$	2,86 kcal/mol 28,6 kcal/mol	IR apropiat
			VIZIBIL (vezi tabel 1.8)
$10^{-5}$			UV apropiat
$10^{-6}$	10 nm 100 Å	2860 kcal/mol	UV îndepărtat (vid)
$10^{-7}$ $10^{-8}$	1 nm 1 Å		raze X
$10^{-9}$ $10^{-10}$	0,01 Å	0,124 MeV 1,24 MeV	raze $\gamma$

Domeniul vizibil al spectrului

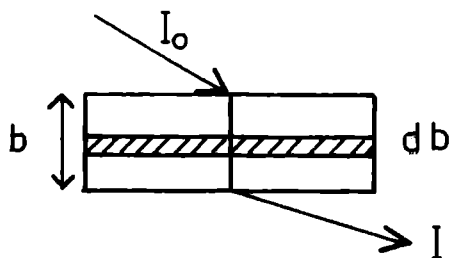
Dimeniul (nm)	Culoarea	Culoarea complementară
400-435	violet	galben-verde
435-480	albastru	galben
480-490	verde-albastru	portocaliu
490-500	albastru-verde	roșu
500-560	verde	purpuriu
560-580	galben-verde	violet
580-595	galben	albastru
595-605	portocaliu	verde-albastru
605-760	roșu	albastru-verde

### 1. 4. 2. Absorbția luminii. Legea Lambert-Beer

Când lumina, prin care vom desemna aici undele electromagnetice de orice lungime de undă, este transmisă printr-un mediu intensitatea ei scade. La această scădere contribuie în mod inegal trei procese: absorbția, reflexia și difuzia. În cazul când reflexia și difuzia sunt neglijabile vorbim de absorbția radiației. Scăderea intensității luminii în funcție de grosimea stratului străbătut se conformează, în anumite condiții, legii Lambert-Beer. Pentru a ajunge la această lege se consideră un strat de material (substanță) absorbant de grosime  $b$  (Fig. 1.5). Fie  $I_0$  intensitatea radiației incidente și  $I$  intensitatea radiației transmise după traversarea stratului  $b$ . Intensitatea  $dI$  absorbită de stratul de grosime infitezimală  $db$  este proporțională cu intensitatea  $I$  a luminii care atinge acest strat precum și cu grosimea  $db$ :

$$dI = -k \cdot I \cdot db \quad (1.28)$$

Semnul minus arată că  $I$  scade atunci când  $b$  crește; prin urmare  $dI$  și  $db$  sunt de asemenea de semne contrare.  $k$  este o constantă de proporționalitate caracteristică substanței studiate. Separând variabilele și integrând între limitele  $I_0$  și  $I$ , respectiv  $0$  și  $b$  rezultă:



$$\ln \frac{I}{I_0} = -k \cdot b \quad (1.29)$$

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot b} \quad (1.30)$$

Fig. 1.5. Schemă ilustrând legea Lambert-Beer

care este tocmai legea Lambert-Beer. Constanta  $k$  se numește *coeficient de absorbție*. Sensul fizic al lui  $k$  se dezvăluie punând în ecuația (1.30) condiția:

$$k \cdot b = 1 \quad (1.31)$$

Rezultă:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-1} \approx 0,368 \text{ sau } \frac{I_0}{I} = e \quad (1.32)$$

Prin urmare coeficientul de absorbție  $k$  reprezintă inversul grosimii unui strat pentru care intensitatea radiației incidente scade de  $e$  ori. Dimensiunea lui  $k$  este  $\text{lungime}^{-1}$ .

Raportul  $I/I_0$  se numește *transmitanță* sau *transparență* și are valori cuprinse între 0 și 1:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1.33)$$

Cu cât puterea absorbantă a mediului este mai mare transmitanța  $T$  este mai mică.

Trecând la logaritmi zecimali în expresia (1.29) rezultă:

$$\log \frac{I}{I_0} = -0,4343 k \cdot b \quad (1.34)$$

Dacă notăm  $0,4343 \cdot k = a$  obținem:

$$I = I_0 \cdot 10^{-a \cdot b} \quad (1.35)$$

unde  $a$  se numește *coeficient de extincție* și, prin analogie cu (1.31) și (1.32), reprezintă inversul grosimii aceluși strat pentru care intensitatea radiației incidente scade de 10 ori;  $a$  are de asemenea ca dimensiune  $L^{-1}$ .

Coeficientul de extincție este independent de  $b$  și  $I_0$  dar este dependent de natura chimică a mediului absorbant și de lungimea de undă a radiației incidente. Prin urmare legea Lambert-Beer este valabilă numai pentru o radiație monocromatică. Dacă mediul absorbant este o soluție coeficientul de extincție  $a$  depinde și de concentrație.

Cologaritmumul transmitanței se numește *extincția* sau *densitatea optică* sau *absorbanța* mediului:

$$E = \log \frac{I_0}{I} \quad (1.36)$$

Din (1.35) și (1.36) avem:

$$E = a \cdot b \quad (1.37)$$

Ecuția (1.37) este o altă formă de exprimare a legii Lambert-Beer din care rezultă că extincția  $E$  este o *mărime aditivă*: extincția este proporțională cu grosimea stratului absorbant.

Dependența absorbției de concentrație este de asemenea conținută în legea Lambert-Beer: coeficientul de extincție, ca și cel de absorbție, este proporțional cu concentrația.

Această proporționalitate este descrisă, în funcție de modul de exprimare al concentrației, prin relațiile:

$$a = \epsilon \cdot c_1 \quad (1.38)$$

$$a = \gamma \cdot c_2 \quad (1.39)$$

Factorul de proporționalitate  $\epsilon$  constituie *coeficientul molar de extincție* sau *absorbțivitatea molară a substanței*; concentrația  $c_1$  se exprimă în acest caz în mol/1. În cazul când concentrația  $c_2$  se exprimă procentual se utilizează relația (1.39) iar  $\gamma$  este *coeficientul de extincție specifică* sau *absorbțivitatea specifică* a substanței.

Înlocuind (1.38) în (1.35) și în (1.37) rezultă:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c_1 \cdot b} \quad (1.40)$$

respectiv:

$$E = \epsilon \cdot c_1 \cdot b \quad (1.41)$$

Punând în ecuația (1.41) condiția ca valoarea lui  $c_1$  să fie 1 mol/1 iar valoarea drumului optic  $b$  egală cu 1 cm rezultă:

$$E = \epsilon \quad (1.42)$$

Prin urmare coeficientul molar de extincție este extincția unei soluții cu concentrația 1 mol/1 la un drum optic  $b = 1$  cm. Practic, valoarea lui  $\epsilon$  se determină

măsurând extincția unor soluții mult mai diluate decât 1 mol/l, mai precis în domeniul în care E este proporțional cu c, după care se calculează pentru concentrația de 1 mol/l. Dimensiunile lui  $\epsilon$  sunt fie  $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , fie  $\text{cm}^2/\text{mol}$ , în cazul al doilea valoarea conține și factorul 1.000 față de prima exprimare (deoarece 1 litru = 1.000  $\text{cm}^3$ ).

Ecuția (1.41) exprimă o lege fundamentală a spectrofotometriei de absorbție: extincția este proporțională cu grosimea stratului absorbant (drumul optic) și cu concentrația. Coeficientul molar de extincție  $\epsilon$  este o constantă caracteristică a substanței absorbante. Mărimea coeficientului molar de extincție denotă sensibilitatea cu care se poate determina concentrația unui compus.

(ii) Înlocuind (1.39) în (1.37) rezultă:

$$E = \gamma \cdot c_2 \cdot b \quad (1.43)$$

unde E este extincția, b drumul optic (ce se măsoară în cm) iar c concentrația procentuală;  $\gamma$  se numește în acest caz *coeficientul de extincție specifică* și este extincția unei soluții cu concentrația 1% la un drum optic  $b = 1$  cm.

Este de la sine înțeles că trecerea de la coeficientul molar de extincție  $\epsilon$  la coeficientul de extincție specifică  $\gamma$ , sau invers, se face cunoscând *masa moleculară* a compusului studiat precum și variația *densității* soluției cu concentrația.

### 1. 4. 3. Spectre de absorbție

#### Introducere

Când lumina este absorbită de către o moleculă, aceasta suferă o tranziție dintr-o stare de energie mai joasă într-o stare de energie mai înaltă. Dacă molecula este monoatomică energia absorbită este utilizată numai pentru a ridica nivelele de energie ale electronilor. Dacă molecula este alcătuită din mai mulți atomi lumina absorbită poate realiza schimbări în energia electronică, vibrațională și rotațională. Tranzițiile electronice dau absorbție (sau emisie) în partea vizibilă și ultravioletă a spectrului, pe când schimbările vibraționale și rotaționale dau absorbție (sau emisie) respectiv în infraroșu apropiat și depărtat. Tranzițiile electronice sunt de regulă însoțite de celelalte două. Studiul acestor schimbări energetice dă informații despre structura moleculelor.

Spectrul	Regiunea
Ultraviolet de vid	100-200 nm
Ultraviolet	200-400 nm
Vizibil	400-760 nm
Infraroșu apropiat	$12.500-4000 \text{ cm}^{-1}$ (0,8-2,5 $\mu$ )
Infraroșu	$4000-650 \text{ cm}^{-1}$ (2,5-15,4 $\mu$ )
Microunde	1 mm-10 cm ( $3 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^3$ MHz)

Dacă  $I_0$  este intensitatea unui flux incident de lumină monocromatică și  $I$  acela al fluxului emergent care a străbătut un mediu absorbant de grosime  $x$  cm, intensitatea  $I$  variază după legea Lambert-Beer. Reprezentarea extincției (sau coeficientul molar de extincție) față de lungimea de undă (sau frecvența) constituie *spectrul* (sau *curba de absorbție*) și acesta este caracteristic pentru un compus pur. Se înțelege că reprezentarea transmitanței față de lungimea de undă (sau frecvență) va da un spectru „complementar” față de precedentul (în sensul că extincție mare înseamnă transmitanță mică și invers).

Deosebit de importante sunt lungimile de undă ale maximelor de absorbție și intensitatea lor concretizată ca valoare a coeficientului molar de extincție. Pentru spectrele în ultraviolet se prezintă lungimea de undă (în Å sau nm) a maximumului de absorbție și valoarea lui  $\epsilon$  la lungimea de undă respectivă. De ex.  $\lambda_{\max}$  (EtOH) 2800 Å (sau 280 nm) ( $\epsilon$  4.000), ceea ce înseamnă că soluția etanolică a substanței are un coeficient molar de extincție de 4.000 unități de extincție ( $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) la o lungime de undă de 2800 Å sau 280 nm.

Spectrele infraroșii sunt relatate ca de ex.  $\lambda_{\max}$  (CS<sub>2</sub>) 1030 cm<sup>-1</sup> (s), ceea ce înseamnă că compusul, în soluție de CS<sub>2</sub>, are maxim de absorbție puternic la 1030 cm<sup>-1</sup>. La înregistrarea spectrelor în infraroșu se obișnuiește să se utilizeze următoarele litere pentru a indica intensitatea: m (mediu), s (strong = puternic, intens), v (variabil), v.s. (very strong = foarte puternic) și w (weak = slab).

### 1.4.3.1. Spectroscopia în ultraviolet și vizibil

Înainte de a discuta aplicațiile spectroscopiei în ultraviolet și vizibil vom menționa mai întâi diferiți termeni utilizați. Un *cromofor* este o unitate structurală care produce absorbția luminii în regiunea ultravioletă sau a culorii în regiunea vizibilă. Un *auxocrom* este orice grupare care, deși nu este un cromofor, realizează o deplasare spre roșu, adică o schimbare de absorbție către regiunea roșie a spectrului, când este atașat la un cromofor. Astfel combinația cromoforului și auxocromului se comportă ca un cromofor nou. Un *efect batocromic* (*deplasare spre roșu*) și un *efect hipsocromic* (*deplasare spre albastru*) sunt strămutarea benzii de absorbție spre lungimi de undă mai lungi și respectiv mai scurte. *Efectul hipercrom* și *efectul hipocrom* crește și respectiv descrește intensitatea absorbției.

Conform teoriei orbitalilor moleculari un atom sau o moleculă este excitat(ă) când un electron este transferat dintr-un orbital *de legătură* pe un orbital *de antilegătură*. În acest sens se pot realiza tranziții electronice în diferite feluri. O tranziție în care un electron  $\sigma$  de legătură este excitat la un orbital  $\sigma^*$  de



antilegătură se numește tranziție  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ . În același fel  $\pi \rightarrow \pi^*$  reprezintă tranziția unui electron  $\pi$  de legătură pe un orbital  $\pi^*$  de antilegătură. (Fig. 1.6.).

O tranziție  $n \rightarrow \pi^*$  reprezintă tranziția unui electron aparținând unei perechi de electroni de nelegătură (electroni neparticipanți) pe un orbital  $\pi^*$  de antilegătură. Acest tip de tranziție se realizează cu compuși care conțin legături duble care implică heteroatomi de ex.

$=C=O$ ,  $=C=S$ ,  $=C=N$ -, etc., și pot fi reprezentate după cum urmează:

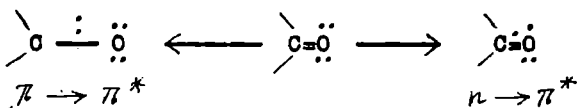
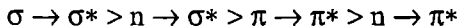


Fig. 1.6. arată diagrama modelului de nivele energetice și se poate vedea că tranzițiile sunt realizate prin absorbția a diferite cantități de energie.

Din marele număr de posibilități numai următoarele tranziții sunt permise, și ordinea lor generală de diferență energetică este:



Legăturile duble izolate nu dau benzi puternice dar când sunt prezente sisteme conjugate benzile sunt de obicei pronunțate în regiunea cu lungime de undă mai lungă. Astfel o aplicație importantă a spectroscopiei în UV și vizibil este detectarea și elucidarea naturii sistemelor conjugate (inclusiv aromaticele). Aceasta este realizată adesea prin folosirea moleculelor „model”, adică o moleculă „simplă” care diferă de compusul investigat într-un fel care să n-aibă nici un efect asupra cromoforului.

*Studiile unor spectre în UV-vizibil.* Alcanii absorb în regiunea 140-150 nm ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ) și când sunt combinați cu diferiți auxocromi apar benzi noi ( $n \rightarrow \sigma^*$ ) de absorbție la lungimi de undă mai lungi, de ex. RCl, 170-175; RBr, 200-210; RI, 255-260; ROH și  $R_2O$ , 180-185;  $RNH_2$ , 190-200 nm (R, alchil). Pe de altă parte cromoforul carbonil (în diferite grupări funcționale) absoarbe în general peste 200 nm, de ex. aldehidele, 180 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) și 290-295 ( $n \rightarrow \pi^*$ ); cetonele 190 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) și 270-280 ( $n \rightarrow \pi^*$ ); acizi monocarboxilici saturați, 200-210 ( $n \rightarrow \pi^*$ ); esteri, 200-205 ( $n \rightarrow \pi^*$ ); amide, 205-220 ( $n \rightarrow \pi^*$ ). Chiar această absorbție la lungimi de undă mai lungi de 200 nm permite identificarea multor cromofori în compușii organici.

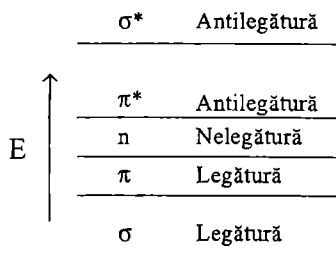


Fig. 1. 6. Diagrama nivelelor energetice.

Când legăturile duble etilenice sunt în conjugare sau conjugate cu o grupare carbonil, absorbția se mută la lungimi de undă mai lungi, de ex. pentru crotonaldehidă există o bandă la 220 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) și alta la 321 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) (vezi și Tabelul 1.9.). Un aspect interesant al sistemelor conjugate este că geometria dienelor și trienelor conjugate afectează atât  $\lambda_{\max}$  cât și pe  $\epsilon$ . În general compușii aciclici absorb la o lungime de undă mai scurtă și au o intensitate mai mare decât compușii ciclici corespunzători, de ex. butadiena, 217 ( $\epsilon = 21.000$ ) și ciclohexa-1, 3-diena, 257 ( $\epsilon = 8.000$ ).  $\lambda_{\max}$  și  $\epsilon$  sunt de asemenea afectați de tensiunea din moleculă, cu cât este mai mare tensiunea cu atât este mai scurtă lungimea de undă, de ex. ciclobutanona, 281 nm; ciclohexanona, 290 nm. Efectele sterice, când operează, descreșc conjugarea astfel că izomerul trans va absorbi la o lungime de undă mai lungă decât izomerul cis.

Compușii aromatici arată un număr de benzi, de ex. benzenul absoarbe la 184 ( $\epsilon = 60.000$ ), 204 ( $\epsilon = 7.400$ ) și 254 ( $\epsilon = 200$ ) nm. Toate aceste benzi constituie tranziții  $\pi \rightarrow \pi^*$  iar banda 254 este numită banda benzenoidă și este

*Tabelul 1. 9.*

**Maxime de absorbție în UV (în paranteză  $\epsilon$ ).**

Compusul*	$\lambda_{\max}$ nm( $\epsilon$ )	Compusul	$\lambda_{\max}$ nm( $\epsilon$ )
Etilenă	175 (5.000)	Rezorcinol	277 (2.200)
Butadienă	217 (21.000)	Quinol	225 (5.000)
Hexatrienă	258 (35.000)		293 (2.700)
Acetaldehidă	180 (10.000)	o-Nitroanilină	222 (16.000)
	290 (15)		275 (5.000)
Acetonă	190 (900)	m-Nitroanilină	235 (16.000)
	280 (12)		373 (1.500)
Crotonaldehidă	220 (16.000)	p-Nitroanilină	229 (5.000)
	321 (20)		375 (16.000)
Benzen	204 (7.400)	Naftalină	220 (100.000)
	254 (200)		275 (5.700)
Toluen	206,5 (7.000)	Antracen	253 (200.000)
	261 (225)		375 (8.000)
Clorbenzen	210 (7.400)	Fenantren	252 (50.000)
	264 (200)		293 (16.000)
Anilină	230 (8.600)	Furan	205 (6.000)
	280 (1.400)		250 (2)
Nitrobenzen	270 (7.800)	Tiofen	235 (4.500)
Fenol	210 (6.200)	Pirol	210 (10.000)
	271 (1.450)		240 (400)
Catecol	214 (6.000)	Piridină	252 (2.000)
	278 (2.600)	Chinolină	313 (2.500)
		Stilben (trans)	295 (27.000)
		Stilben (cis)	280 (10.500)

\* În cele mai multe cazuri solvent a fost etanolul

caracterizată printr-un grad mare de structură fină (Fig. 1. 7.). Pentru derivații benzenului această bandă benzenoidă se realizează în general între 250 și 280 nm, dar pentru aromatische polinucleare se mută la lungimi de undă mai lungi deoarece numărul de cicluri crește (vezi Tabelul 1. 9.).

Toți substituenții au în benzen un efect batocromic (vezi Tabelul 1. 9.). Pentru derivații disubstituiți ai benzenului pozițiile

maximelor de absorbție depind de orientarea substituenților. Totodată, pentru disubstituția para, există două situații: când substituenții interacționează electronic în același sens, de ex.  $\text{NH}_2$  și  $\text{NO}_2$ , sau când duc la o polarizare opusă, de ex.  $\text{NH}_2$  și  $\text{OCH}_3$ . În ultimul caz maximumul de absorbție este de obicei aproape de acela al cromoforului mai puternic.

Diferite benzi în compușii benzenoizi sunt numite uneori prin litere, de ex. benzi E (180-220 nm), K (220-250 nm), B (250-290 nm) și R (275-330 nm). Benzile E și B se ivesc din tranziții  $\pi \rightarrow \pi^*$ , banda K, care este de asemenea datorată tranzițiilor  $\pi \rightarrow \pi^*$ , este prezentă la compușii aromatici cu ciclu benzenic direct atașat la un grup care conține o legătură multiplă, de ex. stirenul, benzaldehida, nitrobenzenul, acidul benzoic etc. Pe de altă parte dacă acest grup (direct atașat la ciclul benzenic) conține de asemenea un atom cu o pereche de electroni neparticipanți atunci sunt posibile tranziții  $n \rightarrow \pi^*$ , și acestea dau naștere benzii R. Deoarece benzile B și R au o regiune de suprapunere și deoarece banda B are o intensitate mai mare decât banda R ultima este adesea „mascată” de către prima.

Benzile K și R se realizează de asemenea în sistemele conjugate aciclice.

În literatura anterioară se utilizau litere pentru a desemna diferite tipuri de tranziții electronice:  $N \rightarrow V$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ );  $N \rightarrow A$  ( $n \rightarrow \pi^*$ );  $N \rightarrow B$  ( $n \rightarrow \sigma^*$ ).

Cazul anilinei este valoros pentru considerațiile care urmează. În etanol  $\lambda_{\text{max}}$  este 230 nm (fig. 1.8), dar în acid apos diluat  $\lambda_{\text{max}}$  este 203 nm. În baza liberă perechea de electroni neparticipanți a azotului poate intra în conjugare cu

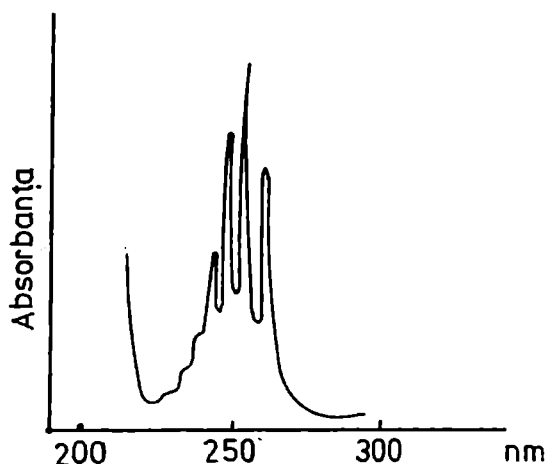


Fig. 1. 7. Spectrul UV al benzenului în etanol.

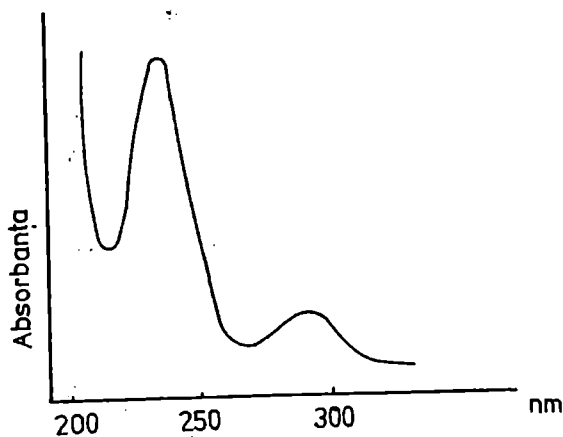


Fig. 1.8. Spectrul UV al anilinei în etanol.

Compușii heterociclici au în mare măsură spectre UV similare cu cele din compușii benzenoizi analogi (Tabelul 1. 9).

Este de remarcat deasemenea efectul solvenților. Etanolul este utilizat cel mai adesea deoarece este un bun solvent pentru mulți compuși organici și este transparent la lungimi de undă mai mari de 200 nm. Totuși solvenții polari (și cei care pot forma legături de hidrogen) tind să interacționeze electrostatic (și formează legături de hidrogen) cu diferiți cromofori, de ex. gruparea carbonil. Aceasta schimbă distribuția de sarcină în moleculă și are ca rezultat o delocalizare crescută. Pentru tranziții  $\pi \rightarrow \pi^*$ , sunt stabilizate atât stările de bază cât și cele excitate, iar maximul de absorbție se deplasează la lungimi de undă mai lungi. Pe de altă parte, pentru tranziții  $n \rightarrow \pi^*$ , starea de bază este, de ex., un atom de hidrogen legat la o pereche de electroni neparticipanți, în timp ce în starea excitată legătura de hidrogen implică numai *un electron* din perechea de electroni neparticipanți (celălalt fiind deja promovat într-o stare de energie mai înaltă). În aceste circumstanțe starea de bază este mai stabilizată decât starea excitată și în consecință absorbția se deplasează la lungimi de undă mai scurte. Această deplasare spre albastru la creșterea polarității solventului, de ex. ciclohexan  $\rightarrow$  etanol  $\rightarrow$  apă, este un mijloc util de recunoaștere a tranzițiilor  $n \rightarrow \pi^*$ .

#### 1.4.3.2. Spectre de absorbție în infraroșu ( $4.000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ )

Absorbția în regiunea infraroșie este datorată variației energiei vibraționale. Cerința esențială pentru ca o substanță să absoarbă în această regiune este ca vibrațiile din moleculă să dea naștere la o distribuție de sarcină asimetrică. Astfel

ciclul benzenic. Astfel în anilină există delocalizare crescută și în consecință maximul de absorbție este deplasat spre lungimi de undă mai lungi. În cationul aniliniu perechea de electroni neparticipanți nu mai este disponibilă pentru conjugare cu ciclul și astfel molecula se comportă ca benzenul însuși (care este cromofor în ambii compuși).

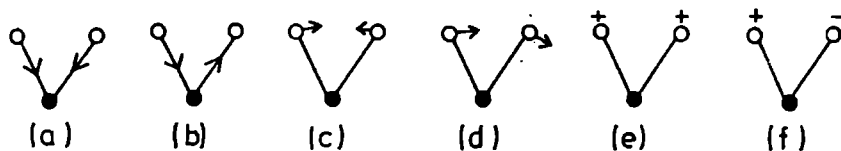


Fig. 1.9. Mișcări posibile în cazul unei molecule neliniare.

(a) întindere simetrică; (b) întindere asimetrică; (c) deformare în plan (forfecare); (d) deformare în plan (balansare, oscilare); (e) deformare în afara planului (pendulare); (f) deformare în afara planului (răsucire).

nu este necesar pentru molecula respectivă să posede un moment de dipol permanent. După cum tranzițiile electronice sunt cuantificate tot așa sunt cuantificate nivelele de energie vibrațională și rotațională. O moleculă neliniară poate suferi un număr de mișcări vibraționale, principalele două tipuri fiind *întinderea* (vibrația de-a lungul legăturii) și *deformarea* (*îndoirea*; deplasări perpendiculare pe legături). Fig. 1.9 ilustrează câteva moduri posibile pentru o moleculă neliniară (asim. = asimetric; def. = deformare; înt. = întindere; sim. = simetric; semnele plus și minus reprezintă mișcarea relativă perpendiculară pe pagină).

Când o moleculă conține  $n$  atomi există  $3n-6$  (în cazul unei molecule liniare,  $3n-5$ ) frecvențe vibraționale fundamentale. Acestea nu sunt toate diferite și s-ar putea să nu apară toate în regiunea de absorbție în IR. Numărul real de frecvențe fundamentale depinde în mare măsură de simetria moleculei și cu cât molecula este mai puțin simetrică cu atât este mai mare numărul frecvențelor vibraționale diferite. În plus s-ar putea să fie prezente unele frecvențe noi, altele decât cele fundamentale. Ele sunt de obicei cu puțin mai mici decât multiplii frecvențelor fundamentale și sunt cunoscute ca supratonuri sau armonice. Astfel pe măsură ce  $n$  crește spectrul IR devine din ce în ce mai complicat.

Regiunile de întindere au frecvențe mai înalte (lungimi de undă mai scurte) decât regiunile de deformare, iar intensitățile primelor sunt mai mari decât cele ale ultimelor. Cu toate că masele atomilor legați influențează predominant frecvența absorbției, și alte efecte joacă un rol important ca de ex. mediul (adică natura atomilor vecini), efecte sterice etc. Astfel, în general, o grupare particulară nu va avea o lungime de undă de absorbție maximă fixă ci va avea o regiune de absorbție, maximul real în această regiune depinzând de restul moleculei. Spectrul depinde deasemenea de starea fizică a compusului: gaz, lichid (ca film subțire), solid (ca strat subțire sau ca pastilă), sau soluție (preferabil diluată în  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  sau  $\text{CS}_2$ ).

În examinarea inițială a spectrului practica uzuală este de a căuta prezența diferitelor grupări funcționale. În acest fel compusul este atribuit unei anumite clase structurale. Cunoașterea formulei moleculare ajută adesea pentru a elimina

unele dintre alternative, iar reacțiile chimice ale compusului constituie un auxiliar prețios în această direcție. Identificarea compușilor este realizată prin comparație cu spectre publicate (sau cu spectrul unui specimen autentic). Regiunea  $1.400-650\text{ cm}^{-1}$  este cunoscută ca „regiunea amprentei”; aceasta este regiunea verificată de obicei pentru identificare, deoarece aceasta este asociată cu variații energetice vibraționale (și rotaționale) ale *scheletului molecular*, și astfel este caracteristică compusului.

Dacă a fost găsită o bandă care corespunde unei grupări particulare prezența acestei grupări trebuie să fie confirmată prin atribuirea prezenței unei alte benzi care este deasemenea caracteristică grupării, de ex. esterii alifatici saturați arată o bandă puternică în regiunea  $1.750-1.735\text{ cm}^{-1}$  (înt. C = O) și o altă bandă puternică în regiunea  $1.250-1.170\text{ cm}^{-1}$  (înt. C-O). În plus absența unei benzi care este caracteristică unei grupări particulare nu este o dovadă concludentă că această grupare nu este prezentă în moleculă. O cauză pentru aceasta este că două grupări într-o moleculă pot interacționa, și rezultatul este că ambele regiuni sunt acum diferite de regiunile individuale așteptate. Este prin urmare întotdeauna de dorit să existe și informație chimică despre compus și deasemenea date spectroscopice obținute din alte metode (UV și RMN).

Frecvența de absorbție a unei legături formate de către două elemente date este micșorată dacă unul dintre atomi este înlocuit cu un izotop mai greu. Se utilizează aceasta în atribuirea benzilor de absorbție în IR, de ex. benzile în  $\text{CHCl}_3$ , care sunt deplasate la frecvențe mai joase în  $\text{CDCl}_3$ , pot fi astfel atribuite legăturilor C-H și C-D. Micșorarea frecvenței este deasemenea observată de obicei când unul dintre atomi este înlocuit de către un atom mai greu în aceeași grupă periodică (vezi halogenuri de alchil, Tabelul 1. 10).

Regiunile de absorbție ale grupărilor funcționale au fost obținute empiric. Tabelul 1. 10 dă regiunile de absorbție pentru un număr de tipuri de legături.

În afară de elucidarea structurală, studiul spectrelor în IR conduce la informații asupra multor tipuri de probleme, de exemplu:

(i) Spectroscopia în IR a fost utilizată pentru a distinge între izomerii geometrici. Spectroscopia în IR a fost de asemenea o metodă foarte valoroasă în cazul studiilor conformaționale.

(ii) Cei trei benzeni disubstituiți izomeri au benzi de absorbție caracteristice și aceasta oferă un mijloc de determinare a orientării lor.

(iii) Spectroscopia în IR a dat o mare cantitate de informații despre problema rotației libere în jurul legăturii simple; de exemplu, deoarece intensitatea absorbției este proporțională cu concentrația, a fost posibil de atribuit prezența și cantitățile

## Absorbția în IR a unor legături chimice

Legătura	Gruparea	Regiunea (cm <sup>-1</sup> )*
1	2	3
C-H ≡	Metil (Alcani)  Metilen: Alcani și cicloalcani (cu excepția ciclopropanului) Metin	2975-2950
		2885-2860
		1470-1435 (def.)
		1385-1370 (def.)
		2940-2915
		2870-2845
		1480-1440 (def.)
		2990-2880
		3040-3010
		730-665 (def.)
=C-H	Alchene și cicloalchene cis-Alchene trans-Alchene Aromatice	970-960 (def.)
		3080-3030
		3310-3300
≡C-H	RC≡C-H	2880-2650
		1680-1620
C-H	Alchene	1660-1580
		1625-1600 (în plan)
C=C	Conjugate la C=C sau C=O Aromatice	1590-1575 (în plan)
		1525-1475 (în plan)
C≡C	RC≡CH R <sup>1</sup> C≡CR <sup>2</sup>	2140-2100
		2260-2190
C-F	Alchil fluoruri	1100-1000
C-Cl	Alchil cloruri	750-700
C-Br	Alchil bromuri	600-500
C-I	Alchil ioduri	600-500
O-H	Alcooli și fenoli: liberi Cu legături de hidrogen (intermoleculare) Cu legături de hidrogen (intramoleculare) Acizi (liberi) Oxime β-Ceto-esteri (chelatați)	3670-3580
		3550-3230
		3590-3420
		3560-3500
		3650-3500
		în jur de 2700
N-H	Amine Alifatic și aromatice primare și secundare: libere  legate Amide primare: libere legate	3500-3300 (2 benzi pentru primare; 1 bandă pentru secundare)
		3400-3100
		aprox. 3500
		aprox. 3400
		aprox. 3350
C=O	Anhidride acide: aciclice ciclice  Cloruri acide Acizi: alifatici aromatici	aprox. 3200
		1840-1800
		1780-1740
		1870-1830
		1800-1760
		1815-1785
		1725-1700
1700-1680		

\* Toate regiunile, cu excepția celor specificate în paranteză, sunt pentru vibrațiile de întindere.

1	2	3
	Alchide:	
	alifatic	1740-1720
	aromatic	1715-1695
	Amide (primare)	aprox. 1690
		aprox. 1650
	alfa-Dicetone	1730-1710
	$\beta$ -Dicetone (enoli)	1640-1540
	gamma-Dicetone	1725-1705
	Esteri ( $R^1COOR^2$ )	1750-1735
	$\beta$ -Ceto-esteri (enoli)	1655-1635
	Cetone:	
	alifatic	1725-1700
	alkarilic	1700-1680
	ciclic	1780-1700
	diaril	1670-1660
	Lactone:	
	gamma-	1780-1760
	delta-	1750-1735
	Chinone (2 CO într-un inel)	1690-1660
	Acizi $\alpha$ , $\beta$ -nesaturați	1715-1690
	Alchide $\alpha$ , $\beta$ -nesaturate	1705-1680
	Cetone $\alpha$ , $\beta$ -nesaturate	1685-1665
C-O	Alcooli:	
	primari	aprox. 1050
	secundari	aprox. 1100
	terțari	aprox. 1150
	Epoxizi	1260-1240
	Esteri	1250-1170
C-N	Eteri ( $-CH_2-O-CH_2-$ )	1150-1060
	Amine:	
	alifatic	1220-1020
	aromatic:	
	primare	1340-1250
	secundare	1350-1280
	terțiare	1360-1310
C=N	Oxime ( $R_2C = NOH$ )	1690-1630
$C\equiv N$	Alchil cianuri	2260-2240
$NO_2$	Alifatic:	
	primar și secundar	1565-1545 ( $NO_2$ vib.)
		1385-1360 ( $NO_2$ vib.)
	terțiar	1545-1530 ( $NO_2$ vib.)
		1360-1340 ( $NO_2$ vib.)
	Aromatic	1550-1510 ( $NO_2$ vib.)
		1365-1335 ( $NO_2$ vib.)
	Benzen substituit:	
	mono-	770-730
		710-690
	di-: o-	770-735
	m-	800-750
		720-680
	p-	840-810

\*Toate regiunile, cu excepția celor specificate în paranteză, sunt pentru vibrațiile de întindere.



a diferite conformații într-un amestec (intensitățile variază cu temperatura când sunt prezente două sau mai multe conformații).

(iv) Au fost examinate amestecurile tautomere și obținute cantitățile de tautomeri. În multe cazuri existența tautomeriei poate fi atribuită prin spectroscopia în IR (cf. iii).

(v) Spectroscopia în IR pare a fi cel mai bun mijloc de atribuire a prezenței legăturii de hidrogen (atât în asociere, cât și în chelatizare). În experimente uzuale nu este posibil de a distinge între legătura de hidrogen intra- și intermoleculară. Aceste două moduri de legare pot fi diferențiate prin obținerea a o serie de spectre la diferite diluții. Pe măsură ce diluția crește raportul absorbției: concentrație scade în cazul legăturii de hidrogen intermolecularare, dar raportul respectiv rămâne constant odată cu creșterea diluției în cazul legăturii de hidrogen intramolecularare.

De asemenea, a fost utilizată măsurarea intensității benzii hidroxil *libere* pentru a atribui numărul de grupări hidroxil prezente într-o moleculă (cu o formulă moleculară cunoscută).

(vi) Este posibil de evaluat momentele de dipol din spectre infraroșii.

(vii) Când o legătură între doi atomi suferă o întindere acționează imediat o forță de revenire. Pentru o valoare mică a întinderii forța de revenire este direct proporțională cu deformarea:

$$f = k \cdot d \quad (1.44)$$

unde  $f$  este forța de întindere;  $d$  variația distanței dintre cei doi atomi;  $k$  constanta de forță de întindere a legăturii. Din spectrele în IR se poate afla frecvența de vibrație  $\nu$ , iar aceasta permite calcularea constantei de forță prin utilizarea relației:

$$k = 4 \cdot \pi^2 \cdot \nu^2 \cdot m \quad (1.45)$$

Constanta de forță  $k$  permite o evaluare a tăriei legăturii chimice dintre atomii respectivi. În Tabelul 1. 11 sunt date câteva valori ale constantei de forță pentru o serie de legături chimice, deduse din spectrele IR ale moleculelor biatomice și poliatomice.

Tabelul 1. 11.

Constante de forță (în dyn x cm<sup>-1</sup>) ale unor legături chimice

Legătura	H-H	C-H	C-C	C-Cl	Cl-Cl	Br-Br	I-I	C=C	C≡C	C=O	C≡O	N≡N
$k \cdot 10^{-5}$	4,8	5,0	4,34	3,12	3,18	2,38	1,68	10,8	14,9	12,9	18,6	22,2

Se observă că legătura dublă C=C este cam de două ori, iar legătura triplă cam de trei ori, mai puternică decât legătura simplă C-C. Totodată, constanta de forță a monoxidului de carbon este cam cu 30% mai mare decât a unei legături duble normale C=O, fiind foarte apropiată de constanta de forță a legăturii triple C≡C și N≡N. Aceasta dovedește că molecula monoxidului de carbon are structura C<sup>-</sup>≡O<sup>+</sup>.

### 1. 4. 3. 3. Spectroscopia de absorbție în microunde în stare gazoasă (1 mm-10 cm).

Microundele sunt studiate acum îndeosebi cu ajutorul tehnicilor radio. Spectroscopia în microunde constă din două tipuri: *spectroscopia de microunde în stare gazoasă*, care se ocupă cu gazele, și *rezonanța electronică de spin*, care studiază radicalii liberi.

Spectroscopia microundelor studiază variația nivelelor energiei rotaționale a unui gaz (vapori) când acesta este iradiat cu microunde. Cu ajutorul acestei metode este posibil să se calculeze lungimea legăturii, unghiurile legăturii, momentul de dipol, bariera de energie în cazul rotației împiedicate etc. Datorită rezoluției înalte a spectroscopiei microundelor se poate distinge ușor, prin acest mijloc, între molecule similare chimic.

Tabelul 1.12 dă valorile câtorva energii de legătură, iar Tabelul 1.13 prezintă lungimea unor legături.

Tabelul 1. 12.

Energia de legătură a unor legături chimice

Legătura	Energia (kcal)	Legătura	Energia (kcal)	Legătura	Energia (kcal)
Me-H	102	C≡N	207	O=O	119
MeCH <sub>2</sub> -H	97	C-F	107	O-O	35
Me <sub>2</sub> CH-H	94	C-Cl	78	O-H	111
Me <sub>3</sub> C-H	89,5	C-Br	68	S-S	54
C-H	99	C-I	51	S-H	83
C-C	83	S-S	65	S=O	119
C=C	145	H-H	103	F-F	36
C <sup>o</sup> ≡C	192	N-N	93	H-F	134
C-O	80	N-N	39	Cl-Cl	58
C=O	166	N=N	100	H-Cl	102
O=C=O	192	N <sup>o</sup> ≡N	226	Br-Br	45
C-N	68	N-O	48	H-Br	87
C=N	147	N=O	145	I-I	36
				H-I	71

Lungimea unor legături chimice

Legătura	Lungimea (Å)	Legătura	Lungimea (Å)	Legătura	Lungimea (Å)
C-C	1,54	C-S	1,82	C-F	1,42
C=C	1,40	C-O	1,43	C-Cl	1,77
C <sup>o</sup> ≡C	1,21	C=O	1,20	C-Br	1,91
C-H	1,12	O-H	0,97	C-I	2,13
C-N	1,47	N-H	1,03		

#### 1.4.3.4. Spectroscopia Raman

Când un flux de lumină monocromatică trece printr-un mediu transparent, cea mai mare parte din lumină este transmisă sau împrăștiată fără schimbarea lungimii de undă (difuzie Rayleigh). Lucrând cu lumină monocromatică, și din domenii în care substanța respectivă nu absoarbe, s-a arătat că în lumina difuzată apar, pe lângă frecvența inițială  $\nu_0$ , și frecvențe cu mărimea:

$$\nu_0 \pm \Delta\nu_1; \nu_0 \pm \Delta\nu_2; \dots$$

Fenomenul a fost denumit *efect Raman* sau *difuzie combinată*. Liniile satelite constituie cam 1% din intensitatea difuzată totală, iar dintre sateliți cei cu frecvență micșorată față de cea inițială (sateliții roșii) sunt mai intenși decât cei cu frecvență mărită (sateliții violeti). Sateliții roșii se mai numesc linii Stokes, iar sateliții violeti, linii anti-Stokes. S-a stabilit că deplasările de frecvență  $\Delta\nu_1, \Delta\nu_2, \dots$  constituie tocmai frecvențele proprii de vibrație ale moleculelor difuzante.

Teoria corpusculară explică efectul Raman în felul următor. Difuzia luminii este comparată cu o ciocnire între fotoni și molecule. Dacă ciocnirea este elastică, fotonul își menține energia neschimbată și frecvența inițială se păstrează: rezultă difuzie simplă. Dacă ciocnirea este neelasică, energia și frecvența fotonului se modifică și rezultă difuzia combinată sau Raman.

În cazul când fotonul cedează moleculei o cantitate de energie  $h \cdot \nu$ , aceasta trece pe un nivel vibratoriu superior, iar energia și frecvența fotonului se micșorează și rezultă sateliții roșii. Dimpotrivă, dacă molecula, aflată dinainte pe un nivel vibratoriu superior, cedează fotonului o parte din energie rezultă sateliți violeti.

Efectul Raman este independent de frecvența luminii utilizate, adică diferențele între frecvențele Raman și frecvențele luminii sunt întotdeauna aceleași indiferent de frecvența luminii. Totuși, lucrurile nu mai stau așa dacă frecvența luminii este apropiată de frecvența electronică sau de frecvența de absorbție vibrațională a moleculei.

Deoarece spectroscopia Raman este realizată cu lumină vizibilă (de obicei linia albastră a mercurului, 435,8 nm), compusul de studiat trebuie să fie incolor. Variația energiei interne a moleculei rezultă din variația energiei vibraționale a moleculei. Deci, o deplasare Raman este caracteristică unei legături date.

În general, spectroscopia Raman dă același fel de informații ca spectroscopia în IR, principala diferență între cele două fiind că prima poate da mai multe informații asupra moleculelor simetrice decât ultima. Aceasta deoarece întinderea simetrică într-o moleculă simetrică nu produce o distribuție asimetrică de sarcină. Pe de altă parte, pentru ca un compus să fie Raman activ cerința esențială este că vibrația trebuie să dea naștere la schimbare în *polarizabilitatea* moleculei.

Spectrele Raman au fost utilizate pentru a obține informații asupra structurii, de ex. spectrul Raman al formaldehidei în soluție apoasă arată absența grupării oxo. S-a tras astfel concluzia că formaldehida este hidratată:  $\text{CH}_2(\text{OH})_2$ . Spectrele Raman au fost, de asemenea, utilizate pentru a atribui existența tautomeriei ceto-enolice și diferite conformații, pentru a furniza dovezi în sprijinul rezonanței, pentru a diferenția între izomerii geometrici, pentru a demonstra prezența asocierii, și pentru a da informații asupra constantelor de forță ale legăturilor.

#### 1.4.3.5. Spectroscopia RMN

Absorbția de către nucleii atomici a radiației electromagnetice din domeniul radiofrecvențelor constituie baza spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Rezonanța magnetică nucleară de înaltă rezoluție, aplicată în cazul protonului,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  etc., constituie cea mai importantă metodă de studiu a structurii, configurației și conformației moleculelor substanțelor organice.

Spectrele de rotație au sugerat că nucleul, întocmai ca electronul, execută o mișcare rapidă de rotație în jurul axei sale. Această rotație se numește spin nuclear. Deoarece o sferă încărcată electric care se rotește are asociat un moment magnetic, atunci toate particulele încărcate din nucleu vor determina nucleul să se comporte, într-o primă aproximație, ca o mică bară magnetică, cu momentul magnetic în lungul axei de rotație. Neutronului, cu toate că nu posedă sarcină electrică i se atribuie, de asemenea, un moment magnetic de spin. Acest fapt, paradoxal la prima vedere, se explică prin existența unei structuri interne implicând sarcini electrice fracționare (quark).

La nucleele alcătuite din mai mulți protoni și neutroni se realizează o compensare a spinilor particulelor elementare, spre exterior manifestându-se un moment magnetic rezultat.

Magnetismul nuclear se caracterizează prin numărul cuantic de spin nuclear  $I$  ale cărui valori depind de specia nucleidului. Momentul magnetic al nucleului poate adopta  $(2I + 1)$  orientări în raport cu direcția câmpului exterior. Prin urmare, interacțiunea momentului magnetic al nucleelor cu câmpul magnetic exterior este cuantificată în sensul că proiecția momentului magnetic nuclear pe direcția câmpului poate avea anumite valori.

Proprietăți magnetice posedă nucleele care se încadrează în una din situațiile:

(a) Număr atomic ( $Z$ ) impar și număr de neutroni ( $N$ ) par (sau zero, în cazul hidrogenului  ${}^1_1\text{H}$ ). De ex.  ${}^1_1\text{H}$ ,  ${}^{15}_7\text{N}$ ,  ${}^{19}_9\text{F}$ ,  ${}^{31}_{15}\text{P}$ .

(b) Număr atomic par și număr de neutroni impar. De ex.  ${}^{13}_6\text{C}$ .

În cazurile (a) și (b), numărul cuantic de spin  $I = 1/2, 3/2, \dots$ , (c) Număr atomic impar și număr de neutroni impar. De ex.  ${}^2_1\text{H (D)}$ ,  ${}^{14}_7\text{N}$ . În acest caz,  $I$  este un număr întreg, diferit de zero.

Nucleii care nu au moment magnetic sunt cei cu număr atomic par și număr de neutroni par, de ex.  ${}^{12}_6\text{C}$ ,  ${}^{16}_8\text{O}$ ,  ${}^{18}_8\text{O}$ ,  ${}^{32}_{16}\text{S}$ . Se presupune că particulele în astfel de nuclei sunt împerecheate, adică se rotesc în direcții opuse, spinul rezultat și momentul magnetic fiind nule.

În acei nuclei la care mărimea spinului este diferită de zero, numărul cuantic de spin nuclear,  $I$ , poate lua oricare din valorile  $1/2, 1, 3/2, 2$  etc. Nucleii care posedă un spin nuclear rezultat se vor comporta ca magneți rotitori, astfel că vor tinde să se orienteze într-un câmp magnetic aplicat, iar numărul de nivele energetice posibile, adică orientările față de câmpul aplicat, este dat de numărul  $(2I + 1)$ . Cel mai simplu exemplu de nucleu rotitor este acela al protonului. În acest caz,  $I = 1/2$  și, prin urmare, există numai două orientări posibile, îndreptate în același sens sau în sens contrar față de direcția câmpului aplicat. Deoarece trebuie efectuat un lucru pentru a întoarce un magnet împotriva câmpului magnetic, fiecare orientare corespunde la o stare energetică diferită a nucleului. Aceste nivele sunt cuantificate (similar cu spectroscopia în UV și IR), astfel că ar fi posibil de găsit radiație electromagnetică cu o frecvență definită care va fi absorbită, schimbând prin aceasta protonul de la coliniaritate cu câmpul la orientare împotriva câmpului, schimbarea fiind de la un nivel energetic mai scăzut la unul mai înalt. Această radiație electromagnetică este furnizată de către un oscilator (al cărui câmp magnetic este la unghi drept față de câmpul aplicat), și deoarece poziția peak-ului de absorbție, adică unde se produce rezonanța, depinde de frecvența oscilatorului sau de intensitatea câmpului aplicat, este posibilă schimbarea de la nivelul energetic mai jos la cel mai înalt prin folosirea

unei frecvențe variabile cu un câmp magnetic aplicat cu mărime fixă sau invers. În practică s-a găsit că este mai ușor de variat câmpul decât frecvența. Rezultatul este că spectrul RMN se prezintă, de obicei, sub forma unui grafic al intensității semnalului (ordonata) față de câmpul magnetic (abscisa) exprimat în miligauss la o frecvență dată. Pentru un câmp dat, intensitatea semnalului depinde de momentul magnetic al nucleului, și deoarece protonul are unul dintre cele mai mari momente, rezonanța magnetică protonică (RMP) este de importanță deosebită. Alți nuclei folosiți în studii spectroscopice în chimia organică sunt  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$  și  $^{31}\text{P}$ , dar pentru a studia acești nuclei este necesară modificarea spectrometrului.

Diferența între două nivele energetice,  $\Delta E$ , pentru un proton este dată de expresia:

$$\Delta E = h \cdot \gamma \cdot H/2\pi \quad (1.46)$$

Pe de altă parte, se știe că

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (1.47)$$

Eliminând  $\Delta E$  între cele două relații rezultă

$$\nu = \gamma \cdot H/2\pi \quad (1.48)$$

unde  $h$  este constanta lui Planck;  $H$  intensitatea câmpului magnetic care se exercită asupra protonului;  $\gamma$  este raportul magnetogiric (giromagnetic) pentru proton. Astfel, poziția de absorbție a energiei este o funcție atât de frecvența oscilatorului, cât și de intensitatea câmpului aplicat. Când se absoarbe radiație protonul se schimbă de la o stare energetică mai joasă la o stare energetică mai înaltă. Pentru un câmp aplicat de 9400 gauss, frecvența de rezonanță a unui proton este aproximativ 40 MHz. Energia asociată cu această frecvență este de aproximativ  $0,0167 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$  (0,004 cal). Astfel,  $\Delta E$  este foarte mică, și așa se explică faptul că radiația de radiofrecvență poate efectua aceste tranziții. Deoarece  $\Delta E$  este foarte mică, populația situată în stare mai joasă este numai cu puțin mai mare decât aceea în stare mai înaltă. Aceasta este situația când compusul este plasat într-un câmp magnetic, și astfel există absorbție netă când este aplicată radiofrecvența, și această absorbție este măsurată.

Pentru ca semnalul RMP să fie observat, protonul trebuie să fie într-o singură stare timp de  $10^{-2}$  -  $10^{-1}$  secunde. S-a arătat deasemenea că lărgimea liniei spectrale este invers proporțională cu timpul mediu în care protonul ocupă starea energetică *mai înaltă*. Deci, cu cât este mai lung timpul petrecut în această stare, cu atât linia este mai ascuțită; și invers, cu cât timpul este mai scurt linia este mai largă.

Din ceea ce s-a spus mai sus s-ar putea aștepta ca frecvența de rezonanță pentru un câmp dat depinde numai de natura nucleului atomic cercetat. Cu toate acestea lucrurile nu stau așa. Câmpul aplicat determină electronii din jurul nucleului să circule într-un plan perpendicular pe câmp și acești curenți produc un câmp opus câmpului aplicat. Astfel câmpul magnetic efectiv  $H$  suportat de către nucleu este mai mic decât câmpul aplicat  $H_0$ , relația dintre cele două mărimi fiind dată de expresia:

$$H = H_0(1 - \sigma) \quad (1.49)$$

$\sigma$  (care este adimensională) este numită *constantă de acoperire sau ecranare* și are o valoare pozitivă, dar în anumite circumstanțe ea poate fi negativă, adică câmpul efectiv este mai mare decât câmpul aplicat. În acest caz protonul se zice că este deecranat. Deoarece valoarea numerică a lui  $\sigma$  depinde de vecinătatea chimică a unui nucleu dat, ecranarea sau deecranarea unui nucleu variază cu vecinătatea chimică (ceea ce este echivalent cu a spune că variază cu natura chimică a grupărilor adiacente). Ecranarea determină o deplasare a frecvenței de rezonanță spre valori mai înalte ale câmpului aplicat, adică deplasarea este *upfield*. Pe de altă parte deecranarea cauzează o deplasare a frecvenței de rezonanță spre valori mai joase ale câmpului aplicat, se spune că deplasarea este *downfield*. Mărimea acestei deplasări este cunoscută sub numele de *deplasare chimică*. Deoarece valoarea câmpului ce se exercită concret asupra probei nu poate fi determinată cu precizie, deplasările chimice sunt măsurate relativ la un standard care conține nucleul considerat. Au fost utilizați pentru RMP diferiți compuși de referință (care sunt de obicei adăugați probei) cum ar fi tetrametilsilanul (TMS,  $(CH_3)_4Si$ ) sau sarea lui Tier (3-trimetilsilil 1-propan sulfonat de sodiu). TMS este util deoarece conține 12 protoni *echivalenți*. Spectrul RMP al acestui compus prezintă o singură linie (un peak ascuțit) care ia naștere la un câmp mai înalt decât a oricăror protoni în majoritatea compușilor organici obișnuiți. Cu alte cuvinte majoritatea semnalelor RMP se produc downfield față de TMS. Sarea lui Tier are avantajul că este acvosolubilă, la fel cu mulți compuși de interes

biochimic. Mai trebuie adăugat că poziția semnalului dat de sarea lui Tier este practic identică cu cea a TMS.

Deplasarea chimică poate fi relatată în diferite feluri. Deoarece frecvența de rezonanță este dependentă de intensitatea câmpului aplicat, deplasarea poate fi relatată ca unități de câmp (miligauss). Totuși, deoarece câmpul poate fi exprimat în unități de frecvență (vezi expresia (1.48) de mai sus), deplasarea chimică poate fi exprimată de asemenea în unități de frecvență (Hz). Această poziție în Hz este de asemenea proporțională cu frecvența oscilatorului, de ex. dacă separarea dintre semnalul protonului și TMS este de 60 Hz la 40 MHz, separarea la 60 MHz devine 90 Hz ( $60 \times 60/40 = 90$ ). Deci este de dorit relatarea deplasărilor chimice în unități care sunt independente de condițiile de lucru ale spectrometrului. S-a ajuns la aceasta prin definirea deplasării chimice,  $\delta$ , prin expresia:

$$\delta = \frac{\text{separarea în Hz}}{\text{frecvența oscilatorului}} \cdot 10^6 \quad (1.50)$$

Factorul  $10^6$  a fost introdus pentru a reda deplasarea chimică sub forma unor valori convenabile. Aceasta este de obicei în domeniul 1-10 și este redată în părți per milion (p.p.m.).

Independența deplasării chimice de frecvența oscilatorului este ilustrată de următorul exemplu. O separare de 60 Hz la o frecvență a oscilatorului de 40 MHz devine 90 Hz la o frecvență a oscilatorului de 60 MHz. Totuși  $\delta$  rămâne neschimbat:  $\delta = (10^6 \times 60)/(40 \times 10^6) = 1,5$  p.p.m.;  $\delta = (10^6 \times 90)/(60 \times 10^6) = 1,5$  p.p.m.

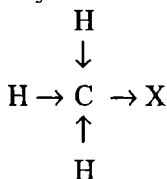
Se obișnuiește de asemenea să se exprime deplasările chimice în valori  $\tau$ , definite prin expresia:

$$\tau = 10 - \delta \quad (1.51)$$

unde 10 p.p.m. este valoarea atribuită liniei TMS. Majoritatea protonilor au valori  $\tau$  pozitive (adică  $\delta < 10$ ); protonii puternic acizi au totuși valori  $\tau$  negative (adică  $\delta > 10$ ). Cu cât este mai mare ecranarea nucleului cu atât este mai mare valoarea lui  $\tau$  (cu atât este mai mică  $\delta$ ). Deoarece gradul de ecranare depinde de densitatea electronilor în jurul protonului, orice particularitate structurală care descrește această densitate va determina o descreștere a ecranării, consecința va fi scăderea valorii  $\tau$  (deplasarea chimică este downfield). Halogenii, fiind atomi atrăgători de electroni, când sunt legați de o grupare metil densitatea electronică în jurul fiecărui proton este descrescută. În consecință prezența halogenilor slăbește câmpul indus care se opune câmpului magnetic exterior, adică deecranează acești protoni și prin urmare valoarea lui  $\tau$  va fi coborâtă (deplasarea



chimică este downfield). Această precizare a fost observată în practică. Ordinea de electronegativitate a halogenilor este  $I < Br < Cl < F$ . Valorile  $\tau$  ale protonilor metilici sunt:  $CH_3I$  7,83;  $CH_3Br$  7,35;  $CH_3Cl$  6,98;  $CH_3F$  5,70 p.p.m.



În mod similar deoarece ordinea electronegativității carbonului, azotului și oxigenului este  $C < N < O$ , valorile  $\tau$  ale protonilor metilici în  $CH_3-C$ ,  $CH_3-N$ ,  $CH_3-O$  sunt respectiv 9,12; 7,85; 6,70 ppm. Siliciul este mai puțin electronegativ decât carbonul și astfel protonii metilici în TMS sunt mai ecranati decât cei dintr-o grupare metil atașată la carbon, adică protonii în TMS absorb upfield față de protonii din majoritatea compușilor organici obișnuiți (vezi Tab. 1.14).

Tabelul 1.14.

Valori  $\tau$  în funcție de vecinătatea chimică

Z -	$CH_3Z$	$R'CH_2Z$	$R'_2CHZ$	Z	$CH_3Z$	$R'CH_2Z$	$R'_2CHZ$
	$\tau$	$\tau$	$\tau$		$\tau$	$\tau$	$\tau$
-R	9,12	8,75	8,50	-I	7,83	6,85	5,78
-COOR	8,00	7,90	-	-Br	7,35	6,70	5,97
-CN	8,00	7,52	7,3	-Cl	6,98	6,56	5,98
-CONH <sub>2</sub>	7,98	7,95	-	-OR	6,70	6,64	6,20
-COOH	7,93	7,65	7,43	-NR <sub>3</sub> J <sup>+</sup>	6,67	6,60	6,50
-COR	7,90	7,60	7,5	-OH	6,62	6,42	6,15
-SH, -SR	7,90	7,60	6,90	-OCOR	6,35	5,89	4,95
-NH <sub>2</sub> , -NR <sub>2</sub>	7,85	7,50	7,13	-F	5,70	5,66	5,40
-CHO	7,83	7,80	7,60	-NO <sub>2</sub>	5,67	5,60	5,40

$\tau$

R-OH 9,5-6,0 (mai scăzută pentru enoli; -1 la -6)

Ar-OH 5,5

R-SH 9,8

Ar-SH 6,5

RNH<sub>2</sub> 8,5

ArNH<sub>2</sub> 6,6-5,0

RCOOH 0 la -3

Terminologia utilizată în spectroscopia RMN este descrisă în Fig. 1.10.

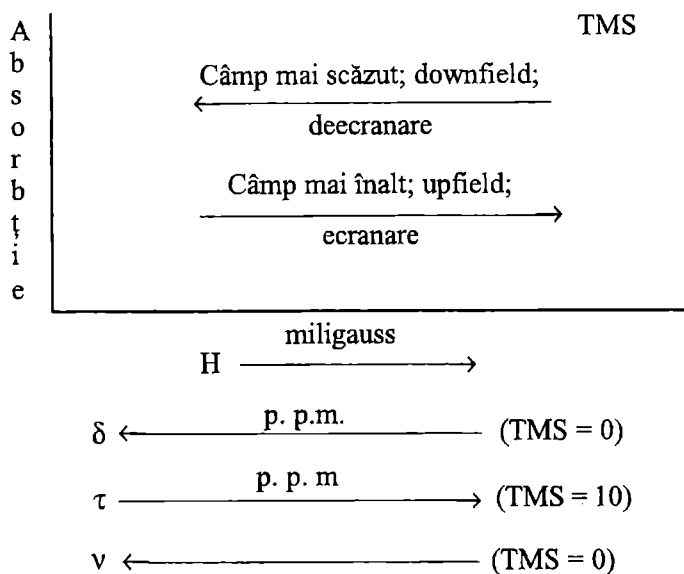


Fig. 1.10. Terminologia utilizată în RMN

Măsurătorile spectrelor RMN se realizează de obicei pe lichide sau soluții (concentrație 5-20%). Cei mai buni solvenți sunt cei care nu conțin protoni, de ex. deuteriocloroform și alți compuși deuteriați, tetraclorura de carbon, etc. Totuși, din cauza problemelor de solubilitate, solvenții care conțin protoni pot fi de asemenea utilizați, de ex. cloroform. O dificultate cu privire la soluții este că valorile  $\tau$  se pot schimba cu natura solventului, îndeosebi la solvenții aromatici. Deplasările chimice se pot de asemenea schimba cu concentrația într-un solvent dat. Protonii atașați la atomul de carbon sunt foarte puțin afectați dar când sunt atașați la alți atomi ca de ex. O, N, S, deplasarea chimică este foarte mult modificată. În ultimul caz modificările sunt datorate modificării gradului de legare a hidrogenului, care determină o deplasare downfield față de starea nelegată.

Studiul spectrelor RMN ale lichidelor și soluțiilor este cunoscut ca *RMN de înaltă rezoluție*. Studiul solidelor, deoarece acestea dau spectre care constă din linii de rezonanță largi, se numește *rezonanță de linie largă*.

Fig. 1.11 prezintă spectrul RMN al etanolului (lichid; 60 MHz), realizat la rezoluție joasă. Poziția fiecărui peak este caracteristică mediului chimic al unor protoni particulari, iar ariile de sub curbele maximelor sunt în raportul 1:2:3. în

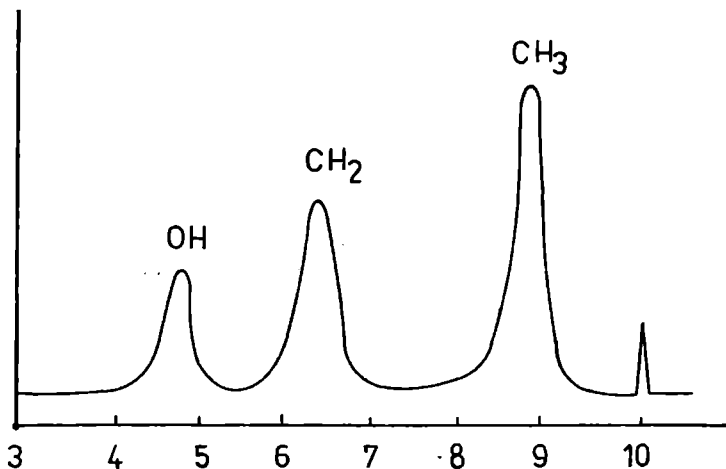


Fig. 1.11. Spectrul RMN de joasă rezoluție al etanolului

Acest raport corespunde numărului de protoni din OH, CH<sub>2</sub> și respectiv CH<sub>3</sub>. Prin urmare este posibil să fie „numărați” protonii având diferite vecinătăți chimice. (Aceste arii sunt acum evaluate cu ajutorul integratoarelor electronice. Integrarea produce o urmă care se ridică pe măsură ce este trecut fiecare semnal protonic, iar înălțimea (între trepte) este proporțională cu numărul protonilor în semnalul respectiv). În acest fel sunt obținute raporturile numărului de protoni în fiecare semnal, și dacă numărul unui anumit proton este cunoscut, pot fi estimați toți ceilalți. De ex. dacă știm că compusul examinat este un alcool monohidroxilic atunci, cunoscând poziția protonului hidroxilic, știm că aria acestui semnal este echivalentă cu un proton. Pe de altă parte, dacă cunoaștem formula moleculară a compusului putem deasemenea calcula numărul real de diferiți protoni. În practică din cauza dificultăților experimentale nu se obțin numere întregi din integrare. Totuși rezultatele numerice sunt de obicei suficient de precise pentru a permite „numărarea” diferitelor tipuri de protoni.

*Cuplarea spin-spin.* Fig. 1.12 prezintă spectrul RMN al etanolului (20% în CCl<sub>4</sub>; 60 MHz), conținând urme de acid clorhidric. În locul benzilor largi (vezi Fig. 1.11) se observă acum că două benzi au fost scindate în multipleți. Ariile totale de sub multipleți sunt însă în același raport ca mai înainte, adică 2:3. Această structură fină a fost explicată ca fiind datorată ecranării protonilor de către protonii de pe atomii de carbon adiacenți.

Să discutăm mai întâi influența grupării metilen, CH<sub>2</sub>, asupra grupării metil, CH<sub>3</sub>. Fiecare proton în gruparea metilen poate avea momentul magnetic aliniat

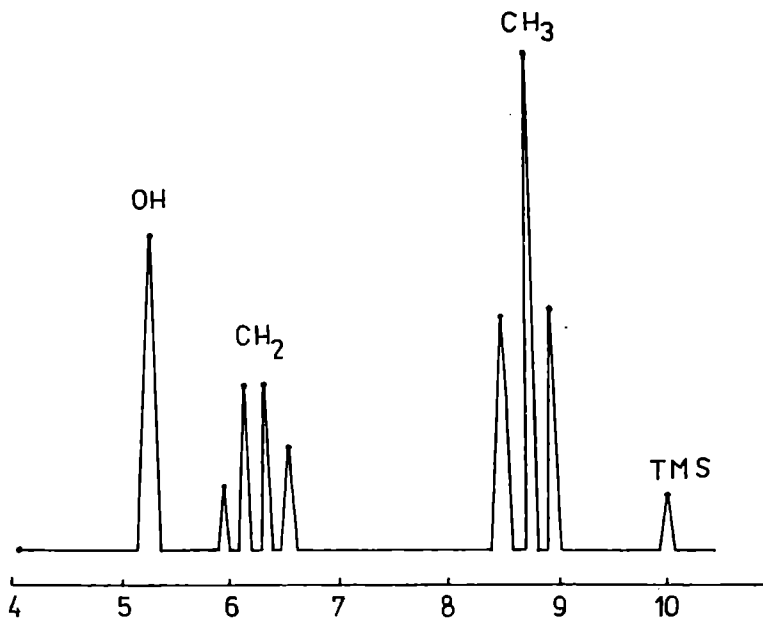
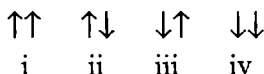


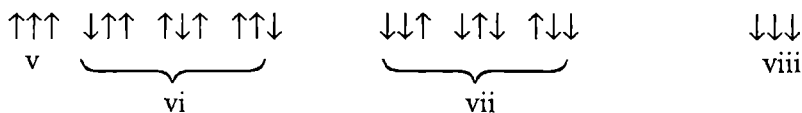
Fig. 1.12. Spectrul RMN de înaltă rezoluție al etanolului

în același sens sau în sens contrar față de câmpul aplicat. Dacă reprezentăm prima aliniere printr-o săgeată îndreptată în sus și ultima aliniere printr-o săgeată îndreptată în jos, atunci există următoarele patru combinații posibile:



Astfel efectul de ecranare va depinde de tipul de combinație care acționează. Cu toate acestea combinațiile (ii) și (iii) vor avea același efect de ecranare asupra grupării metil adiacente. Deci există trei combinații de ecranare diferite, și statistic este de așteptat că în orice moment 25% din protonii metilenici vor fi în combinația (i), 25% în (iv) și 50% în (ii) și (iii). Rezultatul net este că semnalul protonului metil este clivat într-un triplet, raportul ariilor fiind 1:2:1.

Dacă aplicăm același argument la efectul protonilor grupării metil asupra protonilor metilenici, există opt combinații posibile:



Ca și mai înainte fiecare combinație în (vi) dă naștere la același efect de ecranare; acesta este deasemenea cazul pentru (vii). Rezultatul net este că există patru combinații de ecranare diferite, având drept rezultat scindarea semnalului metilenic într-un cvartet, raportul ariilor fiind 1:3:3:1.

Structura fină în cuprinsul unui semnal particular se numește *scindare spin-spin* iar mărirea separărilor dintre maxime într-un multiplet (rezultat din cuplări spin-spin) se numește constantă de cuplare spin-spin, și este notată cu simbolul  $J$ ; valoarea ei este dată în Hz. Mărirea lui  $J$  este independentă de frecvența oscilatorului, dar mărirea distanțelor dintre semnale depinde de frecvența oscilatorului. Prin urmare o schimbare a frecvenței schimbă separările semnalelor, dar nu spațiile într-un multiplet. Astfel, prin măsurarea spectrelor RMN a unui compus dat la două frecvențe diferite ale oscilatorului, dacă spațiile unui grup de linii rămân neschimbate, liniile sunt componente ale unui multiplet. Dacă spațiile se schimbă, grupul de linii ia naștere din protoni neechivalenți.

S-a stabilit mai sus că originea multipleților este datorată cuplării spin-spin între grupuri de protoni. Aceasta a fost demonstrată de exemplu prin examinarea următorilor etanoli deuterati: (a)  $CD_3CH_2OH$ , (b)  $CH_3CD_2OH$ ,

(c)  $CH_3CH_2OD$ . Deoarece constanta de cuplare a deuteriului cu protonii este mică (cam  $1/7$  din valoarea lui  $J$  pentru cuplarea hidrogenului) rezultatul este că protonii adiacenți deuteriului dau maxime unice ușor lărgite. Semnalele deuteriului sunt mult depărtate de semnalele protonului normal, și nu sunt observate în condițiile de lucru pentru rezonanța protonică. Astfel cei trei etanoli deuterati de mai sus dau următoarele semnale: (a) dă un singlet, (b) dă un singlet iar (c) dă un triplet și un cvartet. Semnalele RMN ale unor varietăți deuterate de alcool etilic sunt prezentate în Fig. 1.13.

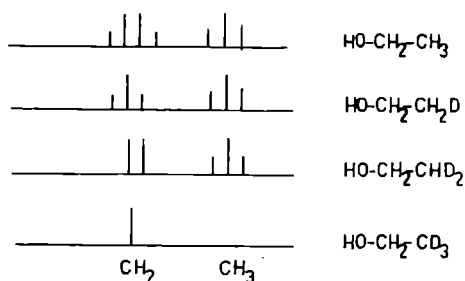


Fig. 1.13. Spectrele RMN ale unor varietăți deuterate de alcool etilic

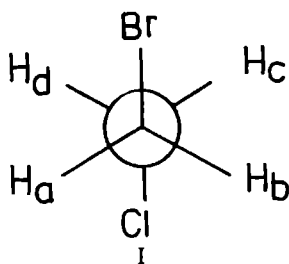
Deoarece introducerea deuteriului într-o moleculă conduce la un spectru simplificat, aceasta este utilizată ca o metodă generală pentru studiarea spectrelor RMN, adică pentru a simplifica diferite linii spectrale.

Deoarece semnalul unei grupări metil, de ex. în  $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$  sau TMS, constă dintr-o singură linie rezultă că nu există nici o cuplare magnetică între atomii de hidrogen atașați la același atom de carbon (hidrogeni geminali). Cei trei atomi de hidrogen sunt echivalenți, toți trei având aceeași deplasare chimică. Aceasta conduce la regula generală că protonii cu aceeași deplasare chimică nu dau scindare observabilă. Numai când protonii sunt neechivalenți este posibilă scindarea.

Există două tipuri de protoni echivalenți: *protoni echivalenți chimic* și *protoni echivalenți magnetic*. Protonii echivalenți chimic sunt cei care ocupă poziții echivalente chimic adică prezintă vecinătăți chimice identice. Astfel de protoni au aceeași deplasare chimică. Un test simplu pentru echivalența chimică a doi (sau mai mulți) protoni este de a înlocui fiecare proton pe rând cu un substituent Z și dacă prin aceasta obținem același compus (sau imaginea sa în oglindă), atunci acești protoni sunt echivalenți chimic. Ca exemplu să considerăm etanolul,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ .

Înlocuirea fiecărui proton, pe rând, pe același atom de carbon dă  $\text{CH}_2\text{ZCH}_3$ , care este obținut deasemenea când celălalt atom de carbon este tratat în același fel ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Z}$ ). Astfel cei trei hidrogeni de pe fiecare atom de carbon sunt echivalenți chimic, și toți șase hidrogenii sunt deasemenea echivalenți chimic. Deci toți au aceeași deplasare chimică și în consecință nu există nici o scindare în cuprinsul unei grupări metil și nici una datorită cuplării între grupări. Spectrul observat al etanolului constă dintr-un semnal care este un singlet.

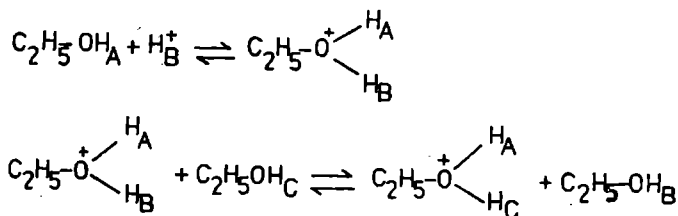
Un grup de doi (sau mai mulți) protoni se zice că sunt *echivalenți magnetic* când nu numai că au aceeași deplasare chimică, adică sunt echivalenți chimic dar deasemenea setul de constante de cuplare cu toți ceilalți protoni este identic pentru fiecare membru al grupului. Aceasta poate fi ilustrată cu 1-bromo-2-cloroetanul, care este reprezentat prin formula Newman (I):



Dacă presupunem, pentru moment, că această conformație este fixă se observă că  $\text{H}_a$  și  $\text{H}_b$  sunt echivalenți chimic, după cum sunt deasemenea echivalenți  $\text{H}_c$  și  $\text{H}_d$  (pentru fiecare pereche vecinătățile chimice sunt identice). Constantele de cuplare,  $J_{ad}$  și  $J_{bd}$ , totuși nu sunt egale și deci  $\text{H}_a$  și  $\text{H}_b$  nu sunt echivalenți magnetic.

O teorie pentru transmitia cuplării este următoarea. Un proton dat, din cauza momentului său magnetic (datorat spinului) afectează spinii electronilor care formează legătura covalentă C-H. Această schimbare afectează spinii perechii de electroni C-C, iar aceasta la rândul ei afectează spinii perechii electronice în legătura adiacentă C-H. Astfel efectele de spin ale unui proton sunt transmise prin legături covalente celui alt proton rotitor. Deoarece aceste efecte depind numai de structura și geometria moleculei și nu sunt datorate prezenței câmpului aplicat ele sunt independente de intensitatea câmpului aplicat.

Se poate vedea din Fig. 1.12 că semnalul protonului grupării hidroxil nu este scindat adică nu există nici o dovadă a cuplării spin-spin între protonul OH și protonii CH<sub>2</sub>, deoarece dacă ar exista cuplare semnalul protonului OH ar fi un triplet. Absența cuplării se explică prin faptul că în prezența urmelor de acid (în cazul de mai sus acid clorhidric) există un schimb rapid de protoni între moleculele de etanol. Fenomenul se reprezintă astfel:



Deoarece un proton are două orientări ale spinului care au întotdeauna aceleași nivele ale energiei, și în consecință populațiile în aceste nivele sunt practic egale, protonii schimbați (de ex. H<sub>A</sub> și H<sub>B</sub>) au aproximativ aceeași șansă de a avea aceleași orientări ale spinului sau orientări opuse. Rezultatul este că protonii metilenici prezintă ambele cuplări de spin în aceeași măsură, efectul global fiind un efect de cuplare de medie în timp care este zero. Astfel semnalul CH<sub>2</sub> nu este scindat de către protonul OH. Deoarece acest efect de medie în timp este reciproc, semnalul de proton OH nu este de asemenea scindat de către protonii CH<sub>2</sub>, și în consecință dă un singur semnal sub forma unei linii ascuțite. Astfel protonii CH<sub>2</sub> și OH sunt efectiv decuplați.

Reacția de schimb descrisă este un exemplu de *schimb chimic*, și acesta este ceva comun pentru protonii atașați la oxigen, azot sau sulf. Totuși pentru ca această decuplare să aibă loc viteza de schimb trebuie să fie rapidă. Calculele au arătat că dacă viteza de schimb per secundă este mai mare decât separarea (în Hz) a celor două semnale separate, atunci decuplarea are loc. Pentru etanolul pur viteza de schimb este mult mai joasă decât Δν (separarea a două semnale), în acest fel are loc cuplarea, gruparea CH<sub>2</sub> apărând ca octet iar gruparea OH ca dublet. Deoarece viteza de schimb chimic este accelerată printr-o creștere a

temperaturii, *decuplarea de spin* poate uneori fi observată prin creșterea temperaturii la care este măsurat spectrul RMN. În mod similar *cuplarea de spin* poate fi observată prin coborârea temperaturii. Mai trebuie adăugat că complicațiile determinate de un proton atașat la oxigen (sau azot) pot fi evitate prin schimb izotopic cu deuteriu. Acest schimb izotopic se realizează prin agitarea compusului în deuterocloroform care conține și puțină  $D_2O$ . În acest fel semnalele care apar de la protonii OH (sau NH) nu vor mai fi observate.

Din cele de mai sus rezultă că în reacțiile de schimb aspectul unei benzi depinde de viteza de schimb. Când viteza este foarte mare semnalul protonului schimbat constituie o linie ascuțită, dar pe măsură ce viteza de schimb scade se atinge un punct când aceasta începe să se lărgescă și în final se scindează în numărul de componente determinat de cuplare cu protonii vicinali. Astfel analiza aspectului benzii constituie un mijloc de evaluare a vitezei de schimb.

*Rezonanța nucleară dublă.* S-a remarcat mai sus că cuplarea spin-spin poate fi anihilată prin schimb rapid. Această anihilare poate fi efectuată deasemenea în felul următor. Presupunem că este vorba de doi protoni, A și B, cu vecinătăți chimice diferite și cuplați între ei. Presupunem acum că se măsoară frecvența de rezonanță a lui A. Concomitent cu această măsurare se aplică un puternic câmp de radiofrecvență a cărui frecvență este chiar frecvența de rezonanță a lui B. Acest ultim câmp produce atât absorbție cât și emisie de către B de mai multe ori pe secundă, și în consecință cuplarea lui A cu B este acum evitată. Cu alte cuvinte are loc decuplarea dintre A și B, media de timp a cuplării între A și B este zero. Prin aplicarea rezonanței nucleare duble fiecărui tip de proton, fiecare semnal poate fi transformat într-o linie singlet. În acest fel metoda de rezonanță dublă produce un spectru mai simplu și deci mai ușor de interpretat.

*Metodica experimentală* pentru RMN este prezentată în Fig. 1.14. Câmpul magnetic H este produs de către cei doi poli ai magnetului. Câmpul alternativ H' este dat de către bobina transmițătoare, perpendiculară pe planul figurii și prevăzută cu un orificiu în care se introduce proba de cercetat. Bobina receptoare are spirele înfășurate împrejurul eprubetei ce conține proba. De regulă circuitul transmițător produce o frecvență *fixă* și se modifică progresiv *intensitatea câmpului* H până la apariția rezonanței.

În fig. 1.15 este prezentat spectrul RMN protonică a coenzimei piridoxal fosfat în  $^2H_2O$ . În rezumat, cele trei mărimi ce pot fi evaluate dintr-un astfel de spectru sunt: (1) *intensitatea* sau aria de sub curbă care de obicei este proporțională cu numărul de protoni echivalenți care dau naștere benzii de absorbție. (2) *Deplasarea chimică*, definită ca diferența între peak-ul observat pentru un proton dat și un peak al unui compus standard de referință. În experimentul redat în Fig. 1.15 peak-ul de referință la dreapta spectrului este al sării lui Tier. (3) *Constantele de cuplare*, care măsoară interacțiile dintre nucleii magnetici situați pe atomi (de carbon) vecini.



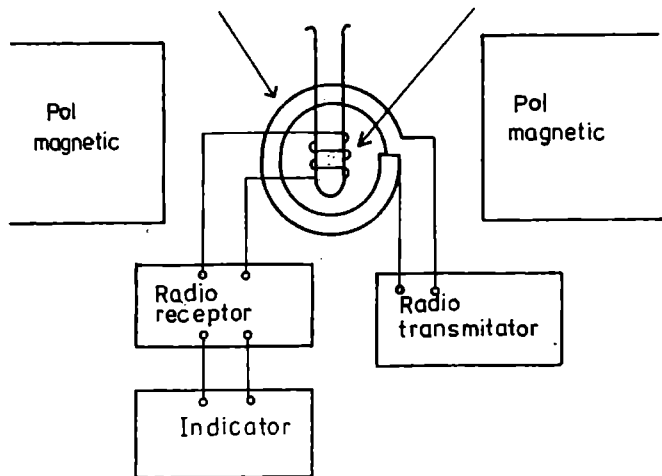


Fig. 1.14. Dispozitiv de rezonanță magnetică nucleară

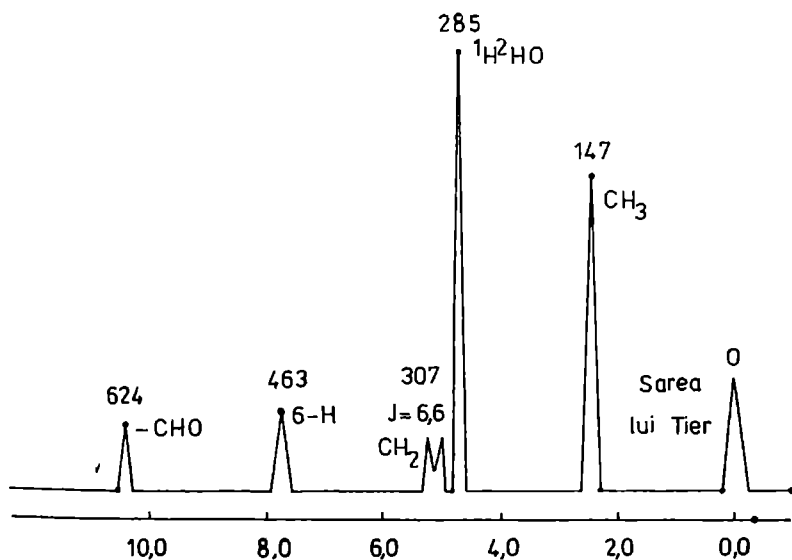
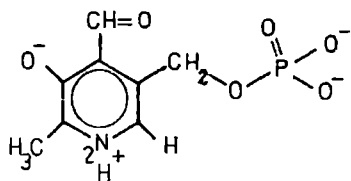


Fig. 1.15. Spectrul RMN al piridoxal 5'fosfatului în  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

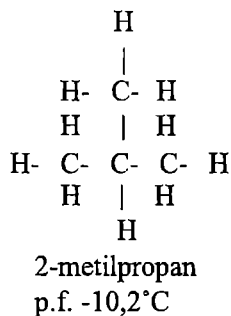
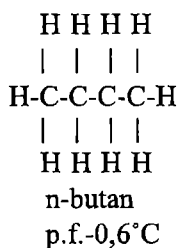
## 1. 5. IZOMERIA

Atomul de carbon formează cu un alt atom de carbon legături simple, duble și triple. Atomul de carbon se leagă deasemenea de atomii altor elemente, ca de ex. oxigenul și azotul, prin legături simple sau multiple. Deoarece atomii de carbon se pot lega între ei, sau cu atomii altor elemente, în diferite feluri, există posibilitatea ca unei formule moleculare date să-i corespundă mai multe structuri. Acest fenomen se numește *izomerie* iar compușii ce prezintă fenomenul respectiv se numesc *izomeri*. Izomeria este de două tipuri:

- izomeria structurală
- stereoizomeria

### 1.5.1. Izomeria structurală

Pentru formula moleculară  $C_4H_{10}$  se pot scrie două formule structurale:



Butanul și 2-metilpropanul sunt, unul față de altul *izomeri structurali*, adică compuși care au aceeași formulă moleculară dar formule structurale diferite. Deoarece structurile lor diferă, izomerii au proprietăți fizice diferite, reprezentate prin constante fizice diferite. Izomeria structurală este datorată diferenței structurale și este de trei feluri:

(i) Izomeria de tip inelar sau de tip catenar este întâlnită la compușii care diferă în aranjamentul atomilor de carbon, de ex. ciclohexan și metil-ciclopentan, respectiv n- și izobutan.

(ii) Izomeria de poziție este prezentă la compușii având același schelet de carbon dar diferind în poziția ocupată de către gruparea substituentă, de ex. alcoolii n- și izopropilic; acizii  $\alpha$ -,  $\beta$ - și  $\gamma$ -hidroxibutirici; orto-, meta- și para-nitrofenolii.

(iii) Izomeria de grupări funcționale este ilustrată de compușii având grupări funcționale diferite, de ex. compuși cu aceeași formulă moleculară dar aparținând la clase diferite, de ex. etanol și dimetil eter; acetona și aldehida propionică.

Tautomerismul poate fi privit ca un caz special de izomerie de grupări funcționale.

### 1.5.2. Stereoizomeria

Stereoizomeria vizează două tipuri de izomerie:

- izomeria optică
- izomeria geometrică

(După cum se va vedea în paginile următoare, există compuși care prezintă simultan izomerie optică și izomerie geometrică.)

#### 1.5.2.1. Izomeria optică

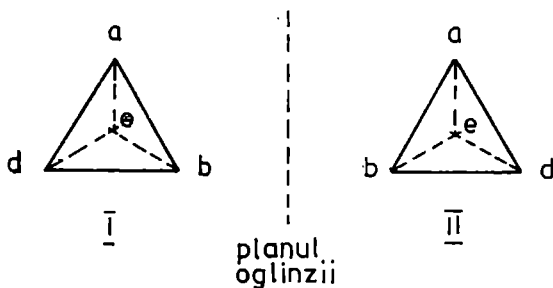
Studiul izomeriei optice a dus la rezolvarea a trei probleme din domeniul chimiei:

a. Corespondența dintre modelele spațiale și formulele plane.

b. Corespondența dintre structurile reale, pe de o parte, și modelele spațiale și formulele plane, pe de altă parte. Găsirea acestei corespondențe înseamnă de fapt rezolvarea problemei chiralității (vezi mai departe).

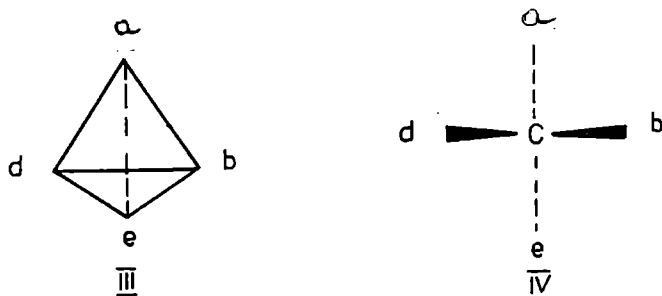
c) Adoptarea unei sistematizări a compușilor optic activi.

a. Să ne imaginăm un derivat al metanului cu formula Cabde, unde a, b, d, e, sunt substituenți diferiți, care pot sau nu să conțină carbon. Atomul de carbon ce poartă patru substituenți diferiți se numește *atom de carbon asimetric*. Van't Hoff și Le Bel (1874) au găsit că valențele atomului de carbon sunt direcționate după axele unui tetraedru. Trebuie precizat că patru grupări diferite pot fi aranjate tetraedric în jurul unui atom de carbon în două (și numai două) moduri. Cele două forme diferite sunt nesuperpozabile: ele sunt, una față de cealaltă, ca obiectul și imaginea sa în oglindă:



Tetraedrul este desenat în așa fel că trei colțuri sunt imaginate a fi deasupra planului hârtiei, iar al patrulea sub acest plan. Aceste reprezentări constituie *formule tetraedrice sau formule de configurație*, atomul de carbon găsindu-se în

centrul tetraedrului. Pentru a trece acum de la modelul spațial la formula plană se procedează în felul următor, conform convențiilor lui E. Fischer: tetraedrul (de ex. I) se rotește în jurul liniei orizontale care unește gruparea d cu gruparea b până când ocupă poziția III. Aceasta este poziția convențională pentru tetraedru, grupările legate la linia orizontală plină fiind deasupra planului hârtiei, iar cele legate la linia verticală întreruptă fiind sub planul hârtiei. Rezultă în acest fel *formule perspective* (IV):



Proiectând acum în planul hârtiei grupările situate deasupra (d, b) și grupările situate dedesubtul planului (a, e) rezultă formule plane (V și VI) (VI reprezintă formula plană a izomerului II, obținută prin aceleași operațiuni ca formula V):



Prin urmare trebuie precizat că în formulele plane liniile orizontale reprezintă grupările de deasupra planului, iar liniile verticale cele de sub planul hârtiei.

### *Activitatea optică și polarimetria*

Prin definiție, un criteriu pentru izomeria optică este activitatea optică. Activitatea optică este proprietatea unor substanțe care, când sunt plasate în calea unui flux de lumină plan-polarizată, rotesc planul de polarizare în sens orar sau în sens anti-orar. Astfel de compuși se zice că sunt *optic activi*, și sunt dextrorotatorii dacă rotesc planul de polarizare în sens orar și levorotatorii dacă rotesc în sens anti-orar. Simbolurile (+)- și (-)- sunt folosite pentru a indica sensul rotației, de ex. (+)- glucoza (dextrorotatorie), (-)- fructoza (levorotatorie).

Instrumentul folosit pentru măsurarea puterii rotatorii a unei substanțe este polarimetrul. El constă în esență din două prisme Nicol, una polarizatoare (P) și cealaltă analizorul (A), tubul (T), care conține substanța (un lichid sau o soluție) ce urmează a fi examinată, și sursa S (Fig. 1.16). S este o sursă de lumină monocromatică, cel mai adesea o lampă de sodiu. La capătul opus sursei se găsește un instrument optic solidar cu o scală astfel că unghiul cu care lumina polarizată este rotită poate fi măsurat. Dacă analizorul trebuie rotit în sens orar, pentru a restabili câmpul original, substanța este dextrorotatorie; în caz contrar este levorotatorie.

S-a găsit că rotația depinde, pentru o substanță dată, de următorii factori: (i) grosimea stratului traversat, (ii) natura solventului (dacă este vorba despre soluții), (iii) temperatura, (iv) lungimea de undă a luminii utilizate. Dacă  $[\alpha]$

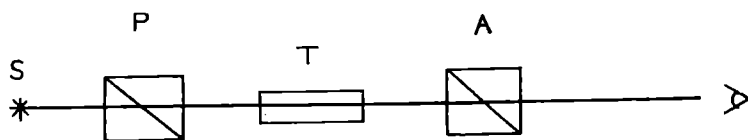


Fig. 1.16. Polarimetrul

reprezintă rotația specifică,  $l$  grosimea stratului în decimetri,  $c$  numărul de grame de substanță (per 100 ml de solvent), și determinarea este realizată la temperatura  $t^{\circ}\text{C}$  utilizând lumina sodiului (linia D), atunci dacă  $\alpha$  este rotația observată (+ sau -), există relația:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c} \quad (1.52)$$

Deoarece valoarea rotației depinde de solvent, acesta trebuie menționat deasemenea.

Izomerii care, în concentrații egale, rotesc planul luminii polarizate cu același număr de grade dar în sens contrar, se numesc *enantiomeri* sau *enantiomorfi*. Amestecul echimolecular al enantiomerilor se numește *amestec racemic* sau pur și simplu *racemic* și este, evident, lipsit de activitate optică. Racemicul se notează  $(\pm)$ - sau DL- (vezi și despre configurație, mai departe).

### Chiralitatea

Termenul de *chiral* și oponentul său, *achiral*, au fost introduși de către Kelvin pentru descrierea corpurilor geometrice nesuperpozabile cu imaginea lor în oglindă. Prin urmare un obiect sau o moleculă care nu poate fi suprapus(ă) peste imaginea sa din oglindă se numește chiral(ă). Dacă un obiect este superpozabil peste imaginea sa din oglindă acesta este *achiral*. Termenul de

chiral a fost inspirat din relația ce există între mâna dreaptă și mâna stângă (cheir=mână, în limba greacă). Astfel mâna dreaptă și mâna stângă sunt, între ele, imagini în oglindă nesuperpozabile. Alte obiecte chirale sunt: corpul omenesc (în privința distribuției organelor interne), cele două picioare, mănușile, oasele, triunghiurile oarecare, etc. Dimpotrivă, ouăle (numai ca formă!), pâlniile, sferile, cilindrii, cercurile, triunghiurile isoscele etc., sunt obiecte achirale. Relația spațială dintre cele două mâini, dreapta și stânga, ilustrează faptul că două obiecte pot prezenta o structură identică în toate privințele, cu o singură excepție: ele sunt, unul față de celălalt, imagini în oglindă.

### *Simetrie, asimetrie*

Un obiect chiral este asimetric. Prin urmare problemele de chiralitate și achiralitate sunt strâns legate de elementele de simetrie ale obiectelor:

- planul de simetrie
- centrul de simetrie
- axa alternativă de simetrie

*Un obiect sau o moleculă ce posedă un plan sau un centru de simetrie este simetric și prin urmare este achiral. Dimpotrivă, obiectele sau moleculele asimetrice sunt chirale. Planul de simetrie, sau planul oglinzii, este un plan care trecând prin centrul obiectului împarte obiectul în două jumătăți care sunt, fiecare, imaginea în oglindă a celeilalte. Centrul de simetrie este un punct situat în centrul obiectului sau moleculei care posedă proprietatea următoare: orice dreaptă străbate acest punct întâlnește de-o parte și de alta, la distanțe egale, elemente structurale identice. Obiectele sau moleculele asimetrice (care nu au nici plan nici centru de simetrie) sunt chirale. O moleculă asimetrică poate exista în oricare dintre cele două forme care sunt, fiecare, imaginea în oglindă a celeilalte. O asemenea pereche de molecule neidentice, imagini în oglindă, se numesc *enantiomeri*, sau *enantiomorfi*. Prin urmare un obiect poate prezenta două alternative:*

- simetric
- asimetric

*Două obiecte se pot găsi, între ele, în una din situațiile următoare:*

- identice
- enantiomere (imagini în oglindă)
- diferite

### *Asimetria moleculară datorată atomului de carbon asimetric*

Înțelegerea izomeriei optice (și a izometriei cis-trans datorată derivaților cicloalcanilor) se bazează, între altele, pe structura tetraedrică a atomului de

carbon aflat în starea de hibridizare  $sp^3$ . Studii cu raze X precum și dipolmomentul au confirmat că valențele atomului de carbon sunt direcționate după axele unui tetraedru.

Asimetria moleculelor organice rezultă, cel mai adesea, din prezența unuia sau mai multor atomi de carbon asimetrici. *O moleculă care conține un singur atom de carbon asimetric este la rândul ei asimetrică și deci chirală.* Bromoclorometanul,  $CH_2BrCl$  (Fig. 1.17) există ca un singur compus. Cu toate acestea cei doi atomi de hidrogen legați la atomul de carbon nu sunt identici: înlocuirea unuia dintre ei cu un substituent diferit de brom sau clor nu duce la același rezultat (Fig. 1.17) (Bromoclorometanul este o moleculă *prochirală*.)

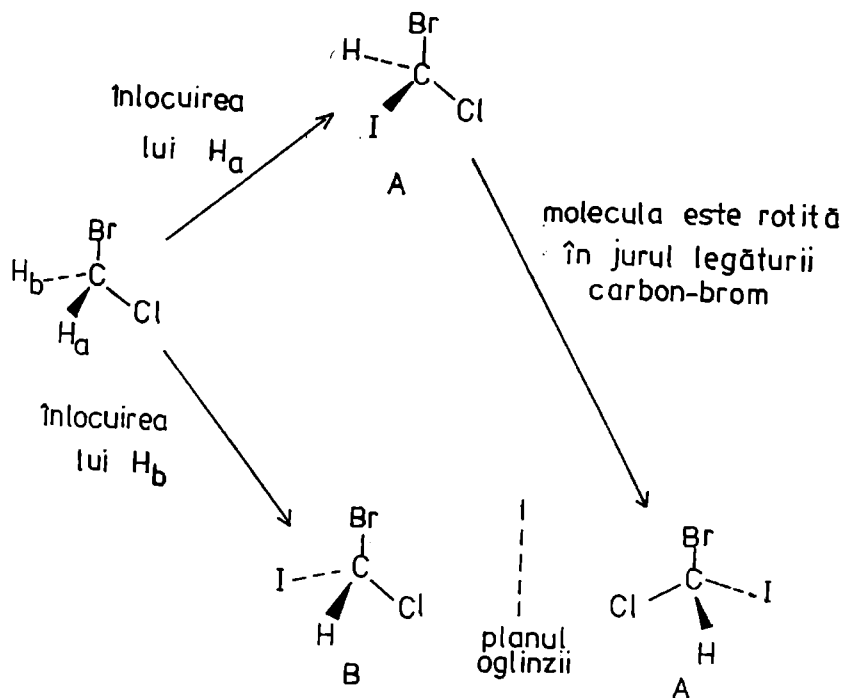


Fig. 1.17. Obținerea stereoisomerilor din bromoclorometan prin înlocuirea hidrogenului.

Cele două specii moleculare obținute prin înlocuirea lui  $H_a$  sau  $H_b$  cu un atom de iod nu sunt identice: structura A nu poate coincide total cu structura B (Fig. 1.17). Astfel, dacă încercăm să suprapunem modelul corespunzător lui A peste modelul corespunzător lui B vom observa, de exemplu, că atomii de brom și clor, precum și atomul de carbon central se plasează în poziții identice, dar iodul și hidrogenul se găsesc în poziții diferite. *Astfel, structura A și structura B*

reprezintă două specii moleculare diferite care se deosebesc una de alta prin orientarea atomilor în spațiu. Cele două structuri sunt stereoizomere. Dacă structura A este rotită în jurul legăturii carbon-brom și plasată alături de structura B, relația dintre cei doi izomeri este evidentă (Fig. 1.17). Structurile A și B se găsesc, una față de cealaltă, ca obiectul și imaginea sa în oglindă. Astfel de izomeri se numesc *enantiomeri* sau *antipozi optici*, iar moleculele lor sunt *chirale*.

Butanul este, datorită fiecăreia dintre cele două grupări metilen, prochiral. Cei doi atomi de hidrogen din cadrul aceleiași grupări metilen nu sunt identici: înlocuirea alternativă cu clor a unuia dintre ei duce la 2-clorbutani enantiomeri (Fig. 1.18). Se observă că formula D reprezintă o specie moleculară diferită de formula E. Relația dintre cele două forme este aceea dintre un obiect asimetric și imaginea sa în oglindă. Structurile D și E sunt enantiomere. 2-Clorobutanul este, ca și bromocloriodometanul, un compus *chiral*. Dimpotrivă, bromoclorometanul și butanul sunt compuși *achirali*.

Criteriul esențial pentru enantiomerie este ca obiectul (sau molecula) și imaginea sa în oglindă să fie nesuperpozabile. În cazul bromoclorometanului și butanului molecula compusului și imaginea sa în oglindă sunt identice.

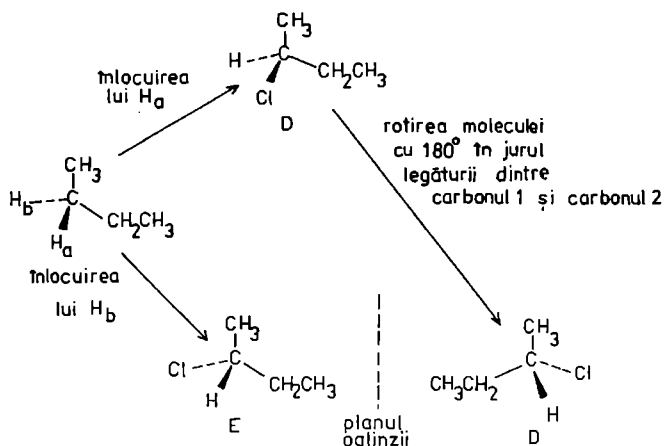


Fig. 1.18. Enantiomerii 2-clorobutanului.

Enantiomerii sunt identici din punct de vedere fizic cu următoarele excepții: (i) maniera lor de a roti lumina polarizată: rotațiile sunt egale, dar opuse; (ii) ei absorb inegal lumina polarizată dextro- și levo-circular (dicroism circular). Punctele de topire ale enantiomerilor sunt identice, dar p. t. al racematului este



mai ridicat sau mai coborât. Formele cristalelor de enantiomeri pot fi imagini în oglindă unele ale celorlalte, adică cristalele înseși pot fi enantiomere, dar aceasta este o situație rar întâlnită. Enantiomerii sunt chimic similari, vitezele lor de reacție cu alte substanțe optice active sunt, de obicei, diferite. Ei pot fi, de asemenea, fiziologic diferiți, de ex. (+)-histidina are gust dulce, (-)-histidina este fără gust; (-)-nicotina este mai otrăvitoare decât (+)-nicotina; acidul (+)-ascorbic (vitamina C) este mai eficientă decât acidul (-)-ascorbic etc.

### Configurația și nomenclatura stereozomerilor

*Orientarea în spațiu a grupărilor în jurul atomului de carbon asimetric constituie configurația atomului respectiv.* În plus față de ordinea substituenților, *configurația absolută* indică chiralitatea enantiomerilor, astfel că aceștia pot fi diferențiați. (Se înțelege de la sine că cunoașterea configurației unui compus este determinată de cunoașterea configurației tuturor atomilor de carbon asimetrici a compusului respectiv.) Ruperea legăturilor covalente din cadrul substituenților (dacă aceștia sunt poliatomici) atomului de carbon asimetric și îndeosebi ruperea legăturilor carbonului asimetric duc la schimbarea configurației; prin această proprietate se deosebește *configurația* de *conformație*. Astfel, conformația se schimbă continuu prin rotirea în jurul legăturilor simple și prin mișcările și deformările sistemelor ciclice ale moleculei. Un stereozomer are o singură configurație, dar poate exista într-un număr de conformații depinzând de solvent și temperatură. De ex. stereozomerul (-)-2-clorbutan prezintă trei conformații diferite pentru aceeași configurație (Fig. 1.19). Stereozomerii sunt *izomeri configuraționali*, iar izomerii datorati schimbărilor conformaționale se numesc *izomeri conformaționali*.

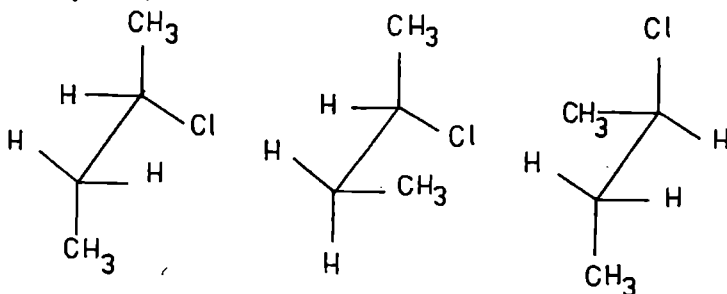
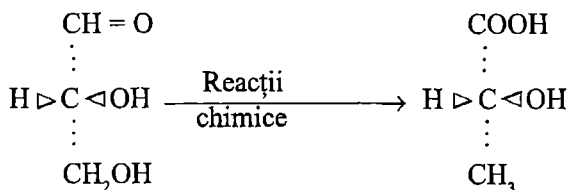


Fig. 1.19. Diferite conformații ale (-)-2-clorbutanului.

La scurtă vreme după descoperirea activității optice a devenit evident că relația stereochemică este mult mai importantă decât sensul de rotație. Aceasta deoarece nu există o relație bine definită între sensul de rotație al luminii

polarizate și chiralitate. De ex. (+)-glicerinaldehida a fost transformată în acid (-)-lactic:

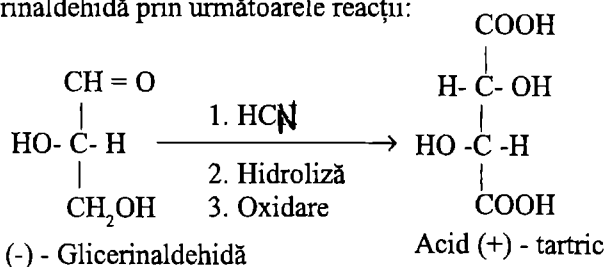


D-(+)- Glicerinaldehidă

Acid D-(-)-lactic

Se observă că atomul de carbon asimetric își menține configurația absolută cu toate că semnul de rotație a fost schimbat.

Pentru a dezvolta un sistem de relații stereochemice a fost necesar un standard la care să fie raportați toți compușii organici. Rosanoff (1906) a ales (+)- și (-)-glicerinaldehida ca standarde arbitrării. Să ne imaginăm următorul experiment. Presupunem că avem două flacoane conținând (+)- și respectiv, (-)-glicerinaldehidă. Se cere să atribuim modelul spațial adecvat fiecăruia dintre cei doi enantiomeri. Cu alte cuvinte, trebuie rezolvată problema chiralității celor doi enantiomeri. Bijvoet și colab. (1951), folosind raze X speciale, au determinat configurația absolută a acidului (+)-tartric. Acidul (+)-tartric a fost obținut din (-)-glicerinaldehidă prin următoarele reacții:



A devenit astfel evidentă chiralitatea enantiomerilor L(-)-glicerinaldehidă și D(+)-glicerinaldehidă. Prin urmare, modelul tetraedric al celor doi enantiomeri, și formulele plane sunt cele indicate în Fig. 1.20. Literele D și L indică înrudirea

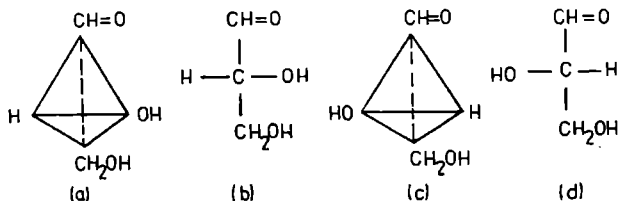


Fig. 1.20. Formulele tetraedrice și formulele plane ale D(+)- și L(-)-glicerinaldehidei: (a) și (b) D(+)-glicerinaldehida; (c) și (d) L(-)-glicerinaldehida.

stERICĂ cu configurația (+)-glicerinaldehidei și respectiv, (-)-glicerinaldehidei. În felul acesta, orice compus care poate fi preparat din, sau convertit în, D(+)-glicerinaldehidă va aparține seriei D. Similar, orice compus care poate fi preparat din, sau convertit în, L(-)-glicerinaldehidă va aparține seriei L. Când reprezentăm relațiile configuraționale relative ale moleculelor conținând mai mult de un atom de carbon asimetric, atomul de carbon asimetric raportat la glicerinaldehidă este, de regulă, desenat în partea de jos a catenei hidrocarbonate scrisă vertical, restul moleculei fiind construit de la această unitate (Fig. 1.21).

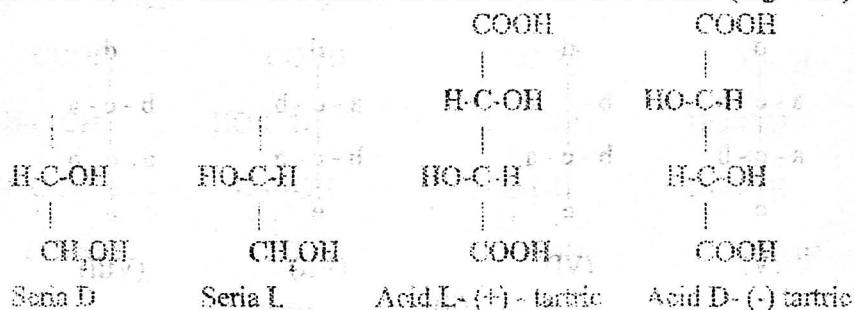
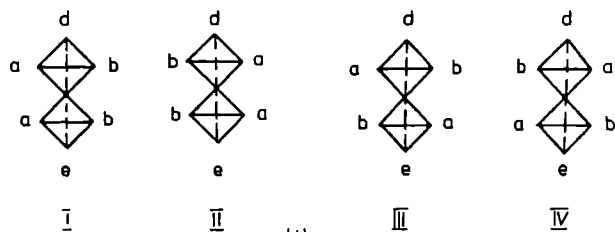


Fig. 1.21. Atribuirea seriei stereice la glucide și acizii tartrici.

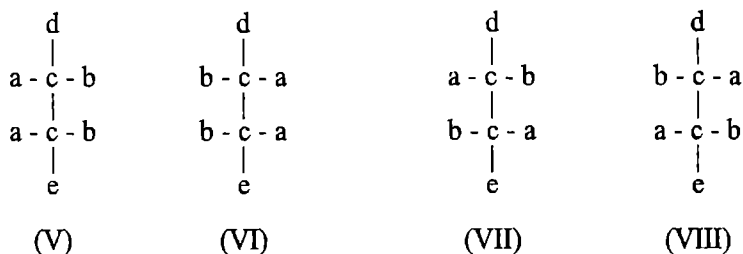
Disponem astfel de o schemă de clasificare a configurațiilor faradice, bazate pe D(+)-glicerinaldehidă și respectiv, L(-)-glicerinaldehidă ca standarde arbitrar.

### Doi carboni asimetrici

Să examinăm acum stereochemia unei molecule conținând doi atomi de carbon asimetrici. Să considerăm mai întâi cazul unui compus conținând doi atomi de carbon structural deosebiți, de tipul CabdCabe, cum ar fi acidul 2,3-dibrom butiric,  $\text{CH}_3\text{CHBrCHBrCOOH}$ . Există patru aranjamente spațiale posibile pentru acest tip de structură (Fig. 1.22): (I) și (II) sunt enantiomeri, iar un amestec echimolecular al lor constituie un racemic; în aceeași relație se găsesc structurile (III) și (IV). Astfel, există patru forme optic active. În general, un compus care conține  $n$  atomi de carbon asimetrici există în  $2^n$  forme optic active. I și III nu sunt identici în configurație și nu sunt imagini în oglindă; ei sunt cunoscuți ca *diastereoizomeri*, adică sunt izomeri optici, dar nu enantiomeri. Astfel, un compus de tipul CabdCabe prezintă două perechi de enantiomeri și doi racemici. Diastereoizomerii diferă în proprietățile fizice, cum ar fi p. t., solubilitatea, rotația specifică etc. Chimic, ei sunt similari, dar vitezele lor de reacție cu alți compuși optic activi sunt diferite. Formulele plane ale moleculelor (I-IV) sunt prezentate în Fig. 1.22.



(i)



(ii)

Fig. 1.22. (i) Aranjamente spațiale posibile ale acidului 2,3.dibrombutiric;  
(ii) formulele plane.

Perechile de enantiomeri de tipul CabdCabe se disting prin prefixele eritro și treo. Primii se găsesc în conformația în care cele două grupări a și cele două grupări identice b se eclipsează reciproc (a,a și b,b), în timp ce în izomerii treo se eclipsează grupări sau atomi diferiți. Astfel, I și II sunt forme eritro, iar III și IV sunt forme treo. Aceste denumiri sunt derivate de la eritroză și treoză.

Să considerăm acum cazul unui compus conținând doi atomi de carbon asimetrici care au aceeași structură, adică compuși de tipul CabdCabd, de ex. acidul tartric HOOCCHOHCHOHCOOH. Pentru compuși de acest tip sunt posibile patru aranjamente spațiale (IX-XII) și patru formule plane (XIII-XVI) (Fig. 1.23). În moleculele IX și X jumătățile superioară și inferioară se întăresc reciproc; deci, IX și X sunt unul dextrogir, iar celălalt levogir. Prin urmare, IX și X sunt optic activi, sunt enantiomeri. Pe de altă parte, în XI cele două jumătăți sunt în opoziție și deci molecula, ca întreg, nu va prezenta activitate optică. De asemenea, XI și XII sunt identici, adică există o singură formă optic inactivă a lui CabdCabd. Compusul XI este optic inactiv prin compensare internă; el este cunoscut ca mezoformă și este un diastereoizomer al lui IX și X. Astfel, există trei forme posibile: D-, L- și mezo.

Molecula XI este un exemplu de compus având doi atomi de carbon asimetrici, dar fiind optic inactiv (prin compensare internă). Prin urmare, aprecierea formulei structurale uzuale prin aceea că conține doi (sau mai mulți) atomi de carbon asimetrici, nu este suficientă pentru a decide dacă molecula este

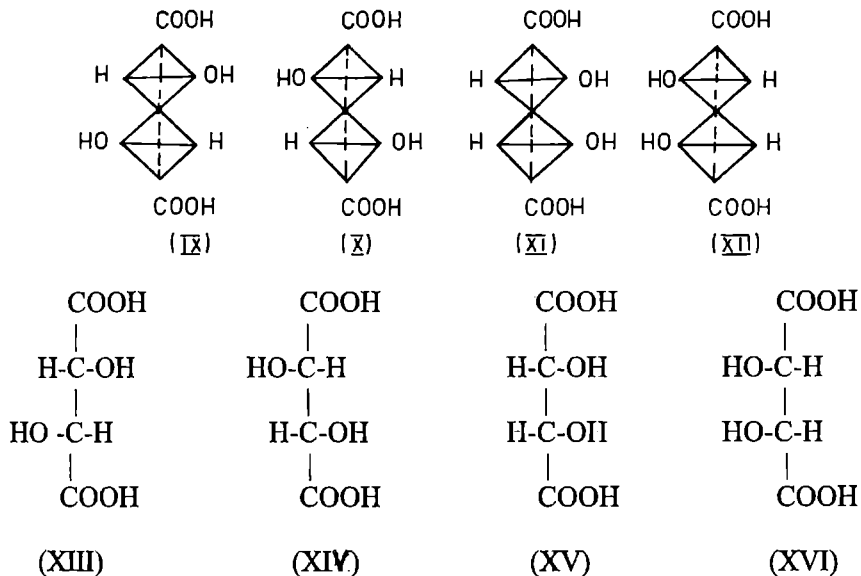


Fig. 1.23. Aranjamentele spațiale și formulele plane ale acidului tartric.

sau nu optic activă. *Molecula ca întreg trebuie să fie asimetrică.* Testul de superpozabilitate a structurii originale și a imaginii ei în oglindă indică în mod definitiv dacă molecula este sau nu asimetrică. Calea cea mai satisfăcătoare pentru atribuirea superpozabilității este construirea de modele ale moleculei și imaginii ei în oglindă.

O modalitate simplă pentru a decide dacă o moleculă este sau nu simetrică este de a stabili dacă aceasta conține un *plan* de simetrie, un *centru* de simetrie sau o *axă alternativă* de simetrie. Dacă se realizează unul dintre aceste elemente de simetrie, molecula este simetrică, adică superpozabilă pe imaginea sa în oglindă.

Un *plan* de simetrie împarte molecula astfel încât punctele (atomi sau grupări de atomi) de pe o parte a planului formează imagini în oglindă cu punctele de pe latura opusă. Acest test poate fi aplicat atât modelelor spațiale, cât și formulelor plane, de ex. formula plană a formei mezo CabdCabd posedă un plan de simetrie; celelalte două forme, D- și L-, nu posedă (Fig. 1.24).

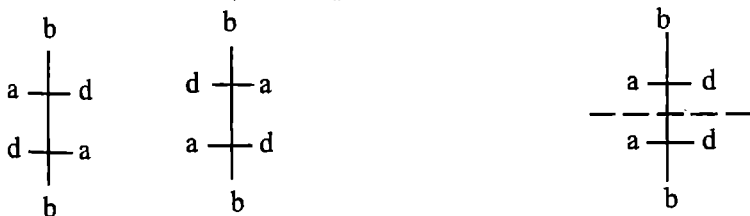
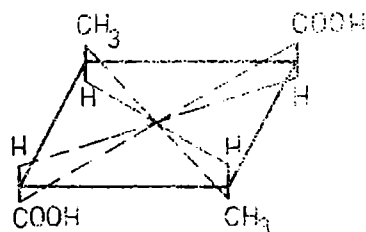


Fig. 1.24. Planul de simetrie al formei mezo (atomii de carbon asimetrici se găsesc la intersecția liniei verticale cu liniile orizontale).

*Centrul de simetrie* este un punct astfel încât orice dreaptă ce trece prin acest punct împarte în două părți și de partea opusă a punctului același substituent (atom). Acest test poate fi aplicat în mod satisfăcător formulelor tridimensionale, înlocuind sistemelor ciclice, de ex. acidul 2,4-dimetilciclobutan-1,3-dicarboxilic. Structura prezentată mai jos posedă un centru de simetrie, care este centrul ciclului.

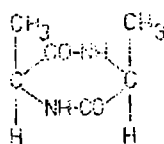
Acidul 2,4-dimetilciclobutan-1,3-dicarboxilic este prin urmare optic inactiv.



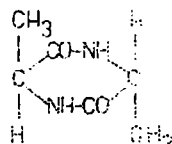
Acid 2,4-dimetilciclobutan-1,3-dicarboxilic

Dimetilidicetopiperazina există forme geometrice izomere, *cis* și *trans*.

Izomerul *cis* nu posedă nici plan, nici centru de simetrie. Prin urmare, există în două forme enantiomere; ambele sunt cunoscute. Izomerul *trans* are un centru de simetrie, prin urmare, este optic inactiv.



*cis*



*trans*

Dimetilidicetopiperazina

### *Specificarea configurațiilor absolute*

Sistemul de specificare a configurației absolute pentru o moleculă care conține un atom de carbon asimetric, adică conține un centru chiral, este alcătuit din următoarele reguli:

1. Cele patru grupări sunt mai întâi ordonate conform cu regula *secvenței*. Conform acestei reguli, grupările sunt aranjate în ordinea descrescătoare a numărului atomic al atomilor prin care ele sunt legate la atomul de carbon asimetric. Dacă doi sau mai mulți din acești atomi au același număr atomic, atunci prioritatea relativă a grupării este determinată printr-o comparație similară a numerelor atomice a atomilor următori din grupări. Dacă aceasta nu este edificatoare sunt luați în considerare următorii atomi din grupări etc.

2. Se determină apoi dacă secvența descrie un model tip R sau tip S, după cum rezultă din *regula de conversie*. Când cele patru grupări din molecula Cabod au fost ordonate în prioritatea descrescătoare a, b, c, d, regula de conversie

stabilește că modelul lor spațial este R sau S în funcție de secvența a-b-c. Dacă aceasta este în sens orar, când grupările sunt privite dintr-un punct extern pe latura opusă lui d (gruparea cu prioritatea cea mai scăzută), este vorba de un centru chiral R; dacă succesiunea de scădere a priorității este în sens anti-orar, centrul chiral este desemnat S (R, rectus, dreapta; S, sinister, stânga). De ex. compusul I prezintă un centru chiral R (Fig. 1.25).

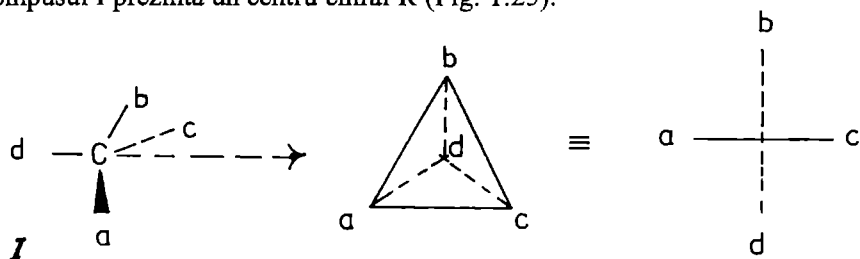
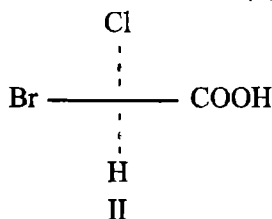
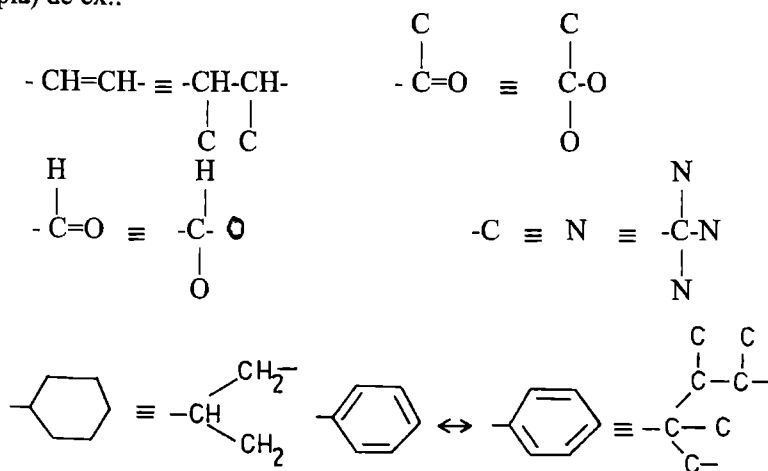


Fig. 1.25. Regula de conversie pentru un carbon asimetric.

Din aceleași motive acidul bromocloroacetic (II) are un centru chiral R:



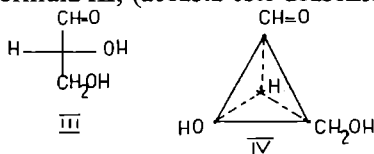
Când sunt prezente legături multiple sau inele procedul de determinare a priorității este după cum urmează. Atomii atașați la o legătură multiplă sunt considerați a fi duplicați (pentru o legătură dublă) sau triplicați (pentru o legătură triplă) de ex.:



Secvența de prioritate este determinată apoi prin considerarea „structurii” duplicate sau triplicate în care există atomii „fantomă” de ex.  $-\text{CH}=\text{O}$  este  $-\text{CH}(\text{O})-\text{O}$  iar  $-\text{CH}(\text{OH})_2$  este  $-\text{CHOH}-\text{OH}$  (atomul „fantomă” din primul este cel din paranteză). Ambele grupări conțin un atom de carbon legat la doi atomi de oxigen și deci  $-\text{CH}(\text{OH})_2$  precede ca prioritate gruparea  $-\text{CH}=\text{O}$ .

Sistemele ciclice sunt tratate precum catenele ramificate, și dacă sunt nesaturate, duplicarea este folosită pentru o legătură dublă iar triplicarea pentru o legătură triplă. Prin utilizarea acestor reguli se poate arăta că ordinea de prioritate pentru substituții mai frecvent întâlniți este următoarea: I, Br, Cl,  $\text{SO}_3\text{H}$ , SH, F, OCOR, OR, OH,  $\text{NO}_2$ , NHR,  $\text{NH}_2$ , COOR, COOH, COR, CHO,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , CN, Ph,  $\text{CR}^3$ ,  $\text{CHR}^2$ ,  $\text{CH}_2\text{R}$ ,  $\text{CH}_3$ , D, H.

Să luăm acum în considerație D(+)-glicerinaldehida. Prin convenție, inițial, iar ulterior prin difracție cu raze X s-a conchis că D(+)-glicerinaldehida este corect reprezentată prin formula III; (aceasta este deasemenea configurația absolută):



Comparația cu lista secvenței de prioritate dă ordinea următoare: OH (a), CHO (b),  $\text{CH}_2\text{OH}$  (c), și H (d). Deoarece (III) este echivalent cu (IV) rezultă că D(+)-glicerinaldehida este (R)-glicerinaldehida. Similar, L(-)-glicerinaldehida este (S)-glicerinaldehida.

Când o moleculă conține doi sau mai mulți atomi de carbon asimetrici, i se atribuie fiecărui atom de carbon asimetric (centru chiral) o configurație cu regulile de prioritate și conversie după care este specificat cu R sau S; de ex. acidul L(+)-tartric este acid (RR)-tartric.

Regula de secvență a fost desemnată și pentru a sesiza corespondența dintre simbolurile D și L, pe de o parte, și simbolurile R și S, pe de altă parte. Simbolurile D și L se obțin prin intermediul transformărilor chimice în timp ce R și S sunt derivate din modele geometrice și sunt independente de corelații. Din această cauză R și S trebuie aplicate numai compușilor a căror stereochimie absolută a fost determinată în prealabil; termenii R și S nu corelează în mod necesar serii sterice.

### 1.5.2.2. Izomeria geometrică

Izomeria geometrică sau izomeria *cis/trans* este caracteristică compușilor având aceeași structură dar configurații diferite, iar din cauza simetriei lor moleculare acești compuși nu sunt, de regulă, optic activi. Ei pot prezenta deasemenea izomerie optică dacă structura moleculei satisface deasemenea cerințele pentru izomeria optică.

Mulți compuși care conțin o legătură dublă există în două forme care diferă în multe din proprietățile fizice și chimice. Van 't Hoff a sugerat că dacă



presupunem că nu există rotație liberă în jurul legăturii duble, sunt posibile două aranjamente spațiale pentru molecula respectivă. Dacă atribuim hibridizarea  $sp^2$  celor doi atomi de carbon nesaturați, atunci se realizează o suprapunere maximă a celor doi orbitali  $\pi$  care cauzează rezistența la rotație în jurul legăturii duble.

Izomeria geometrică este prezentă la compuși cu legături duble precum și la derivații ai cicloalcanilor.

## 1.6. COMPUȘI HETEROCICLICI CU CARACTER AROMATIC

### Introducere

Heterociclii sunt molecule care au ciclurile compuse din carbon și heteroatomi, în special oxigen, sulf și azot. O comportare specială prezintă heterociclii aromatici, adică cei total nesaturați. Heterociclii aromatici pot fi împărțiți în două familii care derivă formal de la benzen:

1. *Heterociclii aromatici cu șase atomi.* Aceștia iau naștere formal prin înlocuirea uneia sau mai multor grupări  $-CH=$  din benzen cu unul sau respectiv mai mulți heteroatomi (Fig. 1.24).

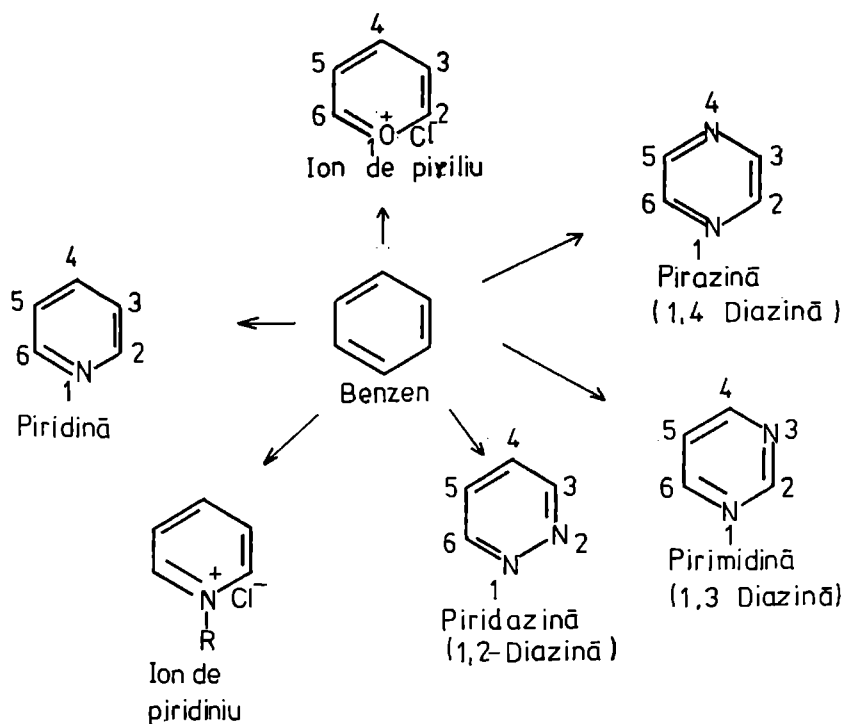
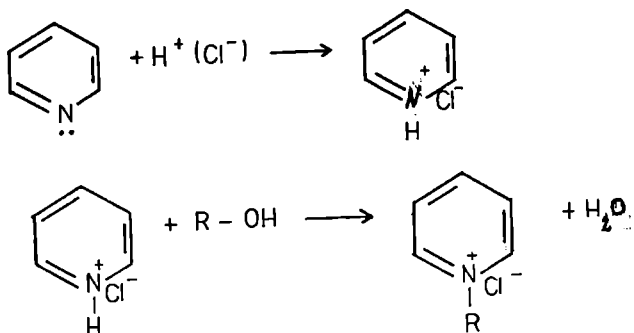
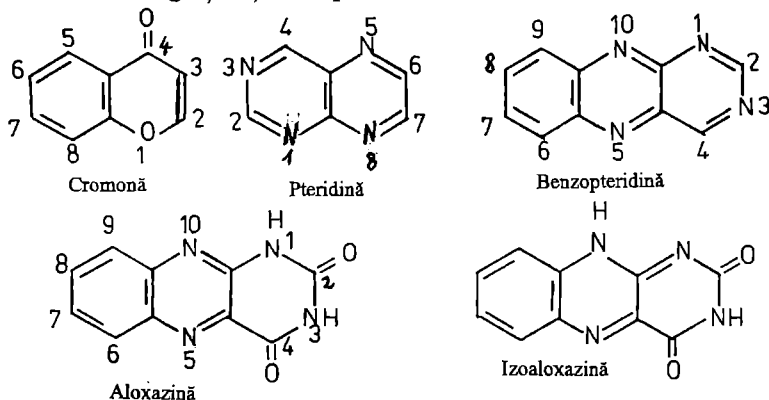


Fig. 1.24. Heterociclii aromatici cu șase atomi.

Observații. A. Ionul de piridiniu ia naștere (sub formă de sare) prin reacțiile:



B. Un heterociclu își menține în mare măsură comportarea sa caracteristică în situația când este condensat cu unul sau două cicluri aromatice (benzenice sau heterociclice (J. B. Hendrickson și colab., 1970)). Prin urmare la heterociclii din Fig. 1.24 se vor adăuga și alții de tipul:



C. Se pare că izoaloxazina, forma tautomeră a aloxazinei, nu există ca atare; numai când atomul de hidrogen de la  $N^{10}$  este substituit, forma izoaloxazinică este stabilă.

2. *Heterociclii aromatici cu cinci atomi*. În acest caz două grupări  $-CH=CH-$  din benzen sunt înlocuite (formal) cu un heteroatom cu o pereche de electroni neparticipanți; rezultă astfel heterocicli cu cinci atomi, monoheteroatomici. Substituția altor grupări  $-CH=$  din acești heterocicli cu heteroatomi duce la heterocicli cu cinci atomi, poliheteroatomici (Fig. 1.25).

*Notă* la Fig. 1.25: un heterociclu cu cinci atomi condensat cu un ciclu aromatic de șase atomi își păstrează în mare măsură comportarea sa caracteristică. Prin urmare la heterociclii din Fig. 1.25 se vor adăuga și heterociclii de tipul indol și purină.

*NOMENCLATURA*. Dacă într-un heterociclu sunt prezenți atomi de mai multe tipuri, prioritatea de numerotare este în ordinea: O, S, N. Pozițiile ciclului

sunt apoi desemnate printr-un număr, începând cu numărul unu la heteroatomul cu prioritate maximă. Ciclul este numerotat astfel încât ceilalți heteroatomi să aibă cele mai mici numere posibile.

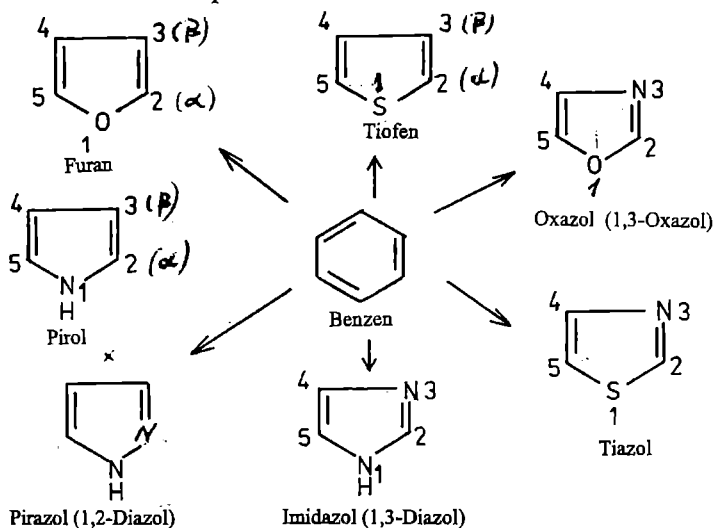
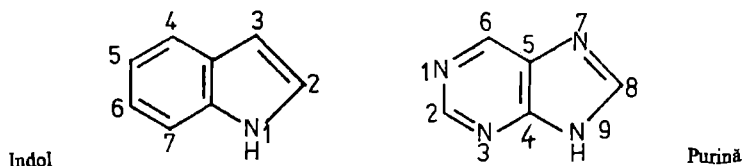


Fig. 1.25. Heterocicli aromatici cu cinci atomi.



Denumirile heterociclicilor aromatici se formează prin combinarea următoarelor prefixe și sufixe:

Atom	Prefixe
O	oxa-
S	tia-
N	aza-

Sufixe:

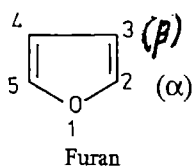
-ol pentru ciclu de 5 atomi

-ină pentru ciclu de 6 atomi *cu azot*.

Combi-na-țiile heterociclice aromatice sunt sărace în hidrogen și se aseamănă, prin stabilitatea și reacțiile lor, cu benzenul și derivații săi. Combi-na-țiile heterociclice cu caracter aromatic au fost sistematizate astfel (C. D. Nenițescu, 1980; M. Avram, 1983).

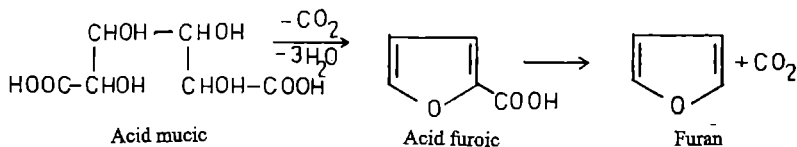
## 1.6.1. Heterocicli cu cinci atomi, monoheteroatomici

### 1.6.1.1. Grupa furanului



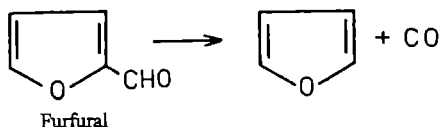
Furanul conține în ciclu un atom de oxigen. Există două tipuri de derivați monosubstituiți ai furanului: 2 (sau  $\alpha$ ) și 3 (sau  $\beta$ ).

*Metode de preparare.* 1. Furanul se obține prin distilarea lemnului, în special a lemnului de pin. 2. Prin distilarea acidului mucic, urmată de încălzirea la p.f. a acidului furoic rezultat, se obține furan:

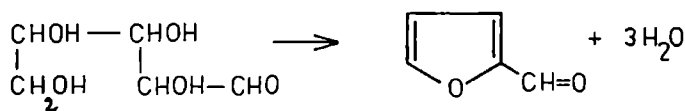


Randament mai bun dă decarboxilarea acidului furoic în chinolină în prezența pulberii de cupru.

3. Descompunerea catalitică a furfuralului produce furan:



Furfuralul se prepară în cantități industriale din deșeuri vegetale bogate în pentozani (coji de ovăz, de semințe de floarea-soarelui, coceni, tărâțe etc.) prin încălzire cu acizi minerali diluați:



*Proprietăți.* Furanul este un lichid cu p.f. 32°C. Comportarea sa chimică este a unui compus aromatic, dar în alte situații se comportă ca o 1,3-dienă. Astfel, furanul este mai puțin aromatic decât tiofenul și pirolul.

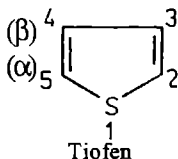
Prin reducere catalitică (Ni Raney) furanul duce la tetrahydrofuran:



Tetrahidrofuranul este un solvent valoros și un bun mediu de reacție (de ex. pentru prepararea reactivilor Grignard).

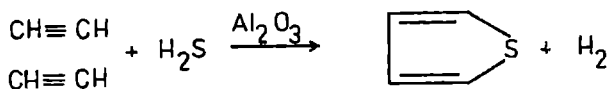
### 1.6.1.2. Tiofenul

Tiofenul se găsește în gudronul de cărbune și în șisturile bituminoase. Tiofenul are p.f. 84°C, apropiat de al benzenului astfel că separarea de acesta din urmă este dificilă. Tiofenul se sulfonează mai ușor decât benzenul și această proprietate este utilizată pentru a separa cei doi compuși prin agitare repetată a benzenului cu acid sulfuric conc. la rece: rezultă acidul tiofen sulfonic acvosolubil.

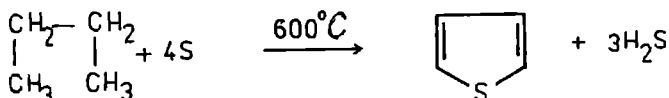


O metodă mai bună de separare constă în refluxarea amestecului cu acetat mercuric apos când tiofenul este mercurat iar benzenul nu este. Din derivatul mercurat tiofenul este recuperat prin distilare cu acid clorhidric.

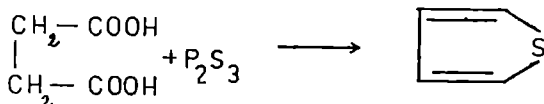
*Metode de preparare.* 1. Prin trecerea unui amestec de acetilenă și hidrogen sulfurat peste alumină la 400°C rezultă tiofen:



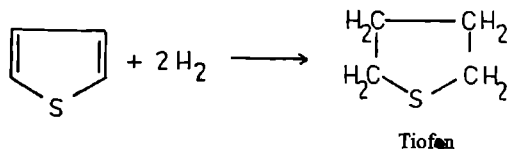
2. Butanul reacționează cu sulfurul în fază de vapori, dând tiofen:



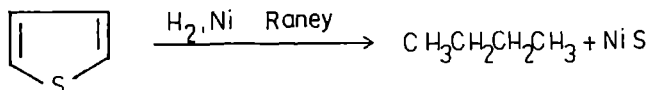
3. Încălzirea succinatului de sodiu cu trisulfura de fosfor duce la tiofen:



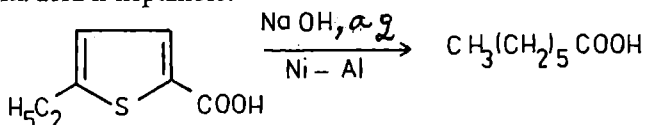
*Proprietăți.* 1. Reducerea tiofenului cu paladiu produce tetrahidrotiofen (tiofan, tiolan):



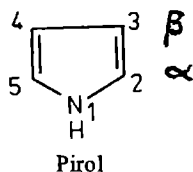
2. Reducerea tiofenului în prezență de nichel Raney are ca rezultat îndepărtarea sulfului, produsul fiind n-butanul:



Această desulfurare a fost utilizată ca mijloc de preparare a acizilor alifatici mono- și dicarboxilici. Metoda constă în tratarea acidului tiofen mono- sau dicarboxilic, în soluții alcaline apoase, cu aliaj Ni-Al; din acid 5-etiltiofen-2-carboxilic rezultă acid n-heptanoic:



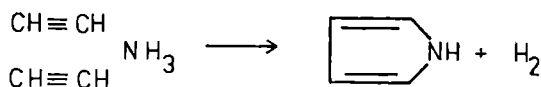
### 1.6.1.3. Grupa pirolului



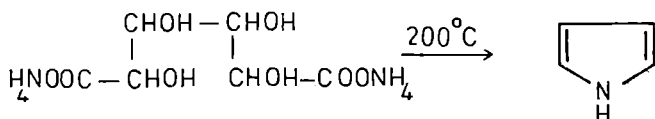
Pirolul este un heterociclu important deoarece intră în constituția multor compuși naturali, de ex. alcaloizi, clorofilă, hem.

*Preparare.* 1. Pirolul se găsește în gudronul de cărbune și în uleiul de oase din care se extrage.

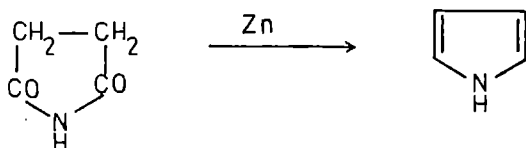
2. Pirolul poate fi sintetizat prin trecerea unui amestec de acetilenă și amoniac printr-un tub încălzit la roșu:



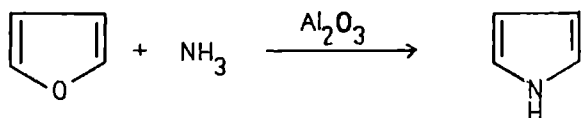
3. Pirolul se prepară de asemenea prin distilarea unui amestec de glicerol și sarea de amoniu a acidului mucic, la 200°C:



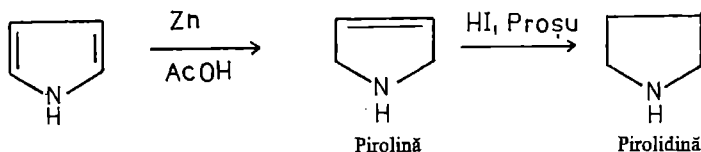
4. Se formează pirol prin distilarea succinimidei cu pulbere de zinc:



5. Trecerea unui amestec de furan, amoniac și vapori de apă peste alumina la cald produce pirol:



*Proprietăți.* Pirolul este un lichid cu p.f. 131°C care se închide la culoare rapid prin expunere la aer.



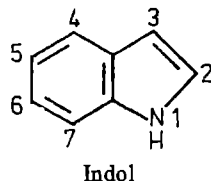
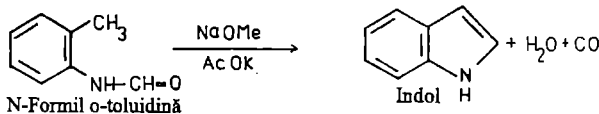
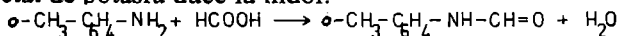
Prin reducerea pirolului cu Zn și acid acetic rezultă pirolina (p.f. 91°C); aceasta, prin încălzire cu HI și fosfor roșu, dă pirolidina (p.f. 88°C):

Pirolidina poate fi preparată deasemenea catalitic prin reducerea pirolului pe nichel la 200°C. Spre deosebire de pirol, care este o bază foarte slabă, pirolina și pirolidina sunt amândouă baze tari.

#### 1.6.1.4. Indolul (benzpirolul)

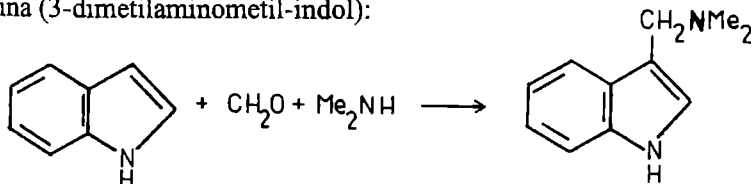
Indolul se găsește în gudronul de cărbune, în florile de iasomie și în florile de portocal.

*Preparare.* Reacția dintre o-toluidină (2-metil-anilină) și acid formic produce N-formil-o-toluidina. Încălzirea N-formil-o-toluidinei cu metoxid și acetat de potasiu duce la indol:



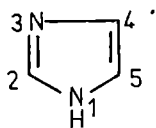
*Proprietăți.* Indolul este un solid cu p.t. 52°C, cu miros greu, neplăcut.

Indolul suferă reacția Mannich cu formaldehida și dimetilamina, dînd gramina (3-dimetilaminometil-indol):



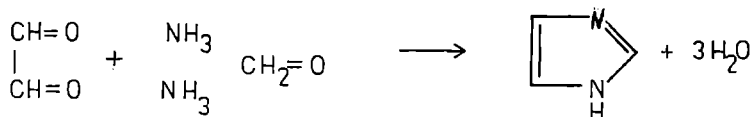
## 1.6.2. Cicluri de cinci atomi, poliheteroatomice

### 1.6.2.1. Imidazolul (glioxalina)

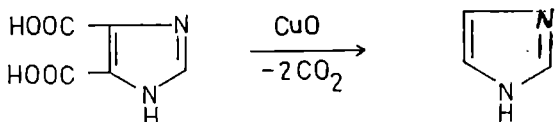
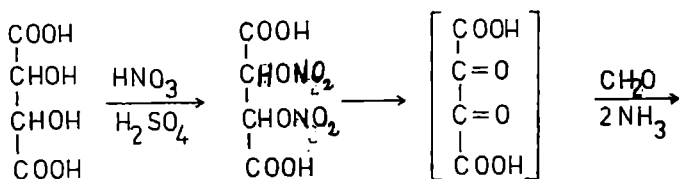


Imidazol

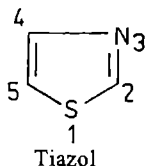
Acest mecanism este susținut de faptul că imidazolul poate fi preparat direct de la glioxal, amoniac și formaldehidă:



2. Tratarea acidului tartric cu un amestec de acizi concentrați (azotic și sulfuric) duce la dinitratul acidului tartric (acid dinitrotartric), care prin tratare cu formaldehidă și amoniac duce la acid imidazol 4,5-dicarboxilic; decarboxilarea acestuia, prin încălzire cu oxid de cupru, dă imidazol:



**Proprietăți.** Imidazolul este un solid cu p.t. 90°C. Structura imidazolului este tautomeră: pozițiile 4 și 5 sunt identice. Cu alte cuvinte atomul de H aparține în mod egal celor doi atomi de N.

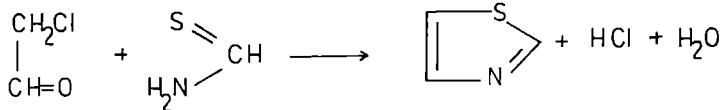


Tiazol

### 1.6.2.2. Tiazolul

Tiazolul intră în constituția vitaminei B1 (tiamina, aneurina). Este un lichid cu p.f. 117°C. Se prepară prin reacția dintre cloroacetaldehidă și tioformamidă:

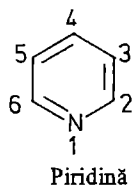




### 1.6.3. Cicluri de șase atomi, monoheteroatomice

#### 1.6.3.1. Piridina

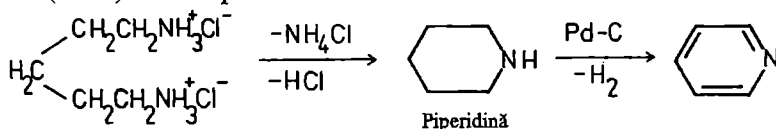
Piridina se găsește în gudroanele cărbunilor de pământ și în uleiul de oase; intră în constituția unor vitamine (vitamina B6) și a alcaloizilor.



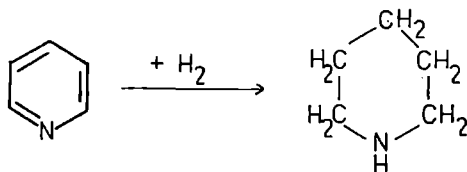
*Preparare.* 1. Trecerea unui amestec de acetilenă și HCN printr-un tub încălzit la roșu duce la piridină:



2. Încălzirea hidroclorurii 1,5-diaminopentanului (cadaverina) produce piperidină; oxidarea piperidinei cu  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. la  $300^\circ\text{C}$  sau dehidrogenarea catalitică (Pd-C) duce la piridină:

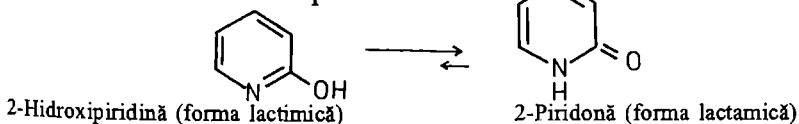


*Proprietăți.* Piridina este un lichid cu p.f.  $115^\circ\text{C}$ . Piridina este o bază slabă,  $K_b = 5,6 \times 10^{-10}$ . Hidrogenarea catalitică a piridinei produce piperidina:

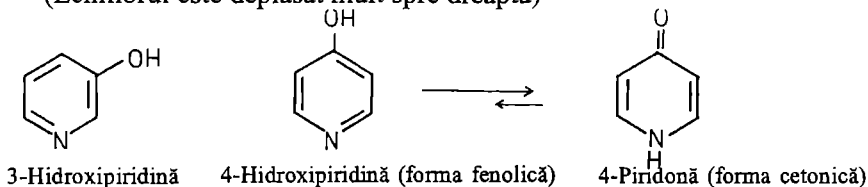


#### 1.6.3.2. Hidroxipiridinele (Piridonele)

Se cunosc trei hidroxipiridine:



(Echilibrul este deplasat mult spre dreapta)



(Echilibrul este deplasat mult spre dreapta)

Hidroxi-piridinele sunt substanțe solide cristalizate, cu următoarele puncte de topire: p.t.  $\alpha$  107°C; p.t.  $\beta$  120°C; p.t.  $\gamma$  148°C).

*Elucidarea structurii.* Toate hidroxipiridinele dau cu clorura ferică reacția de culoare caracteristică a fenolilor cu precizarea că  $\alpha$ - și  $\gamma$ -hidroxipiridinele dau o culoare deschisă (reacție slabă) în timp ce  $\beta$ -hidroxipiridina dă o culoare intensă.

S-a găsit că 2-hidroxipiridina se găsește în soluție ca 2-piridonă (deci în forma lactamică) iar 4-hidroxipiridina se găsește în soluție ca 4-piridonă (forma cetonică). S-a ajuns la această concluzie în urma analizării spectrelor: spectrul 2-piridonei este identic cu al N-metil-2-piridonei și diferit de al 2-etoxipiridinei: (Fig. 1.26).

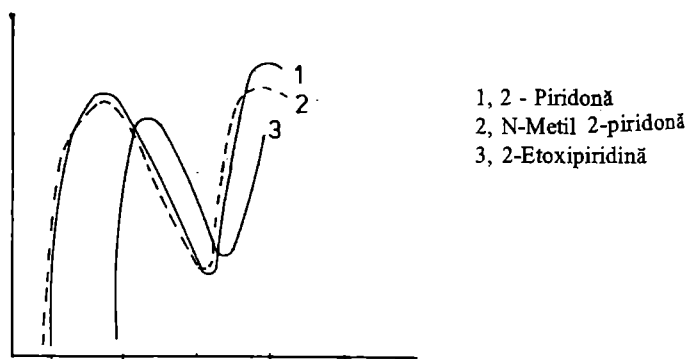
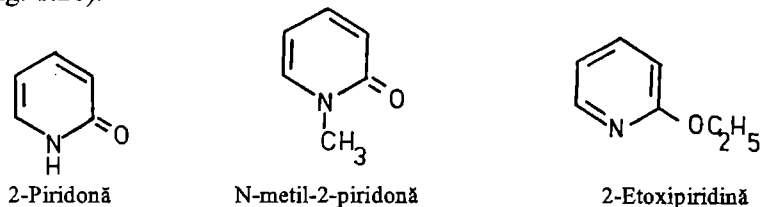
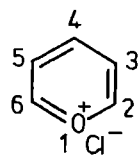


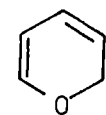
Fig. 1.26. Spectrul unor derivați piridinici



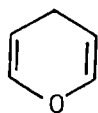
### 1.6.3.3. Cicluri de șase atomi cu un atom de oxigen

Un heterociclu aromatic cu un atom de oxigen este cationul de piriliu:

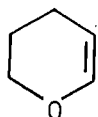
Derivați ai cationului de piriliu obținuți prin metode directe sau indirecte sunt:



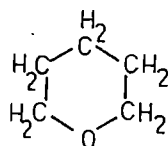
$\alpha$ -Piran



$\gamma$ -Piran



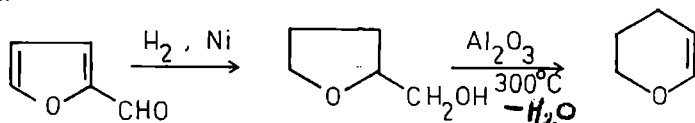
2,3-Dihidro-4-piran



Tetrahidropiran

$\alpha$ -Piranul și  $\gamma$ -piranul, ca atare, nu sunt stabili dar aceste inele intră în constituția unor compuși bine definiți.

2,3-Dihidro-4-piranul se prepară prin încălzirea alcoolului tetrahidrofurfurilic cu alumina:

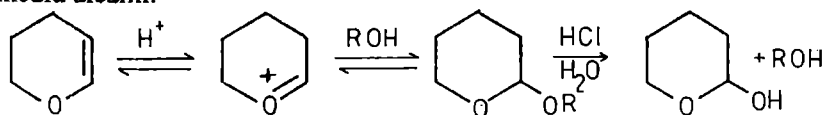


Furfural

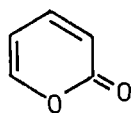
Alcool tetrahidrofurfurilic

Ultimul compus dă, prin reducere catalitică (Ni Raney), tetrahidropiran.

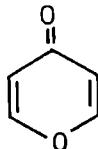
Legătura dublă din dihidropiran este foarte reactivă: în prezența acidului p-toulensulfonic reacționează ușor cu compușii hidroxilici, cum sunt alcoolii și fenolii, formând eteri. Acești eteri sunt stabili în mediu alcalin dar sunt ușor hidrolizați de către acizii diluați. Prin urmare această reacție constituie o metodă de protecție a grupării hidroxil pentru reacțiile ce decurg în mediu alcalin:



Derivații ceto corespunzători ai piranilor se numesc pironi:

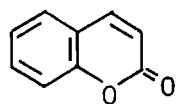


2-sau  $\alpha$ -Pironă

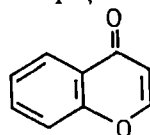


4-sau  $\gamma$ -Pironă

Sistemele moleculare condensate ale pironelor sunt compuși naturali:



Benzo 2-pironă (sau cumarină sau  $\alpha$ -cromonă)

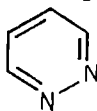


Benzo 4-pironă ( $\gamma$ -cromonă)

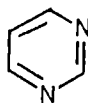
## 1.6.4. Cicluri de șase atomi, poliheteroatomice

### Grupul diazinelor

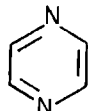
Teoretic sunt posibile trei diazine izomere și toate trei sunt cunoscute:



Piridazină (1,2-Diazină)



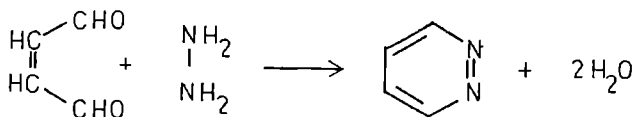
Pirimidină (1,3-Diazină)



Pirazină (1,4-Diazină)

### 1.6.4.1. Piridazina

Piridazina se prepară din dialdehidă maleică și (hidrat de) hidrazină:



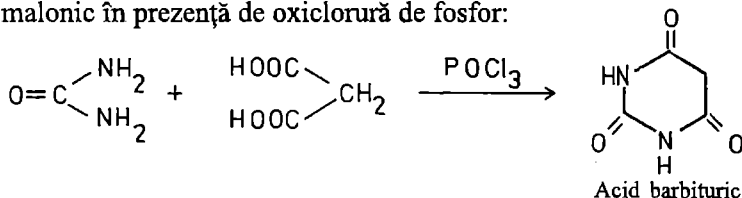
Piridazina, p.f. 208°C, este o bază slabă.

### 1.6.4.2. Grupa pirimidinei

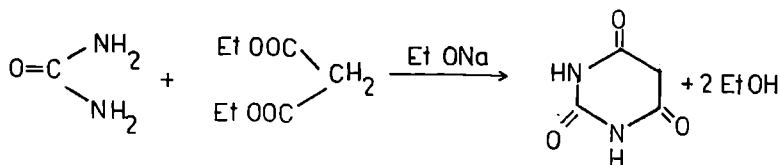
Grupa pirimidinei cuprinde compuși naturali importanți precum și compuși de interes medical.

#### Acidul barbituric

Acidul barbituric (maloniluree) a fost preparat inițial prin condensarea ureii cu acid malonic în prezență de oxiclură de fosfor:



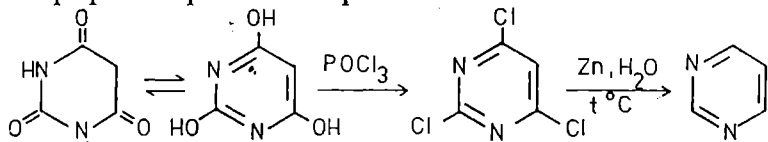
Randament mai bun se obține prin refluxarea dietilmalonatului cu uree în soluție etanolică, în prezență de etoxid de sodiu:



Acidul barbituric este un solid, p.t. 253°C, cu solubilitate redusă în apă.

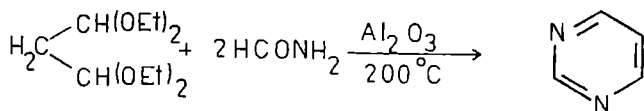
## Pirimidina

Prima preparare a pirimidinei a pornit de la acid barbituric:



Pirimidina poate fi preparată prin oxidarea alchilpirimidinelor, urmat de decarboxilare; reacția dovedește stabilitatea sistemului aromatic pirimidinic.

O metodă convenabilă de preparare a pirimidinei este prin reacția dintre 1,1,3,3-tetraetoxipropan și formamidă:



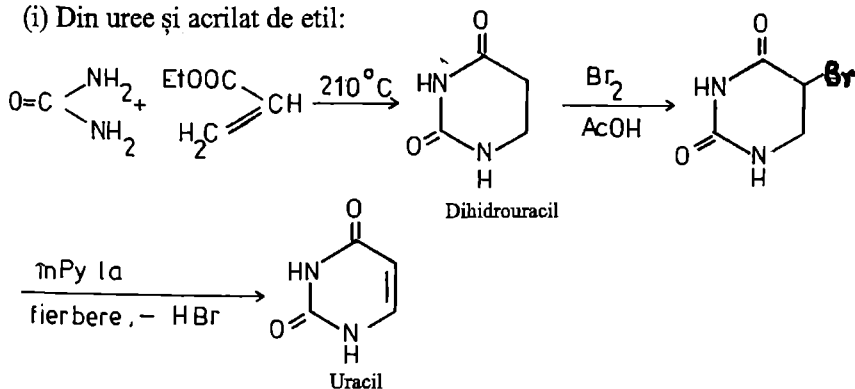
1,1,3,3, - Tetraetoxipropan

Pirimidina este neutră în soluție apoasă dar cu acizii formează săruri.

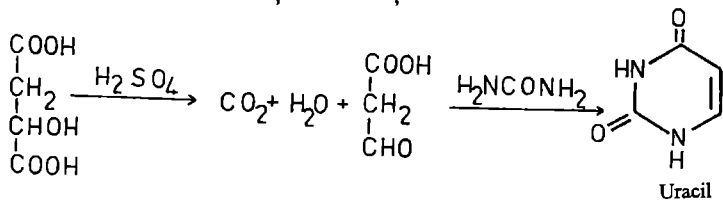
## Uracilul

Uracilul (2,4-dihidroxipirimidină) este un produs de hidroliză al acizilor nucleici. Se cunosc mai multe metode de sinteză a uracilului.

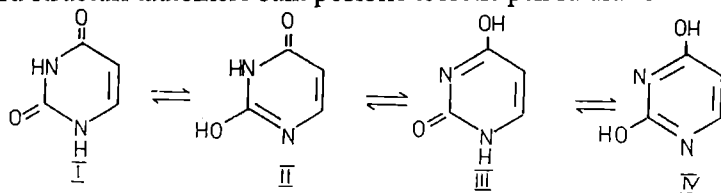
(i) Din uree și acrilat de etil:



(ii) Prin încălzirea unei soluții de uree și acid malic în acid sulfuric fumans:



Patru structuri tautomere sunt posibile teoretic pentru uracil:

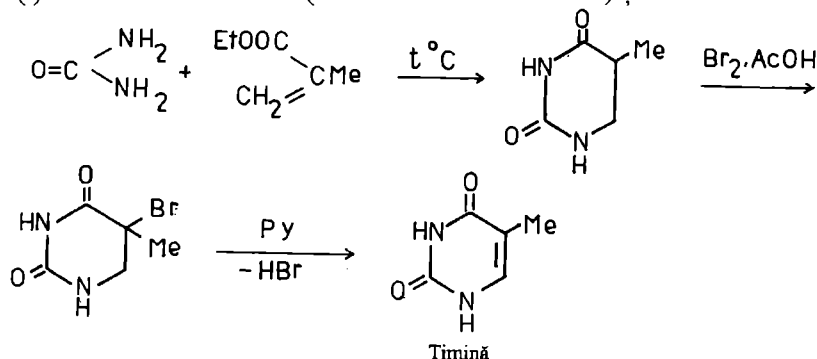


În derivații naturali uracilul există în forma (I).

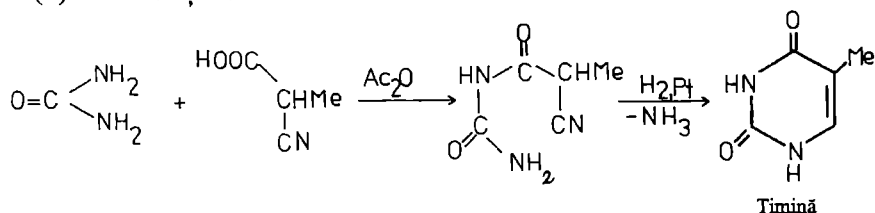
### Timina

Timina (5-metiluracilul; 2,4-dihidroxi-5-metilpirimidină) este un produs de hidroliză al ADN. A fost sintetizată prin metode similare celor de la uracil.

(i) Din metacrilat de etil (în locul acrilatului de etil) și uree:



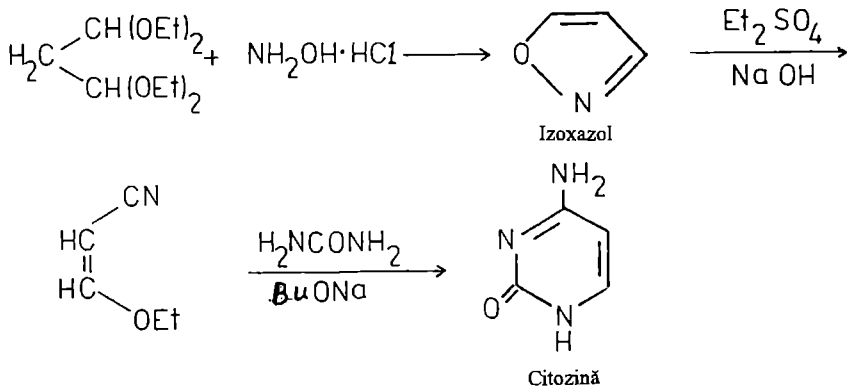
(ii) Din uree și acid metil-cian-acetic:



### Citozina

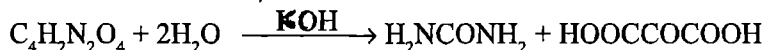
Citozina (4-amino-2-hidroxipirimidină) este un produs de hidroliză al acizilor nucleici (ADN și ARN). Una dintre cele mai bune sinteze ale citozinei este următoarea: v. pag. 91.

În acizii nucleici au fost găsiți doi derivați ai citozinei: 5-metil-citozină și 5-hidroximetilcitozină; ambii au fost sintetizați.

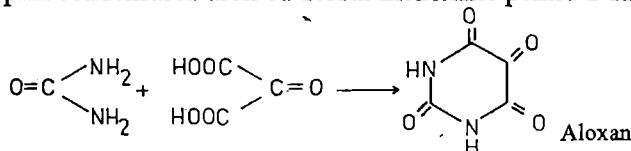


### Aloxanul

Aloxanul a fost preparat inițial prin oxidarea acidului uric (vezi acolo). Aloxanul are formula moleculară  $\text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4$ . Prin hidroliză cu alcalii aloxanul produce o moleculă de uree și o moleculă de acid mezoxalic:



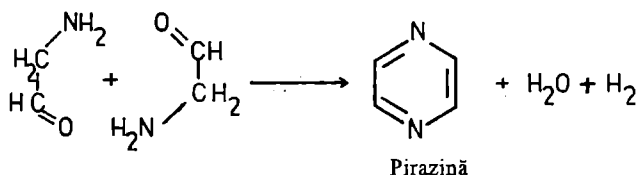
Deoarece aloxanul nu conține grupări amino sau carbonil libere, produșii de hidroliză sugerează că aloxanul este mezoxiluree; această structură ciclică a fost confirmată prin condensarea ureii cu acidul mezoxalic pentru a da aloxan:



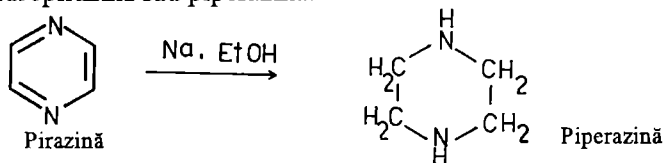
Aloxanul este un compus puternic acid; cristalizează cu patru molecule de apă. Trei dintre acestea se pierd ușor prin încălzire dar a patra se pierde numai când monohidratul este încălzit la  $150^\circ\text{C}$ . Din această cauză se presupune că cea de-a patra moleculă de apă nu este de cristalizare ci de constituție (ca la hidratul de cloral).

### 1.6.4.3. Pirazina

Pirazina a fost sintetizată din aminoacetaldehidă:

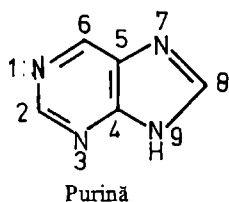


Pirazina este un solid cu p.t. 55°C, este redusă ușor, cu sodiu și etanol, la hexahidropirazină sau piperazină:



Piperazina, p.t. 104°C, este o bază diacidă puternică.

#### 1.6.4.4. Grupa purinei

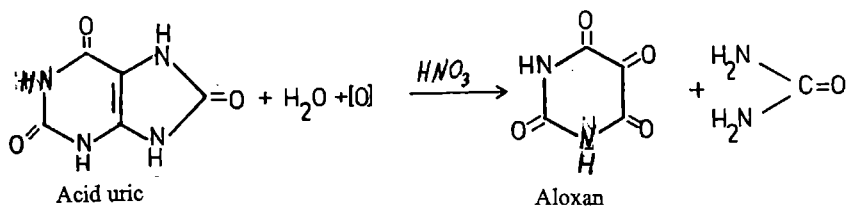


Purina este compusul parental a unui grup de diureide ciclice fiind alcătuită dintr-un ciclu pirimidinic condensat cu un ciclu imidazolic.

#### Acidul uric

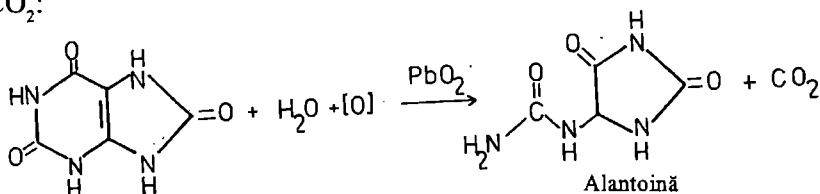
Acidul uric a fost descoperit de către Scheele (1776) în calculii urinari. Zăcămintele de guano (depozit de excremente de păsări, găsit pe insulele situate lângă coasta de vest a Americii de Sud) conțin acid uric până la o concentrație de 25%. Excrementele șerpilor constă aproximativ 90% din urat de amoniu.

Liebig și Wöhler (1834) au găsit că formula moleculară a acidului uric este  $C_5H_4N_4O_3$ . Structura acidului uric a rezultat din următoarele reacții. Oxidarea acidului uric cu acid azotic dă aloxan și uree în proporții echimoleculare:



(Reacția constituie și o metodă de preparare a aloxanului).

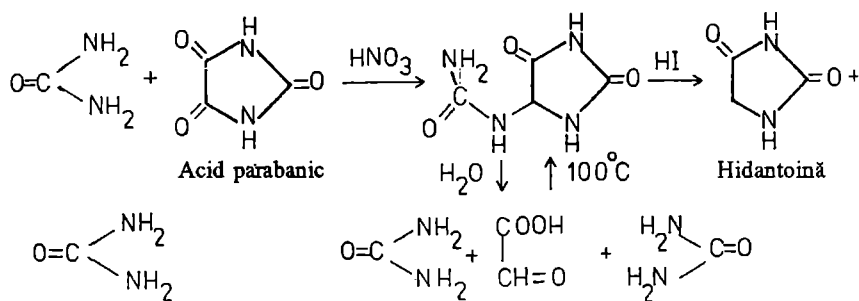
Oxidarea acidului uric cu o suspensie apoasă de  $PbO_2$  duce la alantoină și  $CO_2$ :



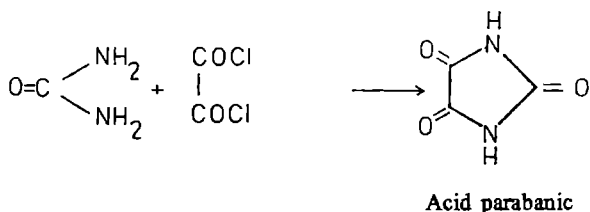


Dacă oxidarea de mai sus se realizează, în loc de  $\text{PbO}_2$ , cu permanganat în mediu alcalin randamentul de oxidare este cantitativ.

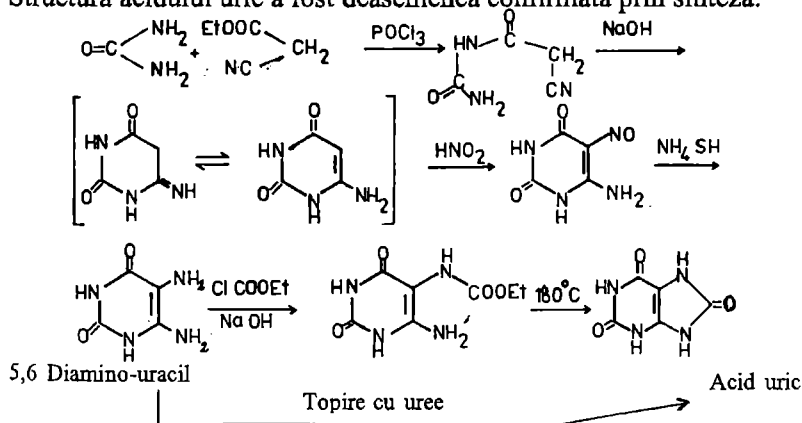
Structura alantoinei a rezultat din reacțiile următoare:



Acidul parabanic a fost sintetizat din diclorură de oxalil și uree:



Structura acidului uric a fost de asemenea confirmată prin sinteză:

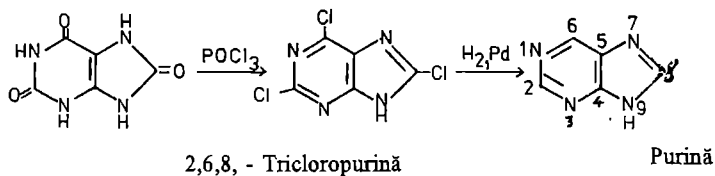


Reducerea amino-nitrozo-uracilului se poate realiza de asemenea cu ditionit de sodiu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ).

Acidul uric este o pudră cristalină albă, insolubilă în solvenți organici obișnuiți. Se comportă ca un acid slab.

## Purina

Tratând acidul uric cu  $\text{POCl}_3$  rezultă 2,6,8-tricloro-purina. Acest compus este un intermediar important în obținerea purinei și a derivaților purinici. Prin reducerea 2,6,8-tricloropurinei cu  $\text{H}_2$ -Pd rezultă purina (p.t.  $217^\circ\text{C}$ ):



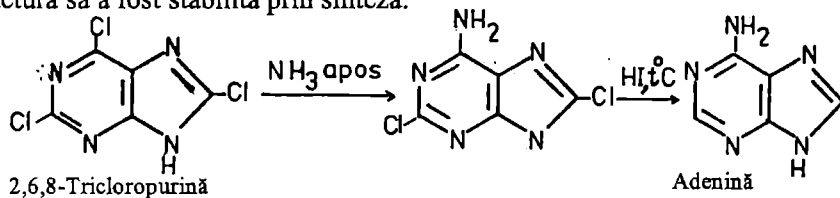
Purina se comportă ca o bază monoacidă slabă. Diazometanul sau dimetil sulfatul metilează purina în poziția 9.

### Derivați ai purinei

Cei mai importanți derivați ai purinei sunt compuși naturali: adenina (6-aminopurina), hipoxantina (6-hidroxi-purina), xantina (2,6-dihidroxi-purina) și guanina (2-amino-6-hidroxi-purina).

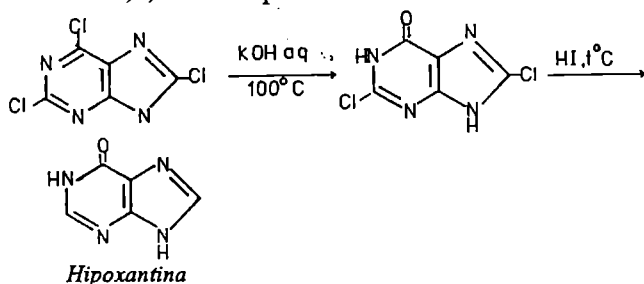
### Adenina

Adenina (6-aminopurina, p.t.  $365^\circ\text{C}$ , desc.) a fost găsită în pancreasul bovinelor și în extractul de ceai. Adenina este un produs de hidroliză al acizilor nucleici. Diferite reacții chimice au arătat că adenina este un derivat al purinei. Structura sa a fost stabilită prin sinteză:

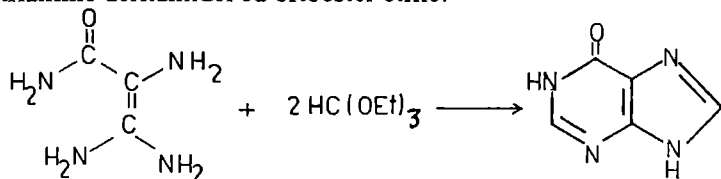


### Hipoxantina

Hipoxantina (6-hidroxi-purina, p.t.  $150^\circ\text{C}$ , desc.) a fost găsită în țesuturile animale și în extract de ceai. Structura hipoxantinei a rezultat din formarea sa prin acțiunea acidului azotos asupra adeninei precum și din sinteza sa. Hipoxantina a fost obținută din 2,6,8-tricloropurină:

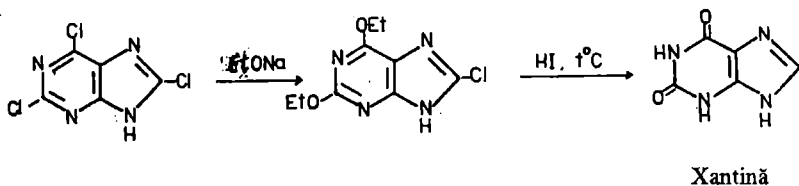


O sinteză utilă a hipoxantinei (și adeninei) constă în condensarea 2,3,3-triamino acrilamidei cu ortoester etilic:

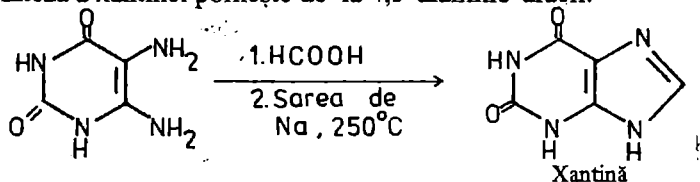


### Xantina

Xantina (2,6-dihidroxipurina, p.t. 150°C, desc.) a fost găsită în extract de ceai și în țesuturile animale. Oxidarea xantinei cu clorat de potasiu în HCl duce la aloxan și uree; rezultă din această reacție relația structurală a xantinei cu acidul uric; structura xantinei a fost confirmată prin sinteză:

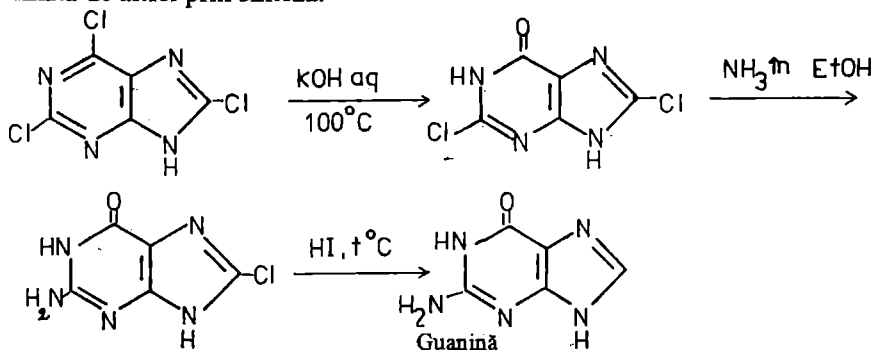


O sinteză a xantinei pornește de la 4,5-diamino-uracil:



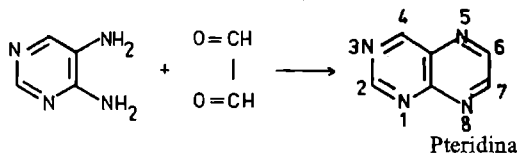
### Guanina

Guanina (2-amino-6-hidroxipurina; p.t. 360°C, desc.) a fost găsită în pancreas bovin, în zăcămintele de guano și în solzii anumitor pești. Prin tratarea guaninei cu acid azotos se obține xantina; rezultă de aici structura guaninei, confirmată de altfel prin sinteză:



### 1.6.4.5. Pteridina

Prin reacția dintre 4,5-diaminopirimidină și glixoal rezultă pteridină:

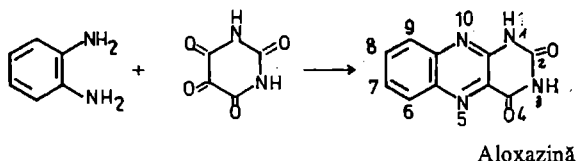


Pteridina este un compus solid, de culoare galbenă cu p.t. 139,5°C; este foarte solubilă în apă, greu solubilă în eter.

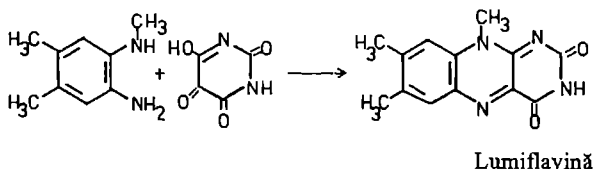
### 1.6.4.6. Cicluri aloxazinice și izoaloxazinice

Benzopteridina intră în constituția aloxazinei, lumicromului, etc. Acești compuși sunt importanți pentru că au jucat un rol în elucidarea structurii riboflavinei.

Aloxazina a fost sintetizată prin condensarea o-fenilendiaminei cu aloxan:



Riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) este o vitamină acvosolubilă, termostabilă (vezi acolo). Expunerea riboflavinei la lumină, în soluție de hidroxid de sodiu, formează îndeosebi lumiflavină, C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Lumiflavina este solubilă în cloroform. În constituția lumiflavinei (7,8,10-trimetil-izoaloxazină) intră izoaloxazina, o formă tautomeră a aloxazinei. Structura lumiflavinei a rezultat atât din reacții de degradare cât și din sinteza chimică (vezi FAD). Lumiflavina a fost obținută prin condensarea N-metil-4,5-diamino-o-xilenului cu aloxanul, în soluție apoasă la 50-60°C:



Metilarea lumiflavinei sintetice (cu sulfat de metil) dă un derivat tetrametil identic cu produsul obținut prin metilarea lumiflavinei naturale.

## 1.7. TERPENOIDELE

Majoritatea terpenoidelor au fost izolate din surse vegetale. Denumirea mai veche a terpenoidelor era terpene dar se tinde la înlocuirea acestei denumiri cu termenul mai general de terpenoide.

Terpenoidele cuprind atât hidrocarburi cât și derivați oxigenați ai acestora. În ultimul caz oxigenul intră în constituția unor grupări funcționale ca: alcoolii, aldehide, cetone, acizi. Scheletul hidrocarbonat al terpenoidelor este constituit din radicali izoprenici iar numărul  $n$  al acestor unități izoprenice constituie un criteriu structural de clasificare al terpenoidelor. Astfel există:

Denumirea	Formula moleculară	Valoarea lui $n$
Monoterpenoide	$C_{10}H_{16}$	2
Sesquiterpenoide	$C_{15}H_{24}$	3
Diterpenoide	$C_{20}H_{32}$	4
Sesterpenoide	$C_{25}H_{40}$	5
Triterpenoide	$C_{30}H_{48}$	6
Tetraterpenoide (Carotenoizi)	$C_{40}H_{64}$	8
Politerpenoide	$(C_5H_8)_n$	$n$

Sistemul de clasificare de mai sus constituie așa-zisa *regulă a izoprenului*.

Monoterpenoidele și sesquiterpenoidele sunt volatile pe când terpenoidele superioare se obțin din gumele și rășinile vegetale.

### 1.7.1. Metode generale de obținere ale terpenoidelor

Pentru izolarea terpenoidelor se folosesc în esență două tipuri de metode:

1. Metode fizice: extracția cu solvenți, distilarea cu vapori de apă, distilarea fracționată în vid, extracția cu grăsimi (enfleurage) etc.

2. Metode chimice: alcoolii se separă prin formarea unei combinații duble cu clorura de calciu; compuşii carbonilici se separă prin formarea combinațiilor bisulfite ușor cristalizabile etc.

Mai recent s-au utilizat la izolarea și caracterizarea terpenoidelor metodele cromatografice cu toate variantele lor, inclusiv gaz-cromatografia.

### 1.7.2. Monoterpenoidele

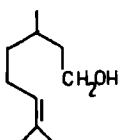
Monoterpenoidele sunt de trei tipuri:

- aciclice
- monociclice
- biciclice

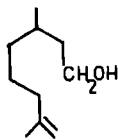
### 1.7.2.1. Monoterpenoidele aciclice

La terpene și terpenoide se întâlnește în mod frecvent izomeria legăturii duble de la capătul catenei (izomeria izopropilidenică și izopropenilică). În natură cei doi izomeri sunt găsiți întotdeauna în amestec.

Un alcool cu o legătură dublă, apărând în cele două forme izomere, este citronelolul, unul dintre principiile active ale uleiului de trandafir și geraniu; în cele două surse există forma levogiră.



Forma izopropilidenică

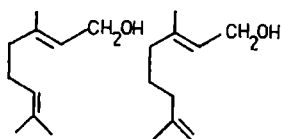


Forma izopropenilică

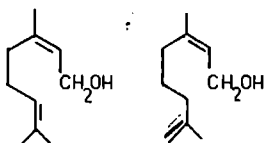
#### Citronelol

Oxidarea citronelolului cu ozon duce la acetonă și formaldehidă.

Alcooli izomeri, cu două legături duble, care apar în formele izopropilidenică și izopropenilică, sunt geraniolul, nerolul și linaloolul. Geraniolul este izomerul  $\Delta^6$  trans iar nerolul este cis:



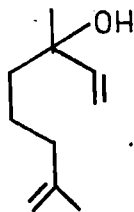
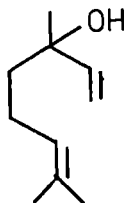
Geraniol



Nerol

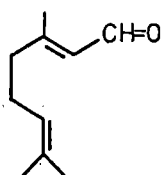
Ambii se găsesc în plante: geraniolul în flori de trandafir și mușcată iar nerolul în uleiul de neroli și bergamot.

Linaloolul, un alcool terțiar, se prezintă sub formă de izomeri optici: (-)-linalool există în uleiul de linalol, levănțică, trandafir, bergamot etc., iar (+)-linaloolul a fost găsit în uleiul de flori de portocal și coriandru.

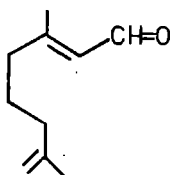


Linalool

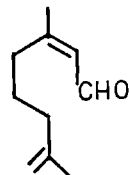
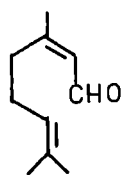
În cele două forme - izopropilidenică și izopropenilică - se găsesc și aldehydele izomere cis-trans, cu două legături duble, citralul și neralul:



Citral a (geranial)



Citral b (neral)

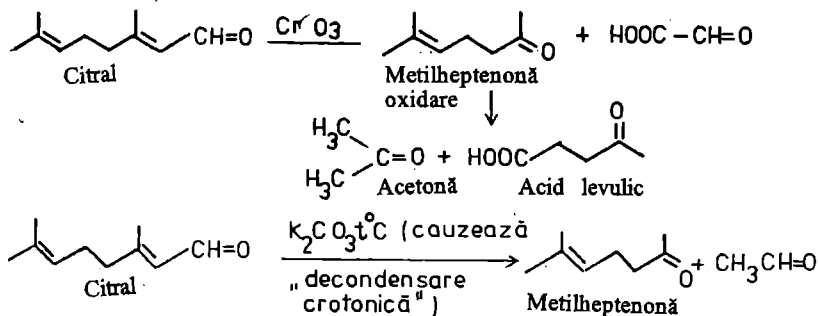


Citralul - componenta principală a uleiului de iarbă de lemon și de lămâie - este printre cele mai răspândite terpenoide aciclice. Pe cale sintetică se obțin citrali prin oxidarea geraniolului și nerolului.

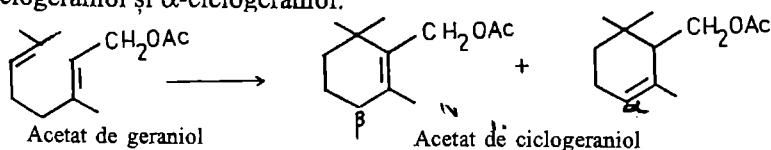
Structura terpenoidelor aciclice a fost determinată prin reacții de degradare și prin intertransformarea principalilor reprezentanți.

a. Geraniolul se obține din citral a, prin reducere cu amalgam de sodiu în soluție acetică, citralul a se formează din geraniol, prin oxidare. Ambele combinații au deci același schelet, iar legăturile duble se află în aceleași poziții; deosebite sunt numai grupele funcționale.

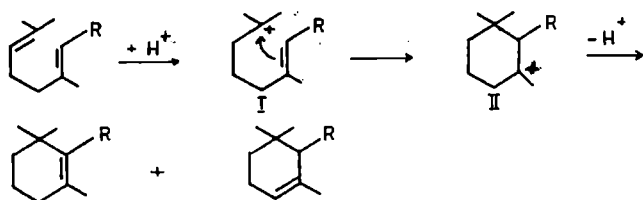
b. Citralul conține două legături duble, rezultat provenit din adăugarea bromului și determinarea refracției moleculare. Poziția legăturilor duble a fost stabilită prin oxidare cu acid cronic, care duce la metilheptenonă și, prin oxidarea mai departe a acesteia, la acid levulic:



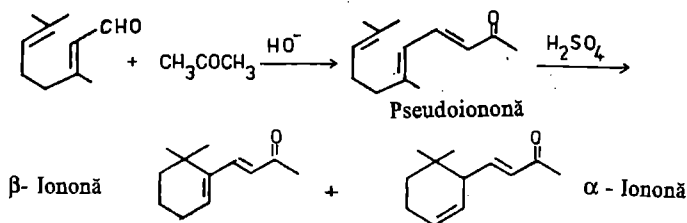
*Unele reacții caracteristice ale terpenoidelor aciclice.* O astfel de reacție este ciclizarea de tip ionic. Monoterpenoidele aciclice, de tipul geraniolului sau citralului, în cataliză acidă și cu grupa funcțională (alcool sau aldehydă) blocată, se ciclizează dând naștere la derivați ai gem-dimetilciclohexanului. Astfel, prin ciclizarea acetatului de geraniol ia naștere un amestec de β-ciclogeraniol și α-ciclogeraniol:



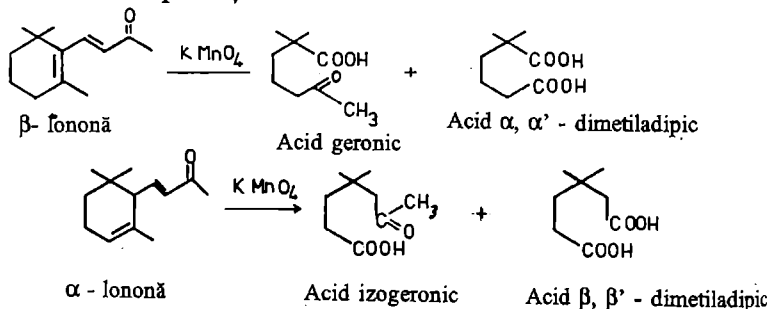
În această reacție de ciclizare de tip ionic se formează, ca intermediar, un carbocation terțiar (I) care alchilează intramolecular legătura învecinată spațial formând un alt carbocation terțiar care se stabilizează prin eliminarea unui proton de la unul din atomii de carbon vecini.



Prin tratarea citralului cu acetonă, în prezență de catalizatori bazici slabi ( $Ba(OH)_2$ ) se formează, printr-o reacție de condensare crotonică, pseudoionona. Pseudoionona se ciclizează, în cataliză acidă, ducând la  $\beta$ -iononă și  $\alpha$ -iononă:



Cele două ionone ( $\beta$ , p.f. 134/12 mm și  $\alpha$ , p.f. 127°C/12 mm) se utilizează la fabricarea parfumurilor.  $\beta$ -Ionona se găsește și în natură. Structura celor două ionone rezultă din analiza produșilor de oxidare:



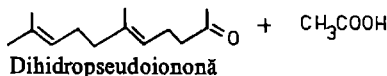
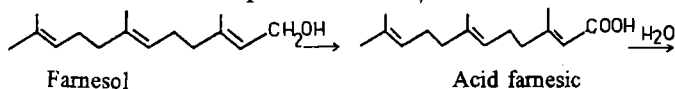
### 1.7.3. Sesquiterpenoidele

Sesquiterpenoidele sunt hidrocarburi cu formula  $C_{15}H_{24}$ , întâlnite frecvent în uleiurile eterice. Se prezintă ca uleiuri vâscoase cu p.f. 250-280°C. În natură se întâlnesc de asemenea alcoolii și cetone derivând de la aceste hidrocarburi.

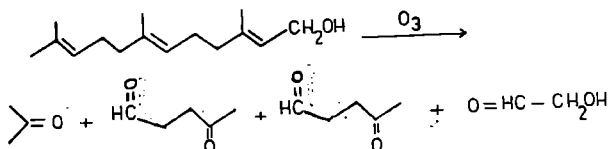
*Sesquiterpenoidele aciclice. Farnesolul.* Farnesolul, un alcool polenic cu formula moleculară  $C_{15}H_{26}O$  se găsește în uleiurile de flori (mărgăritărel, tei etc.).



Structura farnesolului a fost stabilită astfel: prin oxidare cu acid cromic farnesolul trece în aldehida respectivă, farnesal. Aceasta se transformă, prin intermediul oximei și nitrilului, în acidul respectiv. Acidul se desface, prin tratare cu alcalii tari în dihidropseudoiononă și acid acetic:



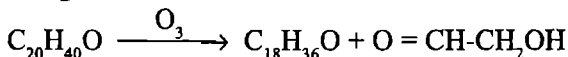
Locul legăturilor duble în farnesol a fost stabilit prin ozonizare; se obține acetona, levulin-aldehidă și glicol-aldehidă.



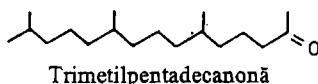
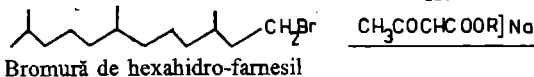
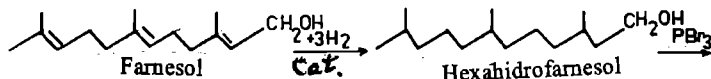
#### 1.7.4. Diterpenoidele

Diterpenii propriu-ziși au formula moleculară  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ . Se cunosc și alcoolii, fenoli, oxizi etc.

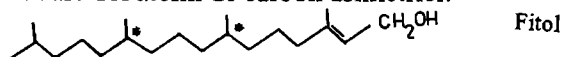
*Fitolul* este o componentă a clorofilei și deci apare în mari cantități în natură. Fitolul se prezintă, în stare pură, ca un ulei vâscos, slab dextrogir, distilabil în vid înaintat, cu proprietățile unui alcool nesaturat. Din formula moleculară,  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$  rezultă că fitolul conține o legătură dublă. Oxidarea cu ozon dă o cetonă saturată și aldehidă glicolică:



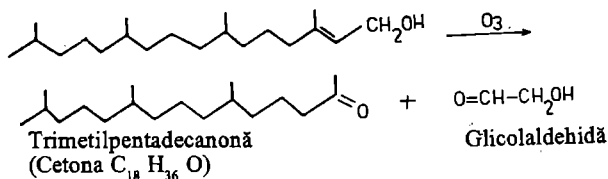
Dacă fitolul rezultă din împreunarea a patru resturi de izopren, cetona  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}$  ar trebui să fie hexahidrofarnesil-acetonă (trimetipentadecanonă). Această presupunere a fost verificată prin sinteză:



Fitolul are doi atomi de carbon asimetrici:



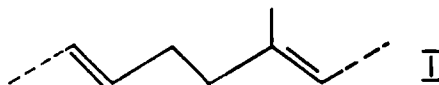
Ozonoliza fitolului decurge în felul următor:



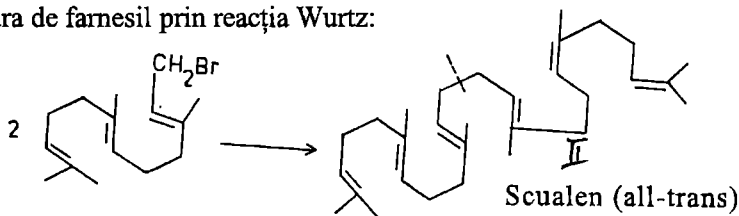
### 1.7.5. Triterpenoidele

*Scualenul* ( $C_{30}H_{50}$ , p.f. 240-242°C/4 mm) a fost inițial izolat din uleiul de ficat de rechin, apoi din ulei de măsline și din alte uleiuri vegetale; a fost detectat și în frunze.

Hydrogenarea catalitică transformă scualenul în perhidroscualen,  $C_{30}H_{62}$ ; prin urmare scualenul are șase legături duble și este aciclic. Ozonoliza scualenului dă, alături de alți produși, acid levulic; aceasta sugerează că în scualen este prezentă gruparea (I):

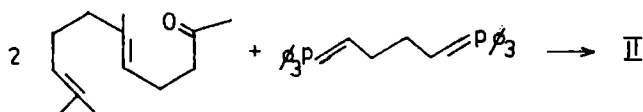


Faptul că scualenul nu poate fi redus cu sodiu și alcool amilic demonstrează că în molecula scualenului nu există legături duble conjugate. S-a găsit că perhidroscualenul este identic cu produsul obținut prin reacția Wurtz a bromurii de hexahidrofarnesil. Aceasta a dus la o metodă de sinteză a scualenului (II) de la bromura de farnesil prin reacția Wurtz:



De remarcat că molecula scualenului este formată din două fragmente identice iar în punctul de îmbinare a acestora se găsesc două unități izoprenice unite coadă la coadă (la fel se întâmplă la carotenoizi; vezi acolo). Scualenul formează un complex de incluziune cu tioureea, de unde s-a dedus că structura sa este total trans; analiza cu raze X a complexului de incluziune a confirmat acest lucru.

O sinteză cu randament superior a scualenului a decurs prin reacția Wittig: compusul de start a fost trans-geranilacetona:



## 1.7.6. Difenilpolienele - model structural pentru carotenoizi

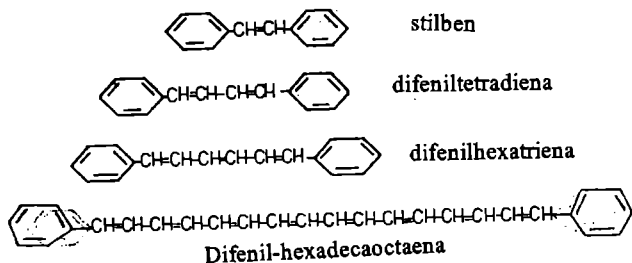
*Terminologie.* Se spune că un compus are o culoare mai închisă decât altul, când maximumul curbei sale de absorbție,  $\lambda_{\max}$ , este situat în spectru la o lungime de undă mai mare. Un compus are o culoare mai *intensă* decât altul când coeficientul de extincție, în punctul maxim al curbei sale de absorbție,  $\lambda_{\max}$ , este mai mare.

Când un substituent introdus într-o moleculă produce o închidere a culorii el are un efect *batocrom*; când produce o deschidere a culorii, are un efect *hipsocrom*; când intensifică culoarea are un efect *hipercrom*; iar atunci când o slăbește, un efect *hipocrom*. Dizolvanții pot, deasemenea, provoca un efect batocrom sau hipsocrom asupra benzilor din spectrul unei substanțe (solvatocromie). Sinonimi cu efect batocrom și efect hipsocrom sunt și termenii: deplasare spre roșu, deplasare spre violet.

Stabilirea de relații între culoarea și structura compușilor organici este o preocupare importantă a chimiei. După unii cercetători culoarea combinațiilor organice se datorește prezenței în molecula lor a anumitor grupe de atomi, numite *grupe cromofore* (de la chroma, culoare și phoros, purtător, în lb. greacă), ca de ex.  $-N=O$  și  $-N=N-$ . Odată cu constatarea că spectrele din UV sunt o prelungire a celor din vizibil și că ambele sunt datorate aceluiași cauze, termenul de cromofor a fost extins la orice grupă de atomi ce absoarbe lumină în aceste regiuni ale spectrului.

Legăturile duble izolate nu dau benzi puternice dar când sunt prezente sisteme conjugate benzile sunt de obicei puternice și în regiunea cu lungimea de undă mai lungă. Astfel o aplicație importantă a spectroscopiei în UV și vizibil este detectarea și elucidarea naturii sistemelor conjugate inclusiv aromaticele. Aceasta este realizată adesea prin folosirea moleculelor „model”, adică o moleculă „simplă” care diferă de compusul investigat într-un fel care să n-aibă nici un efect asupra cromoforului.

Sistemul de cromofori precum și structura carotenoizilor au fost clarificate prin studiul difenilpolienelor. Difenilpolienele sunt sisteme chimice conjugate de lungime variabilă. Cel mai simplu reprezentant al seriei, stilbenul, conține o legătură dublă alifatică; difenilhexadecaoctaena, cu masa moleculară cea mai ridicată, conține opt legături duble în catena alifatică:



S-a constatat că odată cu mărirea numărului de legături duble culoarea se intensifică; totodată culoarea se deplasează spre roșu (Tabel 1.15).

Tabelul 1.15.

Dependența culorii difenilpolienelor de numărul de legături duble

Difenilpoliena	Număr de legături duble	Culoare
Stilben	1	incolor
Difenilhexatrienă	3	galben-deschis
Difeniloctatetraenă	4	galben de crom
Difenildodecahexaenă	6	brun-oranj
Difenilhexadecaocetaenă	8	roșu-închis

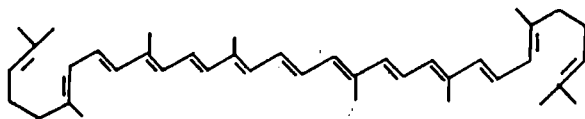
Remarcabilă este și stabilitatea deosebită a acestor hidrocarburi sintetice. S-a sesizat totodată asemănarea difenilpolienelor cu carotenoizii. Indată după constatarea - prin hidrogenare cantitativă - gradului avansat de nesaturare al carotenoizilor s-a presupus că legăturile duble în acești compuși sunt conjugate. Și în cadrul carotenoizilor se adeverește concluzia - izvorâtă din studiul difenilpolienelor - că numărul de legături duble influențează culoarea (vezi acolo).

Succesul experimentelor de mai sus l-a constituit concluzia, surprinzătoare pentru momentul respectiv, că *un sistem cromofor poate fi constituit exclusiv din carbon și hidrogen*.

### 1.7.7. Tetraterpenoidele (Carotenoizii)

Tetraterpenoidele se împart în: (a) hidrocarburi carotenoidice; (b) derivați oxigenați ai acestora: alcooli, epoxizi, oxizi furanoidici și cetone; (c) acizi carboxilici conținând în moleculă mai puțin decât 40 atomi de carbon.

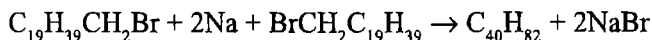
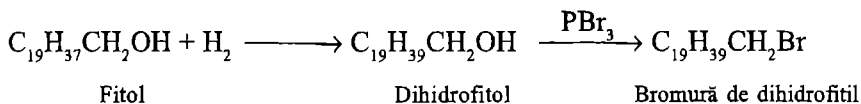
**Hidrocarburi carotenoidice. Licopina.** Licopina este colorantul roșiei (*Solanum lycopersicum*). A fost izolată sub formă cristalizată (p. t. 175°C) având formula  $C_{40}H_{56}$ . Hidrogenarea cantitativă a lycopinei a dus la determinarea



Licopină

numărului de legături duble; acestea sunt în număr de 13 și se găsesc în cea mai mare parte în stare conjugată. Prin hidrogenare totală se obține perhidrolicopina cu formula moleculară  $C_{40}H_{82}$  care, conform raportului dintre numărul de atomi de carbon și numărul de atomi de hidrogen, duce la concluzia că aceasta este o

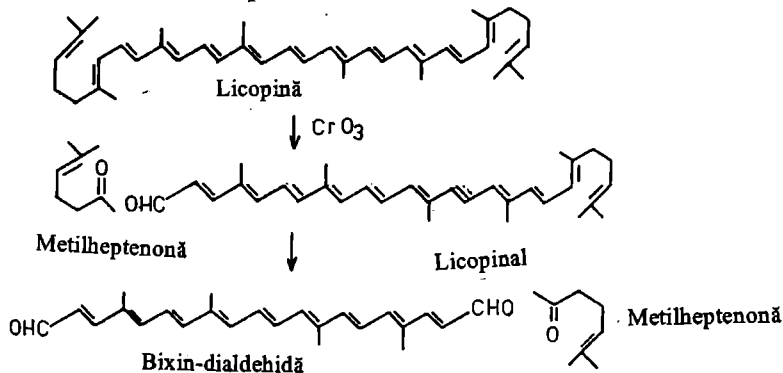
hidrocarbura aciclică de tip parafină. De altfel, perhidrolicopina a fost sintetizată din dihidrofitol prin tratarea acestuia cu  $\text{PBr}_3$  urmată de reacția Würtz:



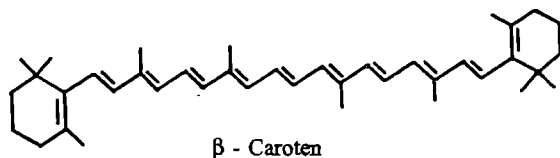
Prin urmare, molecula lycopinei este alcătuită din două fragmente identice, simetrice; fiecare astfel de jumătate este formată din patru resturi izoprenice legate cap la coadă; prin urmare, în mijlocul moleculei se inversează modul de legare al resturilor izoprenoidice - principiu constructiv larg răspândit la carotenoide și bine explicat astăzi prin schema biosintezei acestor compuși.

Prin ozonoliza menajată a lycopinei rezultă doi moli de acetonă per mol de lycopină, ceea ce indică prezența a două grupări marginale  $\text{Me}_2\text{C}=\text{C}$ . Totodată, se obține acid succinic, ceea ce indică prezența fragmentului  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}$ .

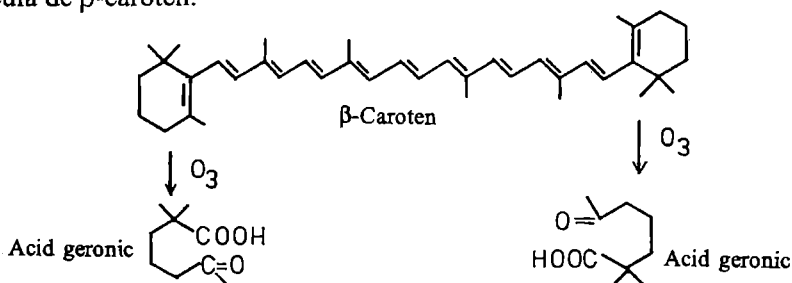
Oxidarea lycopinei cu acid cromic duce la lycopinal și metilheptenonă, ultimul compus fiind recunoscut drept produs de oxidare al terpenoidelor aciclice. Prin oxidare mai avansată a lycopinalului rezultă bixin-aldehidă:



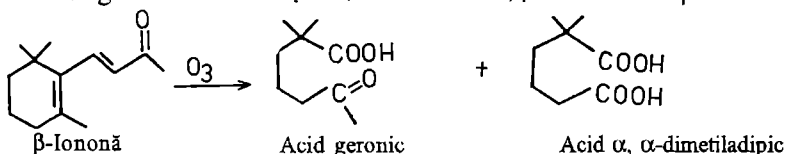
*Carotenul* are aceeași formulă moleculară ca lycopina  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ . Prin hidrogenare rezultă perhidrocarotenul cu formula  $\text{C}_{40}\text{H}_{78}$ . Diferența de patru atomi de hidrogen, față de hidrocarbura aciclică corespunzătoare poate fi explicată prin existența a două cicluri în molecula carotenului.



Oxidarea cu ozon a  $\beta$ -carotenului a dus la acid geronic, două molecule per moleculă de  $\beta$ -caroten:

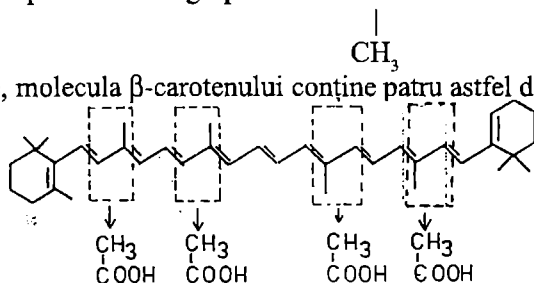


Acidul geronic a fost obținut, de asemenea, prin oxidarea  $\beta$ -iononei:



Oxidarea  $\beta$ -carotenului cu permanganat în soluție alcalină duce la scindarea cantitativă a moleculei  $\beta$ -carotenului în patru molecule de acid acetic. Acidul acetic se formează prin oxidarea grupării = CH-C =

Prin urmare, molecula  $\beta$ -carotenului conține patru astfel de grupări:



Prin oxidarea carotenoizilor cu permanganat de potasiu sau cu acid cronic s-au putut obține, și caracteriza, fragmente mai mari din molecula acestora. Metoda a permis totodată intertransformarea diferiților caroteni și stabilirea unor relații structurale ale acestora. Și în cadrul carotenoizilor s-a adeverit concluzia - izvorâtă din studiul difenilpolienelor - că numărul de legături duble influențează culoarea. Tabelul 1.16, care rezumă o comparație între caroten și licopină, ilustrează aceasta.

Tabelul 1.16.

Comparație între licopină și caroten

Caracteristica	Caroten	Licopină
Formula	$C_{40}H_{56}$	$C_{40}H_{56}$
Legături duble	11	13
Maxim de absorbție	483 nm	506 nm
Culoarea	roșu-oranj	roșu-intens

## CAPITOLUL 2

### MOLECULE MONOMERE

Molesulele monomere sunt unități structurale care formează, prin condensare sau agregare, structuri macromoleculare sau supramoleculare. Cele mai cunoscute molecule monomere sunt:

- monozaharidele
- aminoacizii
- lipidele
- glicolipidele
- nucleotidele

#### 2.1. HIDRAȚII DE CARBON (GLUCIDELE)

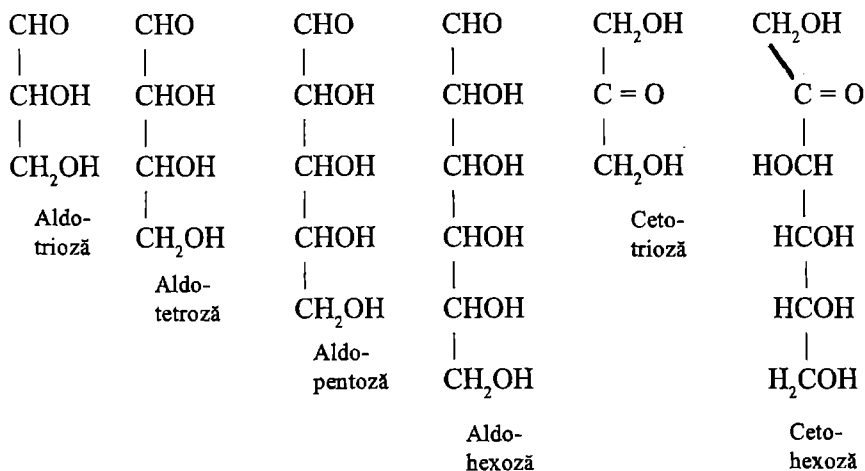
Hidrații de carbon sunt polihidroxi-aldehide sau polihidroxi-cetone, de regulă, optic active. Denumirea de hidrați de carbon, sau carbohidrați, a acestor substanțe provine din aceea că majoritatea lor au formula generală  $C_x(H_2O)_y$ , conținând deci hidrogen și oxigen în aceeași proporție ca apa. Cu toate acestea, au fost găsiți un număr de compuși care sunt carbohidrați în privința comportării fizico-chimice, dar nu concordă cu formula de mai sus, de ex. 2-deoxiriboza,  $C_5H_{10}O_4$  sau L-fucoza,  $C_6H_{12}O_5$ . Pe de altă parte, nu toți compușii cu formula generală  $C_x(H_2O)_y$  sunt carbohidrați. De ex. formaldehida,  $CH_2O$ , sau acidul acetic,  $C_2(H_2O)_2$  etc.

Hidrații de carbon se împart în: A. Monozaharide. B. Oligozaharide. C. Polizaharide. Această împărțire se bazează pe comportarea hidraților de carbon la hidroliză: monozaharidele nu sunt hidrolizate, oligozaharidele dau la hidroliză 2-10 monoglucide per moleculă de oligozaharid, iar polizaharidele un număr mult mai mare. Hidrații de carbon se mai numesc și glucide.

##### 2.1.1. Monozaharidele

Denumirile monozaharidelor se termină în oză; carbohidrații conținând gruparea aldehidică sunt cunoscuți ca aldoze, iar cei cu grupare cetonă, cetoze.

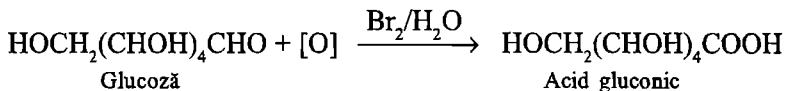
Monozaharidele se împart, după numărul atomilor de carbon din molecula lor; acest număr este indicat de un prefix în limba greacă: trioze (cu trei atomi de carbon), tetroze (cu patru atomi de carbon) etc., inclusiv decoze (cu 10 atomi de carbon). Monozaharidele sunt substanțe cristalizate cu gust dulce și solubilitate pronunțată în apă. Iată câteva exemple de monozaharide, aldoze și cetoze:



### 2.1.1.1. Reacții privind interrelația structurală a monozaharidelor

1. *Reacții de oxidare.* Natura chimică a produsului format prin oxidarea aldozei depinde de agentul de oxidare utilizat.

1.1. *Oxidarea menajată* a monozaharidelor constă în oxidarea exclusivă a grupării aldehidice la grupare carboxil; rezultă în acest fel acizi aldonic. Astfel, glucoza dă acid gluconic, p. t. 131°C:

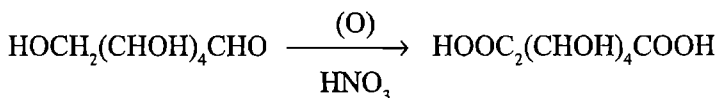


Oxidarea menajată a monozaharidelor cunoaște trei modalități: (a) Oxidarea chimică se realizează cu apă de brom sau cu o soluție alcalină de iod sau cu oxid mercuric în prezența carbonatului de calciu; în ultimul caz, acidul aldonic se obține ca sare de calciu; (b) Oxidarea electrolică pare să fie metoda cea mai avantajoasă; aceasta constă în electroliza unei soluții de aldooză în prezența bromurii de calciu și a carbonatului de calciu; (c) Oxidarea glucozei cu glucozo-oxidază; enzima este prezentă în: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* etc.

Denumirea acizilor aldonic se face adăugând la terminația -onic numele aldozei parentale; de ex. acid galactonic, acid arabonic etc.

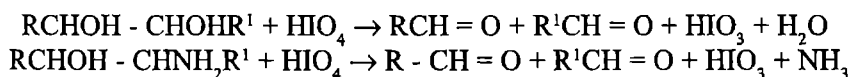


1.2. *Oxidarea energetică* a aldozelor se realizează cu oxidanți puternici, cum ar fi acidul azotic. În condiții adecvate rezultă din această oxidare acizi  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxilici cunoscuți ca acizi zaharici sau aldarici. Denumirea acestor acizi se face indicând aldoza parentală printr-un prefix, de ex. acid manozaharic sau manaric, acid ribozaharic sau ribaric etc. De ex. glucoza dă acid glucozaharic (numit încă și acid zaharic sau acid glucaric):



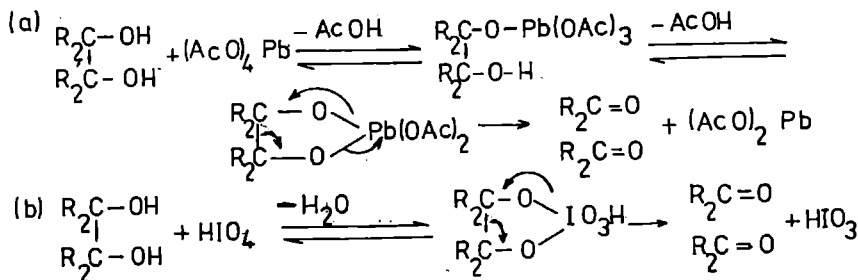
Acizii aldarici formează ușor monolactone, dar în anumite cazuri a fost observată și formarea dilactonelor.

1.3. *Reacția Malaprade*. Acidul periodic sau tetraacetatul de plumb au o acțiune oxidantă selectivă asupra compușilor ce posedă două grupări hidroxil, sau o grupare hidroxil și o grupare amino, atașată la atomi de carbon adiacenți; acțiunea oxidantă se concretizează în clivarea legăturii carbon-carbon (*reacția Malaprade*):



Oxidarea nu are loc dacă cele două grupări nu se găsesc pe atomi de carbon adiacenți.

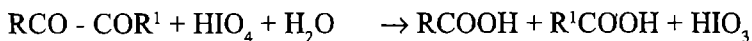
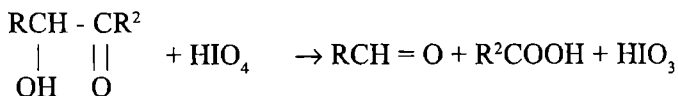
Oxidarea *cis*-1,2-glicolilor are loc cu o viteză mai mare decât oxidarea izomerilor *trans* corespunzători; aceasta denotă formarea intermediarilor ciclici:



Faptul că izomerii *trans* sunt totuși oxidați sugerează că reacția decurge, în acest caz, printr-un intermediar neciclic a acestor compuși. Acesta ar putea fi esterul neciclic format în prima etapă.

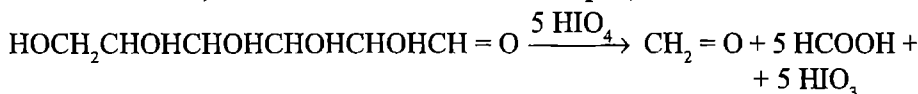
Aceste oxidări sunt supuse împiedicării sterice, de ex. glicolul este oxidat mai rapid decât pinacolul (2,3-dihidroxi-2,3-dimetil-butan). S-a dedus de aici că etapa determinantă de viteză la oxidarea glicolului este scindarea complexului, pe când la oxidarea pinacolului este formarea complexului.

Compușii carbonilici în care gruparea carbonil este situată adiacent față de o grupare hidroxil, sau față de o altă grupare carbonil, sunt de asemenea oxidați, de ex.  $\alpha$ -hidroxi-aldehidele,  $\alpha$ -hidroxicetonele, 1,2-dicetonele și  $\alpha$ -hidroxiacizii:



Oxidarea are loc, probabil, prin intermediul formei hidratate a grupării carbonilice ( $=\text{CH}(\text{OH})_2$ ). Viteza de oxidare scade în ordinea: 1,2-glicoli >  $\alpha$ -hidroxi-aldehide >  $\alpha$ -hidroxi cetone >  $\alpha$ -hidroxi-acizi.

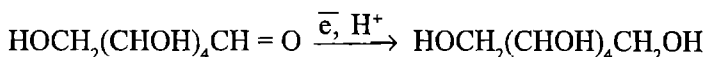
Prin urmare, un monozaharid este clivat complet, de ex. o aldohexoză:



În toate aceste reacții se consumă o moleculă de acid periodic pentru o pereche de grupări hidroxil (sau grupări oxo). Deci, prin determinarea acidului periodic consumat, sau a numărului de molecule de acid formic și formaldehidă care au luat naștere, se poate calcula numărul de grupări hidroxil alăturate din molecula studiată.

2. *Reacții de reducere ale monozaharidelor.* Întocmai ca în cazul oxidării, produsul de reducere depinde de natura reactivului.

2.1. O serie de reactivi ca: amalgamul de sodiu, borohidruza de sodiu, hidrogenarea catalitică la presiune înaltă în prezența nichelului, duc la polioli corespunzători. De ex. glucoza este transformată în sorbitol:

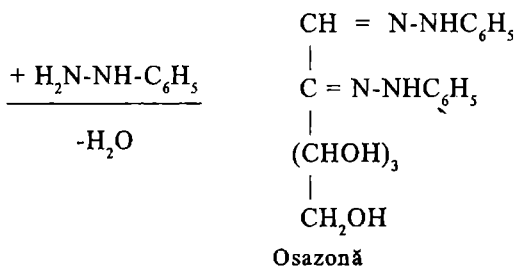
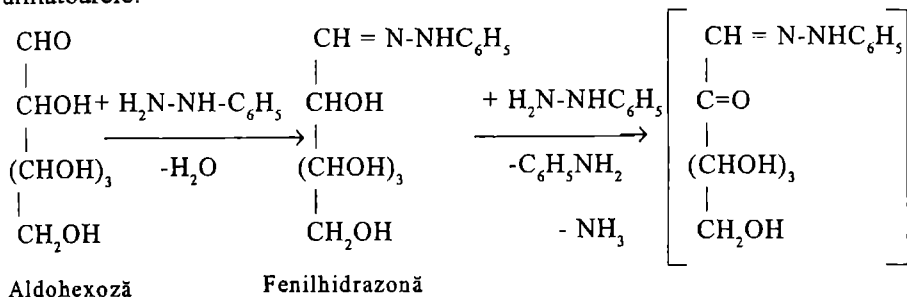


Reducerea electrolică a aldozelor are același rezultat.

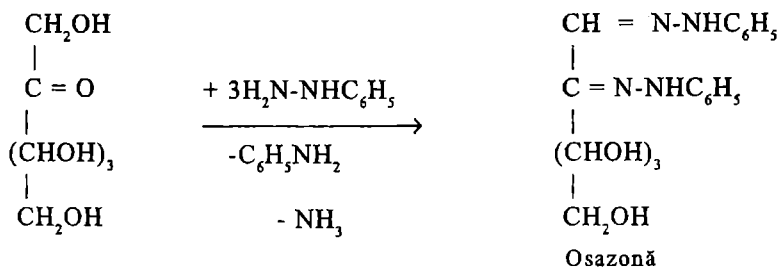
2.2. Reducerea glucozei cu acid iodhidric concentrat și fosfor roșu la 100°C este o reducere energetică. Produsul de reacție este în prima fază 2-iod-hexanul; încălzirea prelungită produce în final n-hexan.

3. *Reacțiile aldozelor și cetozele cu fenilhidrazina.* E. Fischer a arătat că atât aldazele, cât și cetozele reacționează cu fenilhidrazina

în exces pentru a forma osazone. Reacțiile succesive sunt următoarele:



Reacția globală este următoarea:

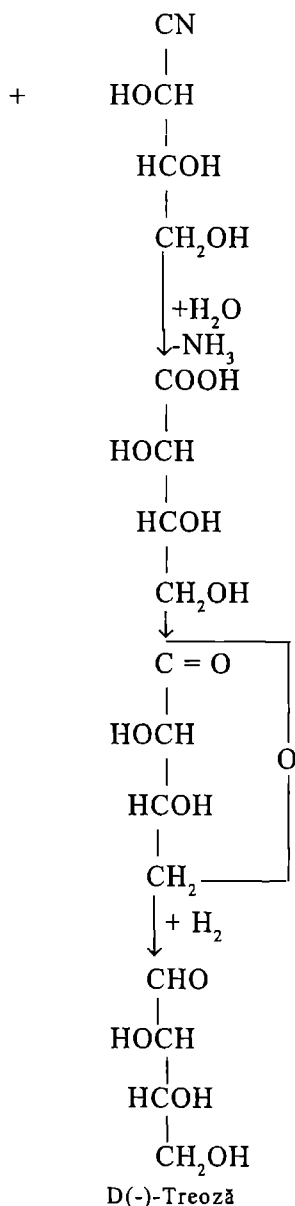
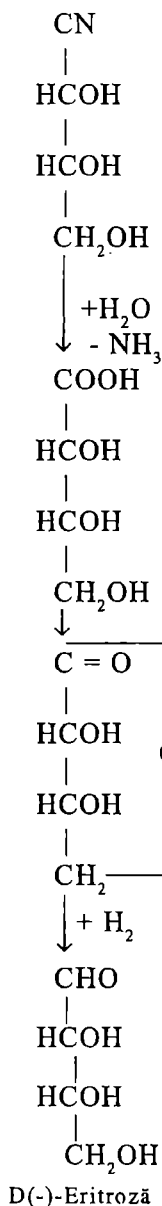
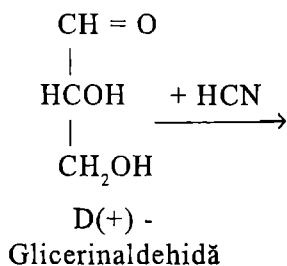


(În reacțiile de mai sus s-a reprezentat, în mod tacit, gruparea ceto în poziția 2; vezi dovada la structura fructozei).

Osazonele sunt compuși solizi, cristalizați, de culoare galbenă utilizați pentru a caracteriza monoglucidele. Astfel, monoglucidele care produc aceeași osazonă au identică configurația tuturor atomilor de carbon asimetrici, cu excepția atomului de carbon unu sau doi; diferența poate fi de configurație sau de grupare funcțională (aldehidică sau cetonică).

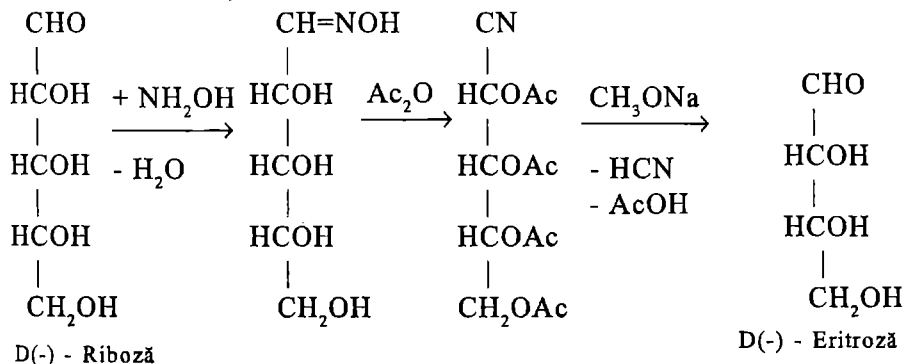
4. *Metode de alungire a catenei glucidelor.* O aldoză poate fi convertită în aldoza ei superioară, de ex. o aldopentoză în aldohexoză, prin reacția Kiliani. Metoda constă în tratarea aldozei cu acid cianhidric; rezultă două cianhidrine diastereoizomere care prin hidroliză dau doi acizi diastereoizomeri (sub formă de lactone). După separarea lactonelor acestea sunt reduse cu borohidru de

sodiu sau hidrură de litiu și aluminiu la aldozele corespunzătoare; rezultă două aldoze epimere: prin tratare cu fenilhidrazină în exces, cele două aldoze dau aceeași osazonă. Prin reacția Kiliani s-au obținut aldonoze, și chiar aldodecoze, pornind de la aldotrioze. De ex. pornind de la D(+)-gliceraldehidă se obțin D-eritroză și D-treoză:

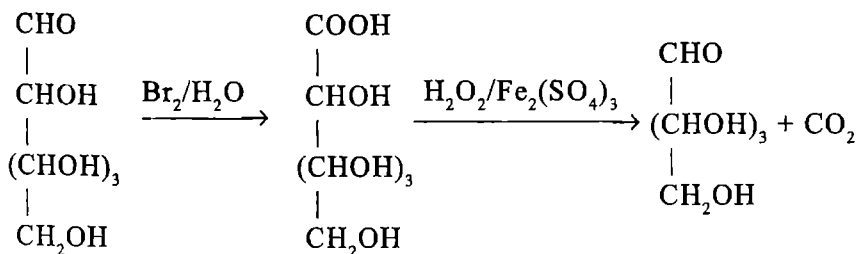


*Metode de scurtare a catenei glucidelor.* Există numeroase metode de transformare a unui glucid în glucidul inferior. Toate aceste metode pornesc de la aldoză și deci, pentru a le aplica la cetoze, acestea trebuie mai întâi transformate în aldoza cu același număr de atomi de carbon (vezi mai jos).

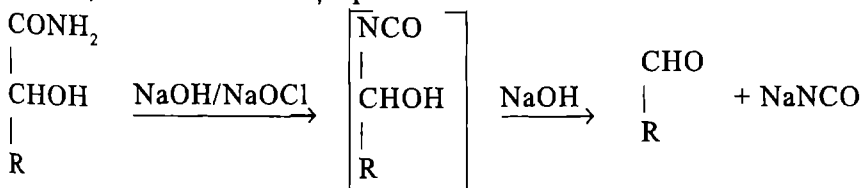
*Metoda Wohl* (modificată de Zemplén) începe cu prepararea oximei aldozei. Aceasta, prin tratare cu anhidridă acetică, este acetilată, iar gruparea oximă este transformată în grupare nitril. Metoxidul de sodiu provoacă, concomitent cu deacetilarea, eliminarea acidului cianhidric ducând la aldoza inferioară. De ex. de la D-riboză se obține D-eritroză:



*Metoda Ruff* (modificată de Berezovski): aldoza este oxidată cu apă de brom la acidul aldonic corespunzător. Acesta, sub formă de sare de calciu, este oxidat cu peroxid de hidrogen în prezență de sulfat feric pentru a da aldoza conținând un atom de carbon mai puțin; din hexoze se obțin pentoze:



*Metoda Weerman.* În cadrul acestei metode aldoza, sub formă de  $\alpha$ -hidroxi-amidă, este supusă degradării Hofmann ducând, în condiții adecvate, la aldoza inferioară; de la hexoze se obțin pentoze:



### 2.1.1.2. Structura glucozei

Elucidarea structurii glucozei vizează trei aspecte:

- A. Formula moleculară a glucozei.
- B. Configurația atomilor de carbon asimetrici.
- C. Structura ciclică.

Cum este și firesc, elucidarea structurii glucozei se face în corelație, pe de o parte, cu alți compuși organici, și, pe de altă parte, cu termenii inferiori și superiori ai seriei glucidelor.

A. Formula moleculară a glucozei,  $C_6H_{12}O_6$ , a rezultat din următoarele rezultate experimentale:

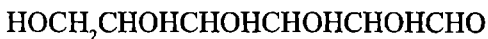
(i) Analiza și determinările de masă moleculară arată că formula moleculară a glucozei (și a izomerilor ei aldohexoze) este  $C_6H_{12}O_6$ .

(ii) Când este tratată cu anhidridă acetică, glucoza formează un pentaacetat. Acesta indică prezența a cinci grupări hidroxil.

(iii) Glucoza formează o oximă când este tratată cu hidroxilamină, prin urmare conține o grupare carbonil.

(iv) Când glucoza este oxidată cu apă de brom, rezultă un pentahidroxiacid, acidul gluconic, cu formula  $C_6H_{12}O_7$ . Aceasta indică faptul că gruparea carbonilică este prezentă ca grupare aldehidică.

(v) Când este redusă cu acid iodhidric concentrat și fosfor roșu la  $100^\circ C$ , glucoza dă un amestec de 2-iod-hexan și n-hexan. Rezultă de aici că cei șase atomi de carbon ai glucozei se găsesc într-o catenă liniară. Această concluzie se sprijină și pe reacția de alungire a catenei prin reacția Kiliani (vezi acolo) și reducând produsul, un polihidroxiacid, cu acid iodhidric; rezultă acid n-heptanoic. Reacțiile de mai sus arată că structura glucozei și a aldozelor izomere este:

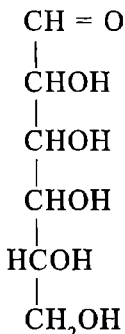


Aceasta conține patru atomi de carbon asimetrici și prin urmare pot exista 16 forme optice active. Toate sunt cunoscute și corespund formelor D- și L- ale glucozei, manozei, galactozei, allozei, altrozei, gulozei, idozei și talozei (vezi mai departe punctul B).

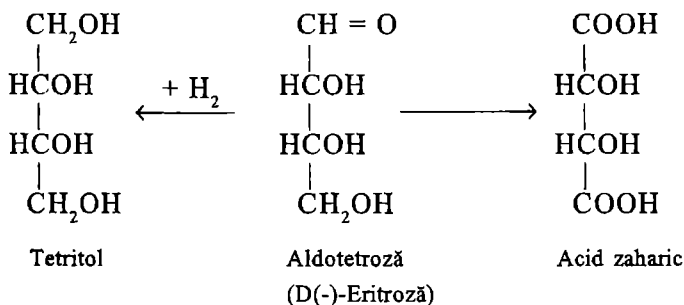
B. *Configurația atomilor de carbon asimetrici.* Glucoza naturală este dextrogiră, de unde și numele ei de dextroză.

(a) Prin reacții repetate de scurtare a catenei glucozei rezultă la un moment dat o aldotrioză care este D(+)-gliceraldehida. Prin urmare configurația atomului de carbon asimetric al glucozei cel mai depărtat de gruparea carbonil este identică cu configurația atomului de carbon asimetric din D(+)-gliceraldehidă (vezi Izomeria optică). Deci glucoza naturală aparține seriei sterice D, este

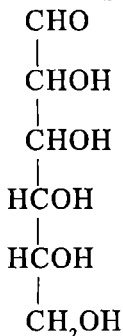
D(+)-glucoză. În reprezentarea plană gruparea hidroxil a atomului de carbon mai sus-menționat este plasată în dreapta catenei hidrocarbonate când aceasta este scrisă vertical, cu gruparea carbonil în sus:



(b) Scurtând catena glucozei până la aldotetroză se constată că aceasta are următoarele proprietăți: prin reducere rezultă un tetritol lipsit de activitate optică; prin oxidare cu acid azotic rezultă un acid zaharic de asemenea lipsit de activitate optică:

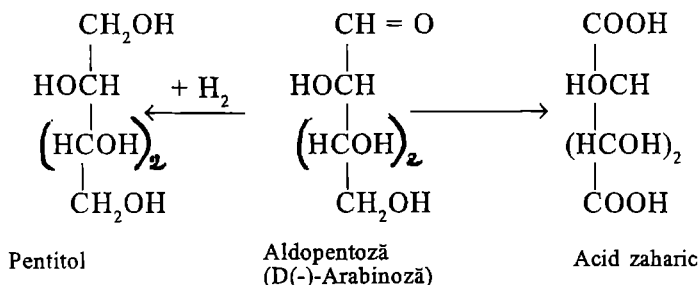


Aceste rezultate se pot explica dacă admitem că atomul de carbon patru al D(+)-glucozei are aceeași configurație ca atomul de carbon cinci, prin urmare este plasat de aceeași parte în reprezentarea plană:

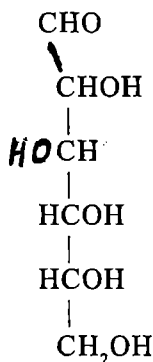


O altă concluzie în această etapă este că tetroza în cauză este D-eritroza.

(c) Aldopentoza obținută din D(+)-glucoză prin scurtarea catenei dă prin reducere un pentitol optic activ. Acidul zaharic obținut prin oxidarea energetică este deasemenea optic activ:



Acest rezultat se poate explica admitând că configurația atomului de carbon asimetric C-3 al D(+)-glucozei are configurația L(-)-gliceraldehidei. Prin urmare, în reprezentarea plană gruparea hidroxil a acestui atom de carbon se găsește de partea opusă grupărilor hidroxil de la carbonii patru și cinci ai D(+)-glucozei:



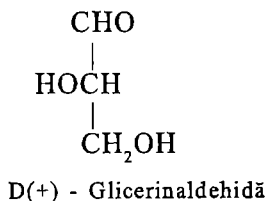
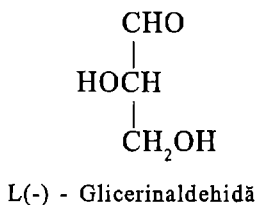
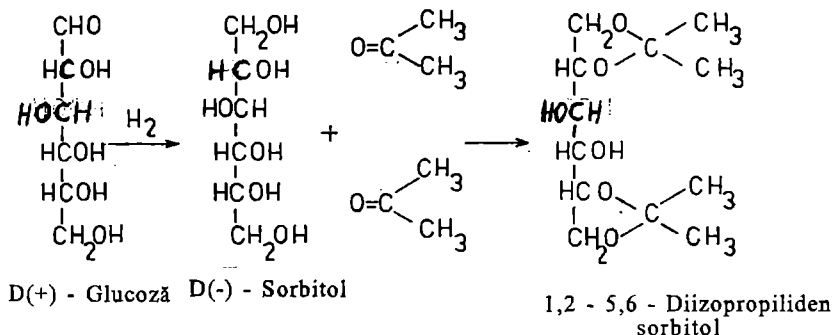
Aldopentoza este D-arabinoza.

(d) Hexitolul (D-sorbitol) rezultat prin reducerea D(+)-glucozei este optic activ; acidul zaharic rezultat prin oxidarea D(+)-glucozei cu acid azotic este deasemenea optic activ. În contextul configurațiilor atomilor de carbon trei, patru și cinci ai glucozei acest rezultat nu mai depinde de configurația atomului doi. Prin urmare fie că atomul de carbon asimetric doi al D(+)-glucozei ar



avea configurația D(+)-gliceraldehidei fie că ar avea configurația L(-)-gliceraldehidei asimetria hexitolului și respectiv a acidului zaharic este evidentă. (Atomul de carbon asimetric doi are configurația L(-)-gliceraldehidei în manoză, vezi mai jos).

Configurația atomului de carbon doi a D(+)-glucozei a fost stabilită în felul următor. Reducerea glucozei, cu hidrogen în prezență de nichel, duce la hexitolul corespunzător (D-sorbitol). Acesta, prin reacție cu acetona în mediu acid, dă 1,2-5,6-diizopropiliden hexitol; oxidarea ultimului compus cu periodat de sodiu, urmată de îndepărtarea grupărilor protectoare prin hidroliză acidă, duce la un produs optic inactiv. Reacțiile sunt următoarele:

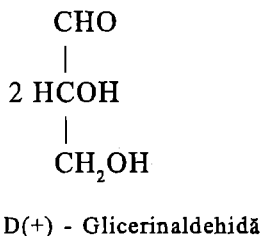
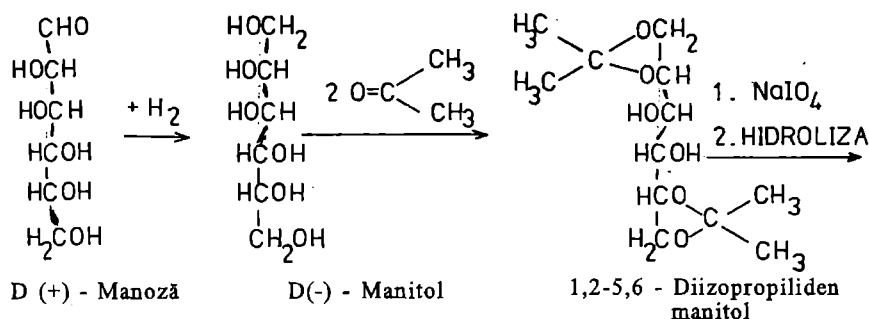


Lipsa de activitate optică a produsului final denotă că atomul de carbon doi al D(+)-glucozei are configurația D(+)-gliceraldehidei. Prin urmare, în reprezentarea plană, gruparea hidroxil se va găsi în partea dreaptă a catenei

hidrocarbonate. Din glucoză rezultă, în aceste condiții, un mol de D(+)-gliceraldehidă și un mol de L(-)-gliceraldehidă în raport molar 1:1, deci un racemic.

Dacă admitem că atomul de carbon asimetric doi are configurația L(-)-gliceraldehidei, cum este cazul D(+)-manozei (un glucid epimer al glucozei) rezultă, conform reacțiilor de mai sus, un produs optic activ:

Aceasta deoarece rezultă în final doi moli de D(+)-gliceraldehidă.



Utilizarea unui sistem de reacții chimice - cum ar fi alungirea catenei, scurtarea catenei, reacțiile de oxidare etc. - au dus la stabilirea unor interrelații structurale dintre glucidele configurațional înrudite (Fig. 2.1.).

### 2.1.1.3. Structura fructozei

Gruparea carbonilică a fructozei nu prezintă caracter reducător, prin urmare este o grupare ceto. Există mai multe argumente care susțin plasarea grupării ceto la atomul de carbon C-2 al fructozei.

(i) Obținerea de la fructoză a acidului 2-metil hexanoic.

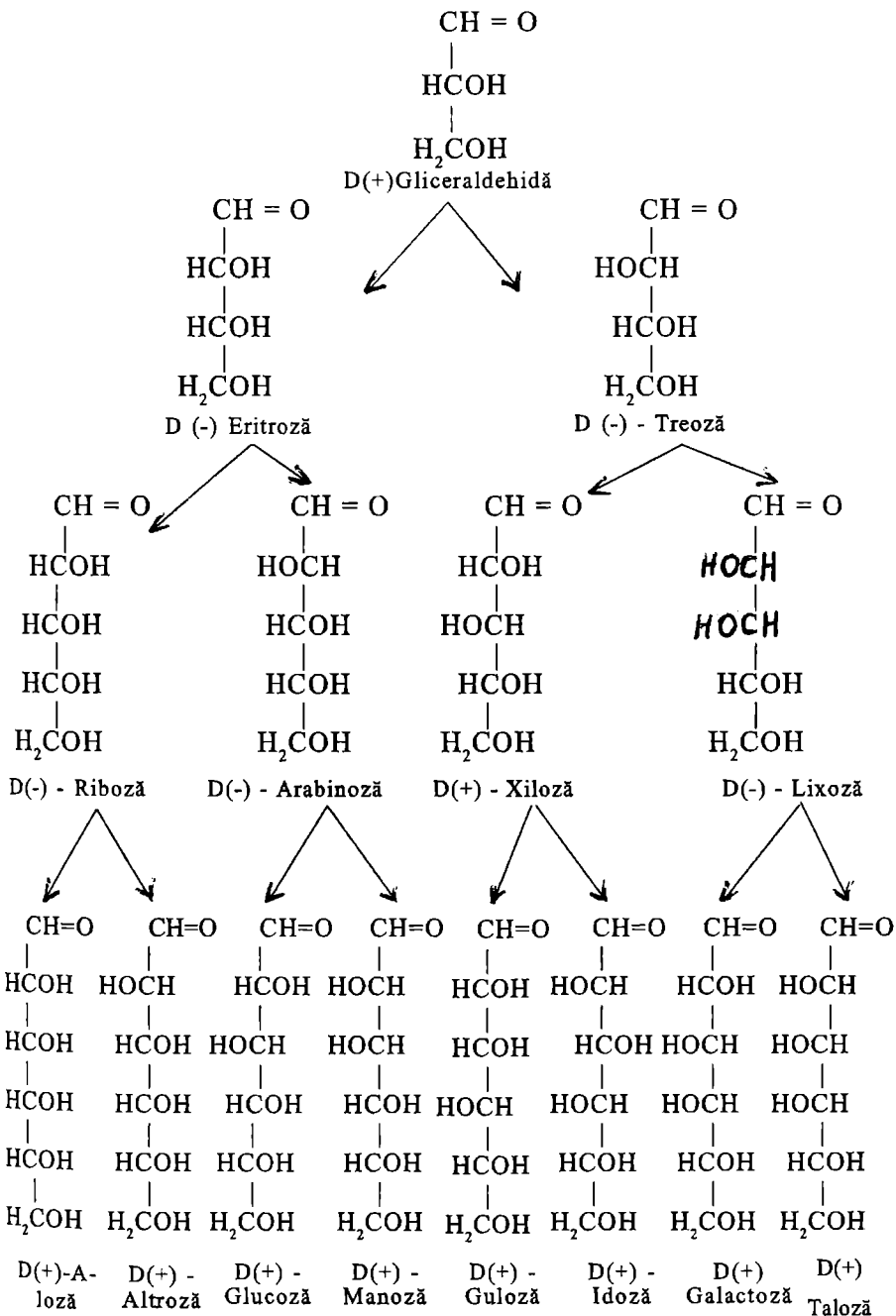
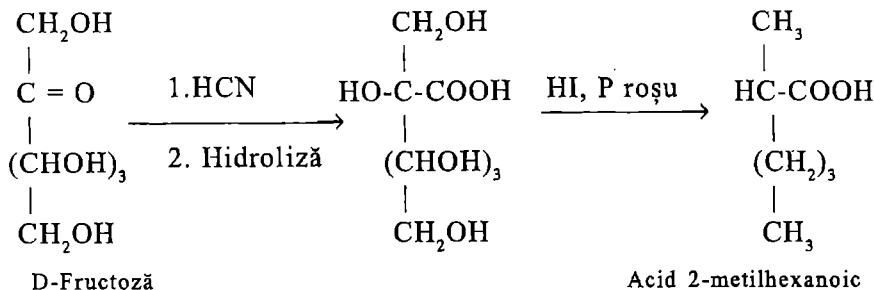
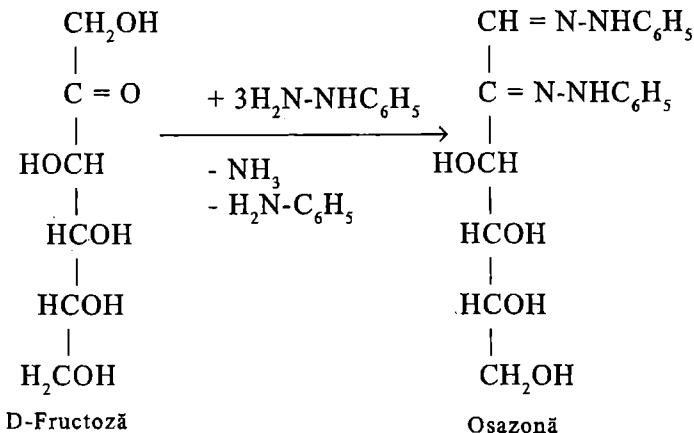


Fig. 2.1. Relații stereochemice între monozaharidele din seria D.

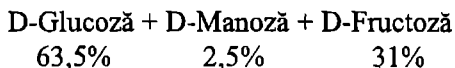


(ii) D-Fructoza dă o osazonă identică cu D-glucoza; în formarea osazonei sunt implicați atomii de carbon unu și doi, prin urmare restul moleculei este identic cu cel al D-glucozei:

(iii) *Transpoziția de Bruyn-van Eckenstein*. Monozaharidele, în prezența



bazelor slabe (apă de var, Py), se transformă în epimerii lor. Astfel D-glucoza, în prezența unei soluții de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , se transformă într-un amestec de:

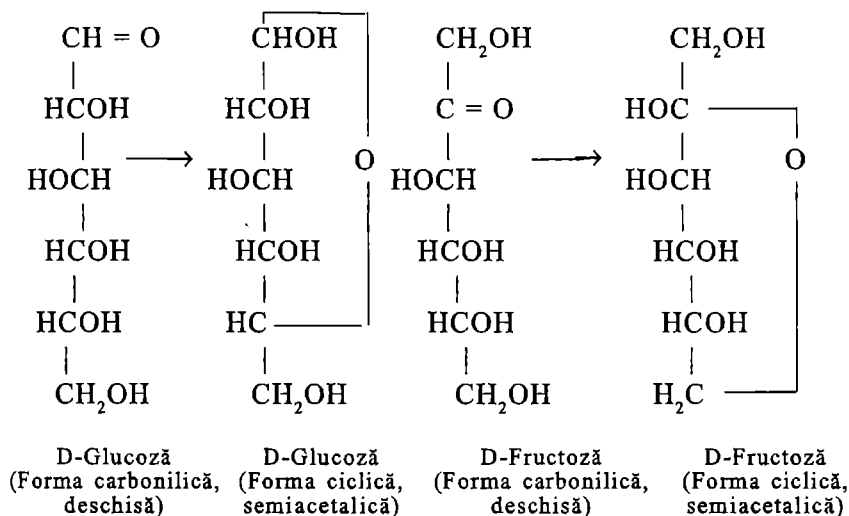


Restul de 3% sunt produși colorați cu structură nedefinită.

#### 2.1.1.4. Structura ciclică a monozaharidelor

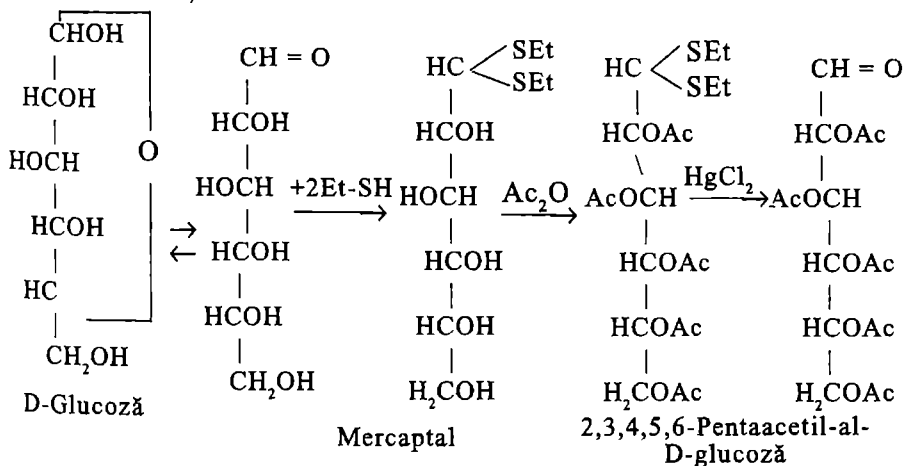
Gruparea carbonil din aldoze și cetoze nu se găsește în stare liberă ci formează, cu o grupare hidroxil din aceeași moleculă, un *semiacetal ciclic* (*lactol*). Acest semiacetal ciclic ia naștere printr-o adiție intramoleculară iar în structura astfel obținută gruparea carbonil devine grupare hidroxil. Întrucât această grupare

hidroxil nou formată are proprietăți deosebite de ale celorlalți hidroxili aceasta se numește *hidroxil glicozidic*.



Următoarele argumente au impus formularea ciclică a monoglucidelor.

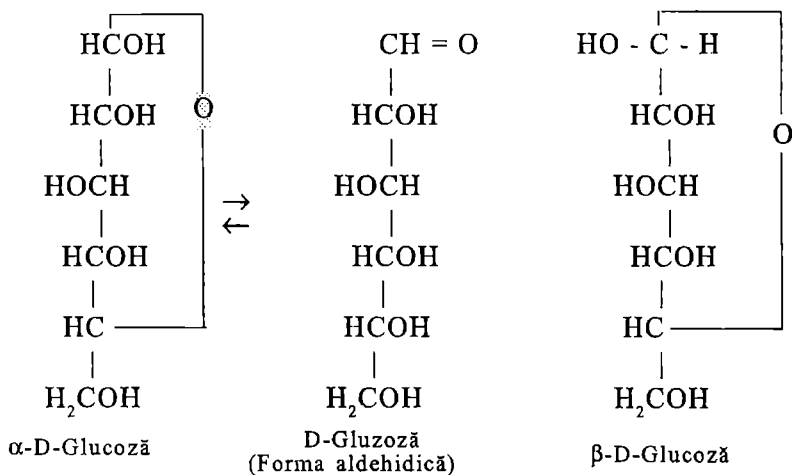
1. Gruparea carbonil prezintă numai unele dintre reacțiile caracteristice (formarea de oxime și hidrazone, reacția cu mercaptanii, R-SH) iar pe altele nu (reacția cu fucsină-bioxid de sulf). Dacă ciclizarea este împiedicată prin blocarea grupărilor hidroxilice obișnuite. gruparea aldehydică dă reacție pozitivă cu pararozanilină și bioxid de sulf:



## 2. Mutarotația și izomeria $\alpha \rightleftharpoons \beta$ (anomeria) monozaharidelor.

S-a observat că fiecare dintre cei 16 izomeri optici ai aldohexozelor poate exista în două forme nestabile și intertransformabile numite formele  $\alpha$  și  $\beta$ . Apariția acestor izomeri suplimentari numiți *anomeri* se explică prin existența formelor ciclice.

Formele anomere  $\alpha$ ,  $\beta$  au fost descoperite datorită fenomenului numit *mutarotație*. Astfel rotația specifică  $[\alpha]_D$  a glucozei cristalizate imediat după dizolvare în apă este  $+111^\circ$ . În timp rotația scade până la valoarea  $+52,5^\circ$ , unde rămâne constantă. Glucoza recristalizată din acid acetic sau Py dă, imediat după dizolvare în apă, o rotație specifică  $[\alpha]_D$  egală cu  $+18,7^\circ$ ; această soluție prezintă deasemenea mutarotație: în câteva ore ajunge la valoarea  $+52,5^\circ$ . Glucoza cristalizată din apă ( $[\alpha]_D = +111^\circ$ ) este forma  $\alpha$  iar glucoza cristalizată din acid acetic sau Py ( $[\alpha]_D = +18,7^\circ$ ) este forma  $\beta$ . Cele două forme sunt interconvertibile, prin intermediul structurii deschise, astfel că soluția cu rotația specifică intermediară ( $\alpha)_D = +52,5^\circ$  este un amestec al celor două forme  $\alpha$  și  $\beta$ .

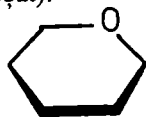


Detectarea anomerizării prin mutarotație la dizolvare a fost realizată la toate monozaharidele și la oligozaharidele cu grupare aldehydică liberă.

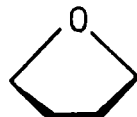
Configurația  $\alpha$  sau  $\beta$  a grupării OH a anomerilor se determină cel mai bine prin difracție cu raze X dar și prin spectroscopia RMN.

*Formule perspective (Haworth)*. Formulele precedente ale monozaharidelor se numesc *formule de proiecție* și ele au fost introduse de către E. Fischer. Interrelația dintre formulele plane și modelele sterice a fost prezentată în Cap. Stereochimie, conform regulilor propuse de către E. Fischer. Simpla observație că în molecula ciclică a glucidelor nu există o legătură mult mai lungă decât celelalte, cum sugerează formulele ciclice Fischer, a determinat introducerea *formulelor perspective* (Haworth). În aceste formule inelul piranozic sau furanozic este imaginat perpendicular pe planul hirtiei cu

heteroatomul în partea de jos (de regulă, legăturile mai apropiate de observator sunt trasate îngroșat):

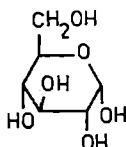


Inel piranozic

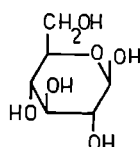


Inel furanozic

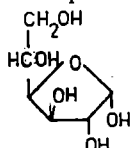
În aceste condiții substituenții care apar în partea dreaptă în formulele de proiecție apar dedesubtul planului în formulele perspective, iar substituenții aflați în partea stângă în cele dintâi apar deasupra în formulele perspective:



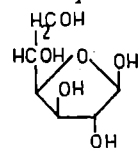
$\alpha$ -D-Glucopiranoză



$\beta$ -D-Glucopiranoză



$\alpha$ -D-Glucofuranoză

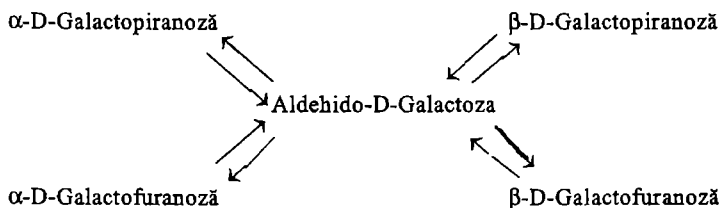


$\beta$ -D-Glucofuranoză

*Determinarea naturii piranozice sau furanozice a inelului monozaharidelor.*

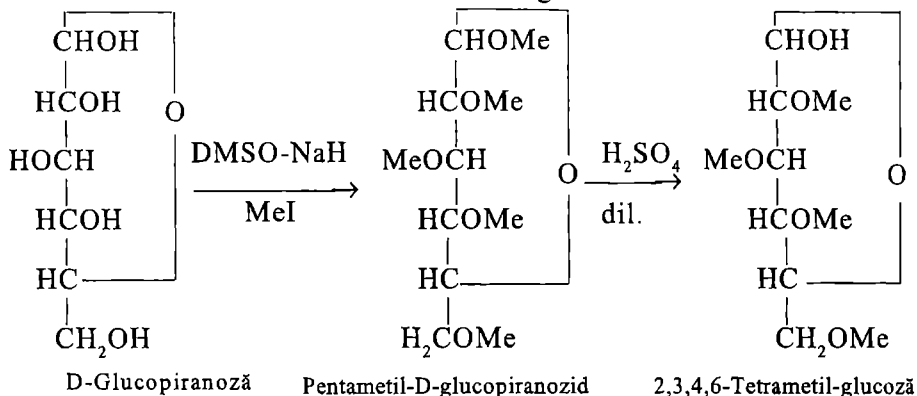
În constituția monoglucidelor pot exista cicluri de șase atomi numite *piranoze* (pentru că derivă de la piran) și cicluri de cinci atomi numite *furanoze* (derivate de la furan). Monozaharidele libere sunt stabile în formele piranozice dar în forma combinată unele monozaharide, în special ceto-hexozele, există ca inele furanozice.

Se admite că aldohexozele și aldopentozele există în soluție în cinci forme interconvertibile, dar în concentrație mult diferită. De ex. D-galactoză:



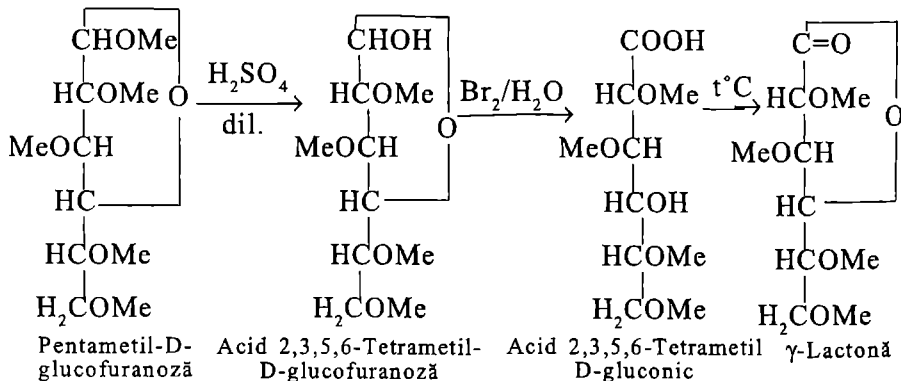
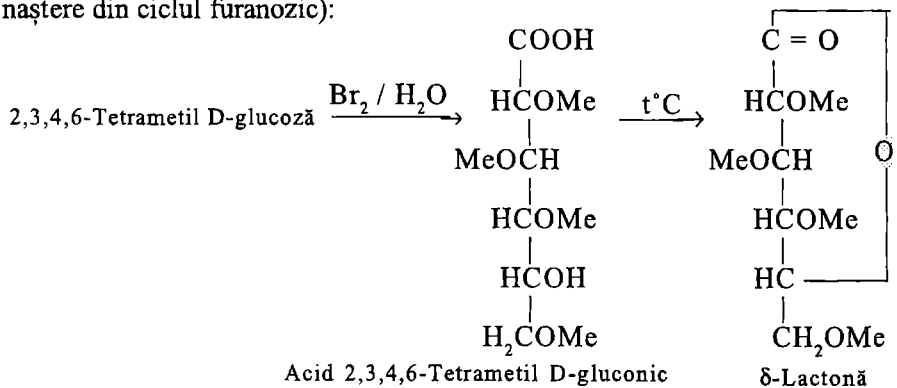
Structura piranozică sau furanozică a inelului monoglucidic a fost elucidată cu ajutorul derivaților în care grupările hidroxil cu reactivitate normală sunt metilate. Pentru aceasta monozaharidul se metilează exhaustiv, cel mai bine cu

DMSO-hidruură de sodiu și iodură de metil (S. Hakomori, 1964), după care, prin hidroliza acidă este eliberat numai hidroxilul glicozidic:



Natura, piranozică sau furanozică, a inelului se poate determina din acest punct pe două căi:

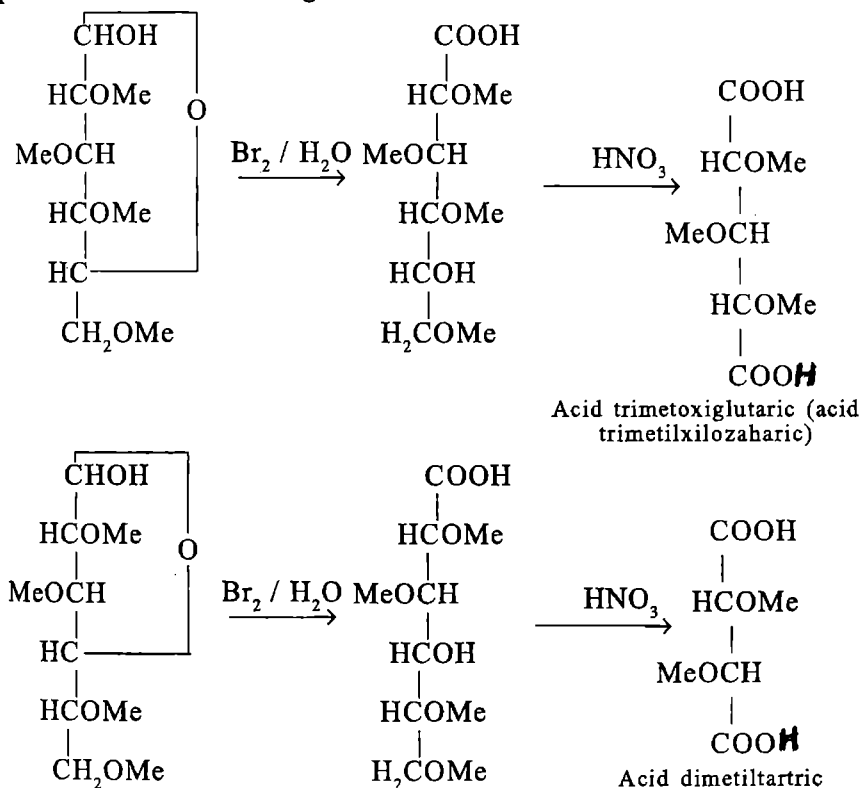
(i) O metodă cinetică bazată pe faptul că  $\delta$ -lactonele (ce iau naștere din inelul piranozic) se hidrolizează în apă mult mai rapid decât  $\gamma$ -lactonele (ce iau naștere din ciclul furanozic):





$\delta$ -Lactonele se hidrolizează, eliberând gruparea carboxil, prin simpla punere în contact cu apa în timp ce  $\gamma$ -lactonele se hidrolizează mult mai încet.

(ii) A doua metodă se bazează pe identificarea produșilor de oxidare: ciclul piranozic dă acid trimetoxiglutaric iar ciclul furanozic dă acid dimetiltartric:



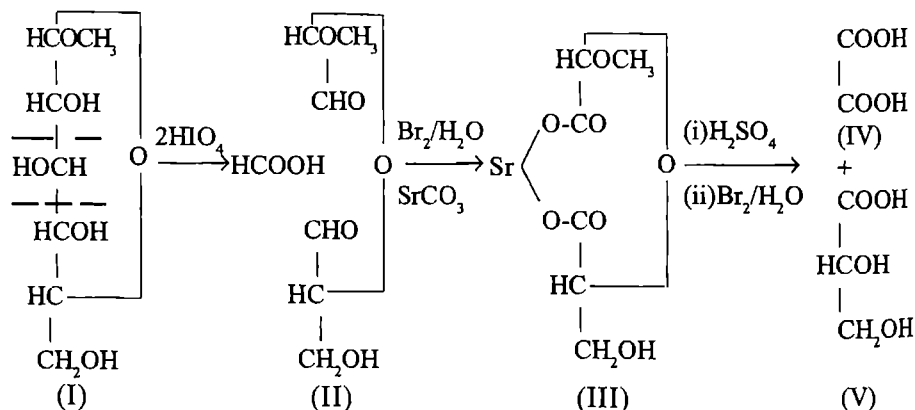
Prin metoda (ii) s-a stabilit că ceto-hexozele formează în combinații ciclul furanozic.

*Izomeria  $\alpha$ ,  $\beta$  (anomeria) glicozidelor.* Hidroxilul glicozidic este mult mai reactiv decât celelalte grupări hidroxilice ale moleculei. De ex. se metilează foarte ușor, prin încălzire cu metanol/HCl, dând naștere la metil-glicozide, care sunt combinații cristalizate. Dovada că hidroxilul glicozidic este cel care s-a eterificat rezultă din faptul că metil-glicozidele nu mai dau nici una dintre reacțiile caracteristice grupării carbonilice. Totodată metil-glicozidele nu prezintă fenomenul de mutarotație.

Dintre cele două metil-glicozide ale D-glucozei, metil-glicozidul cu rotație specifică mare este  $\alpha$ -D-metil-glucozid iar izomerul cu rotație optică mică este  $\beta$ -D-metil-glucozid.

S-au găsit enzime care hidrolizează, în mod specific, una dintre cele două metil-glicozide. Astfel *maltaza* (care este o  $\alpha$ -glucozidază) hidrolizează numai  $\alpha$ -D-metilglucozidul în timp ce  $\beta$ -glucozidaza hidrolizează numai  $\beta$ -D-metilglucozidul. Utilizarea enzimelor pentru identificarea configurației legăturii glicozidice constituie o metodă sensibilă și ușor accesibilă. Concomitent se utilizează difracția cu raze X, spectroscopia RMN, cinetica hidrolizei, oxidarea cu anhidridă cromică.

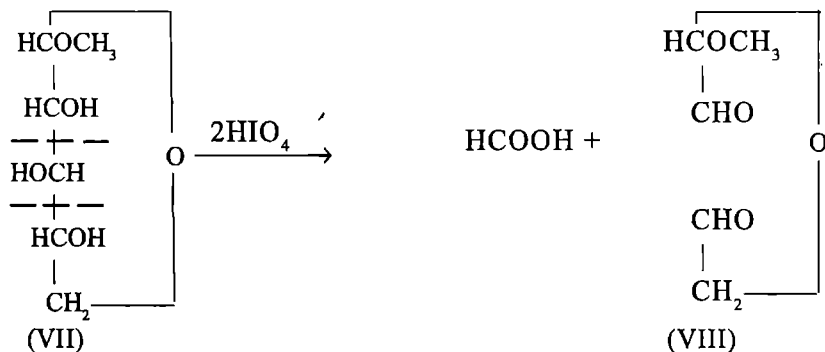
O altă *metodă oxidativă* de identificare a ciclului monozaharidic rezultă din oxidarea cu acid periodic a metil-glicozidelor. Se știe că prin determinarea acidului periodic consumat precum și a acidului formic și a grupărilor aldehidice formate poate fi cunoscut numărul de grupări hidroxil adiacente dintr-un compus chimic. Rezultă de aici tipul de ciclu monozaharidic și configurația atomului de carbon metil-glicozidic. Astfel, la oxidarea metil- $\alpha$ -D-glucopiranozidului (I) cu acid periodic se consumă două molecule de acid periodic per moleculă de  $\alpha$ -D-glucopiranozid și rezultă o moleculă de acid formic. (Trebuie notat că deși acidul periodic degradează complet glucidul liber, legătura eterică din glicozizi este rezistentă față de acest reactiv). Un alt produs de oxidare al metil- $\alpha$ -D-glucopiranozidului este D'-metoxi-D-hidroxitmetildiglicolaldehidă (II), iar aceasta, prin oxidare cu apă de brom în prezența carbonatului de stronțiu duce la starea cristalină (III). Compusul III, prin hidroliză cu acid sulfuric urmată de o nouă oxidare cu apă de brom, dă acid oxalic (IV) și acid D(-)-glicerici (V). Obținerea compușilor II, III, IV și V arată că inelul din compusul I este  $\delta$ -; acest rezultat se bazează și pe faptul că numai un atom de carbon se elimină ca acid formic și că numai două molecule de acid periodic se consumă:



Acest rezultat a fost regăsit și pentru alte metil- $\alpha$ -hexapiranozide, precum și faptul că toate au aceeași configurație la C-1.

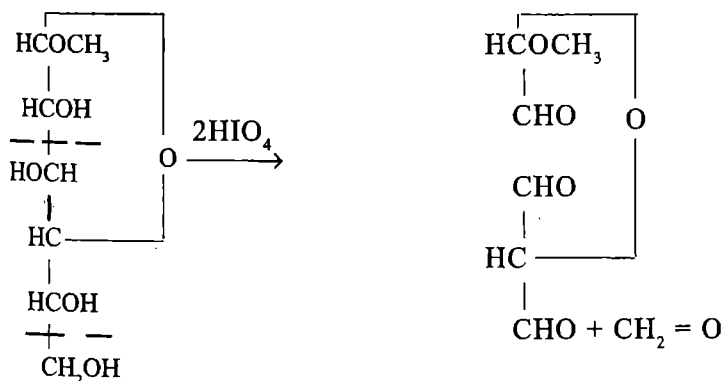
Similar, toate metil- $\beta$ -hexapiranozidele dau, prin oxidare cu acid periodic, un stereozomer al lui II, adică L'-metoxi-D-hidroxi-metildiglicolaldehidă.

Metil-aldopentapiranozidele dau, respectiv, produși identici celor obținuți din metil-aldohexapiranozide. De ex. metil- $\alpha$ -D-arabinopiranozidul VII dă D'-metoxidiglicolaldehidă (VIII):



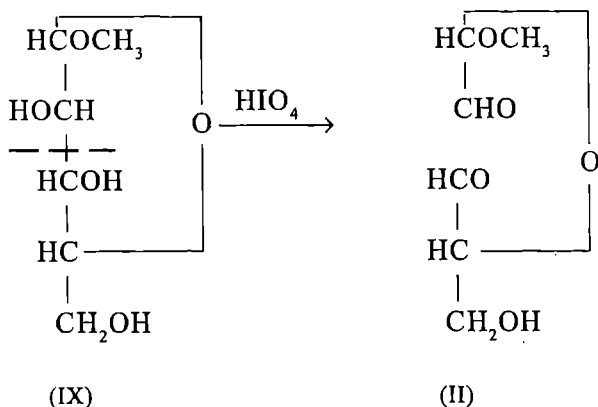
Deoarece toate metil- $\alpha$ -D-aldopiranozidele dau aceeași diglicolaldehidă rezultă că ele au aceeași configurație la C-1.

Dacă metil-hexafuranozidele sunt oxidate cu acid periodic, se consumă două molecule de acid și rezultă o moleculă de formaldehidă. Acest rezultat indică prezența unui ciclu de cinci atomi; de ex. metil- $\alpha$ -D-glucofuranozidul:



La oxidarea metil- $\alpha$ -D-arabinofuranozidului (IX) se consumă o moleculă de acid periodic și nu se elimină nici un atom de carbon (ca formaldehidă sau ca acid formic); prin urmare inelul este de cinci atomi. Totodată, se obține aceeași

dialdehidă (II) ca cea obținută din metil- $\alpha$ -D-glucopiranozid (I); prin urmare configurația lui C-1 este aceeași în I și IX:



### 2.1.2. OLIGOGLUCIDELE

Oligoglucidele sunt de două tipuri:

- reducătoare
- nereducătoare

Cunoașterea structurii unui oligoglucid necesită:

- a) Natura ozelor participante și raportul molar al acestora
- b) Dacă acestea se găsesc sub formă piranozică sau furanozică
- c) Grupările hidroxilice care participă la eliminarea moleculei de apă
- d) Configurația  $\alpha$  sau  $\beta$  a legăturii glicozidice

a) Natura chimică a monozaharidelor participante se stabilește prin analizarea produșilor de hidroliză. Determinarea cantitativă a acestora duce la stabilirea raportului molar al monozaharidelor din oligozaharid

b) Forma piranozică sau furanozică se deduce de obicei prin cercetarea vitezei cu care are loc hidroliza acidă. În același scop se utilizează identificarea produșilor de oxidare precum și permetilarea-acetoliza.

c) Grupările hidroxilice participante la formarea legăturii de oxigen sunt evidente la oligoglucidele nereducătoare. La oligoglucidele reducătoare, stabilirea grupărilor hidroxilice participante la formarea legăturii glicozidice se face prin analizarea produșilor de hidroliză a oligozaharidelor metilate dar mai precis se face prin analizarea produșilor de oxidare cu acid periodic sau cu tetraacetat de plumb, urmat de (reducere și) hidroliză; natura chimică a fragmentelor identificate ne indică pozițiile de legare.

d) Configurația  $\alpha$  sau  $\beta$  a legăturilor glicozidice se stabilește prin determinări optice, prin metoda hidrolizei enzimatic selectivă cu  $\alpha$ - și  $\beta$ -glicozidaze, prin spectroscopia RMN sau prin oxidare cu trioxid cromic.

### 2.1.2.1. Identificarea poziției de legare din oligoglucide

Grupările hidroxilice care participă la reacția de condensare în oligoglucide sunt identificate prin mai multe metode:

- oxidarea cu periodat

- permetilare-acetoliză

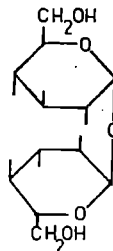
- spectrometria de masă bazată pe bombardarea moleculelor organice cu atomi rapizi de xenon (fast atom bombardment mass spectrometry, FAB-MS).

### 2.1.2.2. Găsirea atomului de legare al glucidului aglicon prin oxidare cu acid periodic

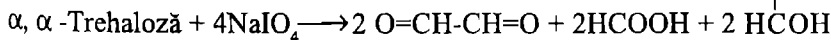
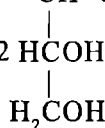
Oxidarea cu acid periodic în vederea găsirii atomului de legare al glucidului nu implică și determinarea configurației legăturii glicozidice, care constituie o etapă distinctă. Prin oxidare cu acid periodic sunt clivate toate legăturile C-C purtătoare ale unor grupări hidroxil (și/sau carbonilice) adiacente. Oxidarea cu acid periodic este urmată de identificarea fragmentelor carbonilice rezultate. Reducerea acestor fragmente la polioli urmată de separarea și dozarea acestora prin gaz-cromatografie a mărit performanțele metodei. Iată o ilustrare a oxidării cu periodat a dizaharidelor. S-au utilizat dizaharide formate numai din resturi de D-glucoză dar metoda este la fel de performantă pe oligoglucide cu compoziție eterogenă.

(i)  $\alpha, \alpha$ -Trehaloza: D-Glucopiranozil  $\alpha$ 1-1 $\alpha$ -D-gluco-piranozil se găsește în: *Secale cornutum*, în coconii gândacului *Larinus maculatus*, în ciuperci inferioare, în unele ciuperci superioare, în bacterii, precum cele ale leprei, ale tuberculozei, etc.

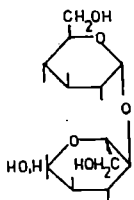
Oxidarea  $\alpha, \alpha$ -trehalozei cu acid periodic urmată de hidroliză decurge în felul următor:



$\alpha, \alpha$ -Trehaloză

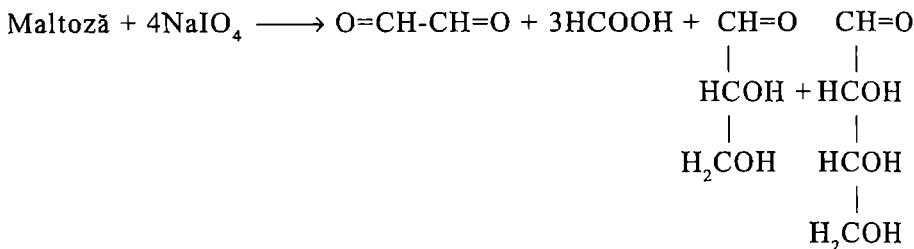


(ii) *Maltoza*: D-Glucopiranozil  $\alpha$ 1-4-D-gluco-piranoză:

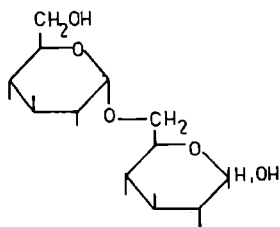


Maltoză

Maltoza se obține prin hidroliza enzimatică a amidonului. Se găsește în cantități mari în germenii de orz încolțit. Prin oxidarea cu periodat a maltozei se obțin aceleași fragmente ca din celobioză (D-gluco-piranozil  $\beta$ 1-4-D-gluco-piranoză):

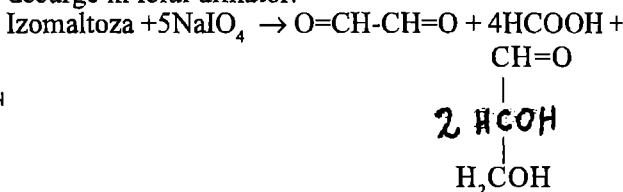


(iii) *Izomaltoza*: D-glucopiranozil α1-6-D-glucopiranoză:



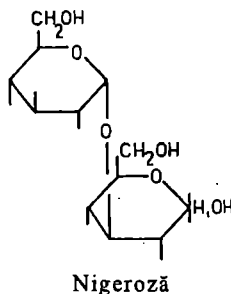
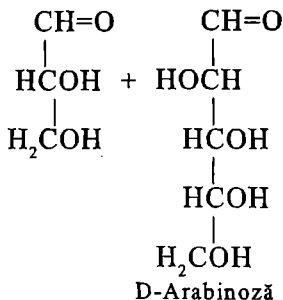
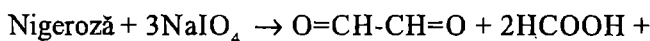
Izomaltoza

Izomaltoza apare ca produs de hidroliză a amilopectinei. Oxidarea cu periodat a izomaltozei decurge în felul următor:



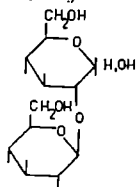
(iv) *Nigeroza*: D-Glucopiranozil α1-3-D-glucopiranoza:

Nigeroza rezultă la hidroliza unor amilopectine; oxidarea ei cu periodat decurge astfel:



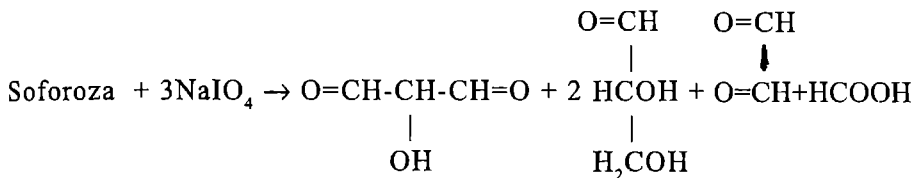
Nigeroză

(v) *Soforoza*: D-GLucopiranozil β1-2-D-glucopiranoză:



Soforoza

Soforoza se găsește în glicozizi, în *Stevia rebaudiana*, în păstăile de *Sophora japonica*. Oxidarea soforozei cu periodat duce la următoarele fragmente:



Oxidarea cu periodat se aplică similar la oligozaharidele conținând mai multe resturi de monoglucide.

## PERMETILARE-ACETOLIZA

Metoda permetilare-acetoliză se bazează pe labilitatea relativă a legăturii glicozidice față de alte legături covalente din molecula oligozaharidului.

Etapetele sunt următoarele:

1. Oligozaharidul este metilat exhaustiv (permetilat) cu un reactiv adecvat. Pentru aceasta oligozaharidul este tratat cu un amestec de DMSO și hidruură de sodiu iar apoi cu iodură de metil (S. Hakomori, 1964). În această etapă sunt metilate toate grupările hidroxil și amino libere ale oligoglucidului, și chiar gruparea -NH- din aminoglucidele acetilate.

2. Oligoglucidul permetilat este hidrolizat în condiții în care grupările metoxi- rămân intacte; amestecul de acid acetic-anhidridă acetică, sau și mai bine acidul formic, s-a dovedit adecvat pentru acest scop. În această etapă legăturile glicozidice sunt eliberate, iar atomii de carbon, ai glucidelor aglicon, implicați în legătura glicozidică, vor avea grupări hidroxil libere.

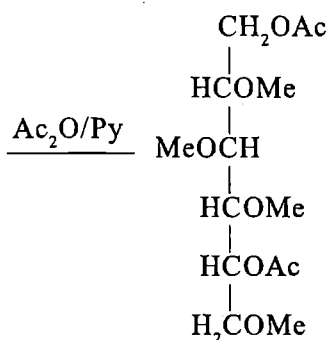
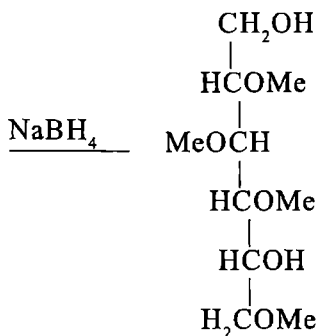
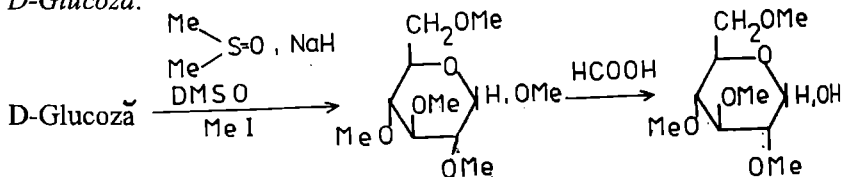
3. Monoglucidele, parțial metilate, rezultate prin hidroliză, se hidrogenează cu  $\text{NaBH}_4$  la nivelul grupărilor carbonilice. Rezultă alditoli parțial metilați, evitându-se formarea glicozidelor izomere ( $\alpha$  și  $\beta$ ) atâta timp cât există grupări hidroxil glicozidice.

4. Urmează acetilarea care constă în tratarea alditolilor parțial metilați cu un amestec de  $\text{Ac}_2\text{O}$  și piridină. În felul acesta grupările hidroxilice, rezultate prin reducerea cu  $\text{NaBH}_4$  a grupărilor carbonilice, precum și cele implicate în legături glicozidice (ca aglicon), sunt acetilate.

5. Urmează separarea și dozarea alditol acetatilor rezultați (cel mai bine prin gaz-cromatografie).

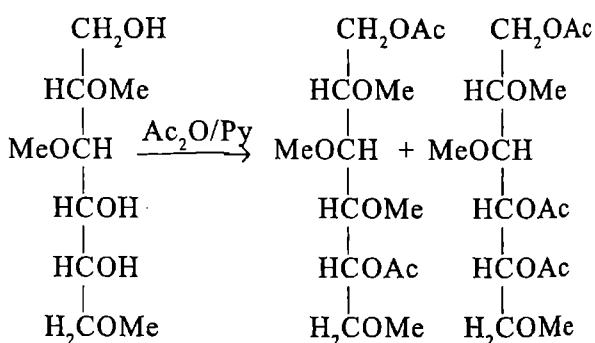
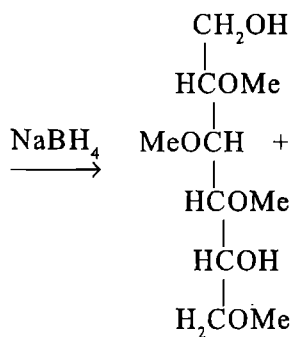
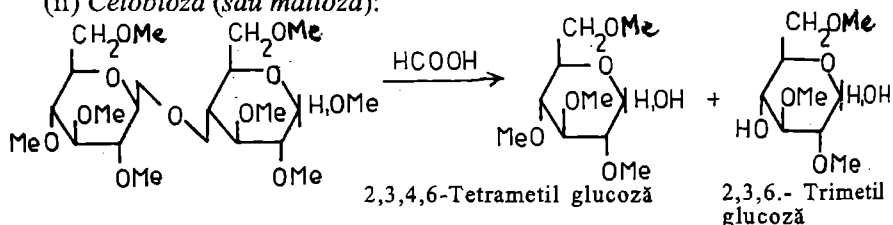
Iată cum decurg reacțiile de mai sus în cazul unor mono- și oligoglucoide:

(i) *D*-Glucoza:



2,3,4,6-Tetra-O-metil  
1,5-di-O-acetil glucitol

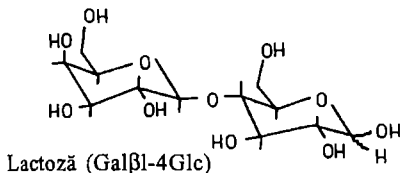
(ii) *Celobioza* (sau *maltoza*):



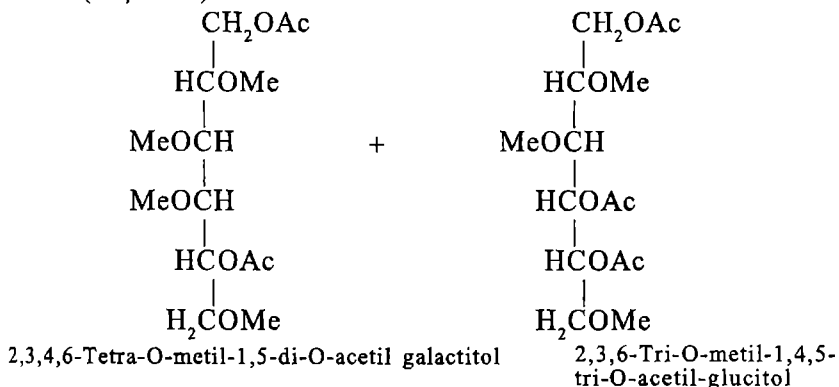
2,3,4,6-Tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil glucitol      2,3,6-Tri-O-metil-1,4,5-tri-O-acetil glucitol



(iii) *Lactoza*:

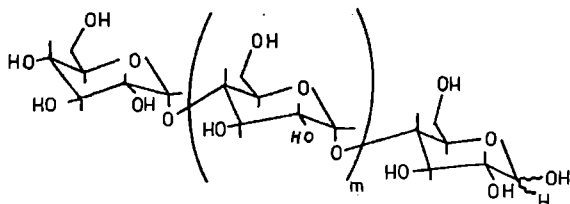


1. Metilare cu DMSO, NaH și MeI
  2. Hidroliză cu HCOOH
  3. Reducere cu NaBH<sub>4</sub>
- 
4. Acetilare cu Ac<sub>2</sub>O/Py →

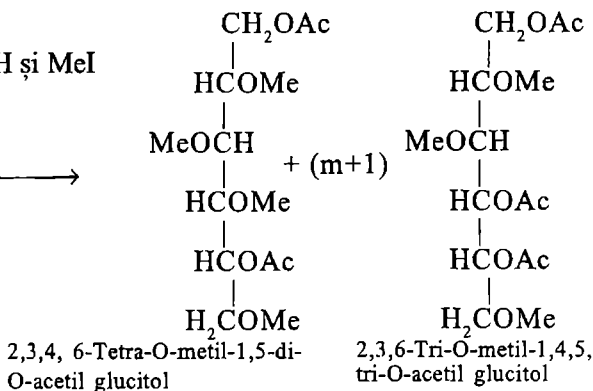


(2,3,4,6-tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil galactitolul este izomer cu 2,3,4, 6-tetra-O-metil-1,5-di-O-acetil glucitolul dar sistemele cromatografice disting între cei doi izomeri.)

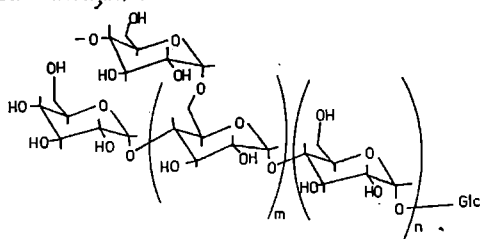
(iv) *Un fragment de amiloză*:



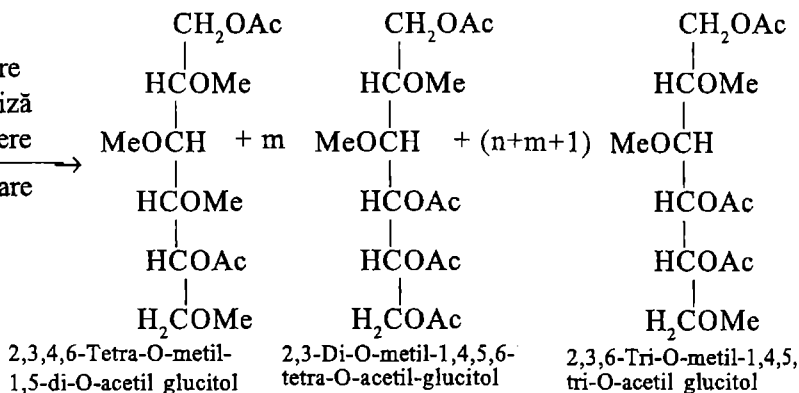
1. Metilare cu DMSO, NaH și MeI
  2. Hidroliză cu HCOOH
  3. Reducere cu NaBH<sub>4</sub>
- 
4. Acetilare cu Ac<sub>2</sub>O/Py →



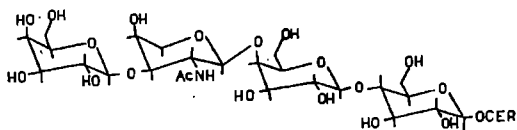
(v) *Un fragment de amilopectină*: (numărul  $m$  se referă numai la numărul resturilor de glucoză din ramificații):



1. Metilare
2. Hidroliză
3. Reducere
4. Acetilare

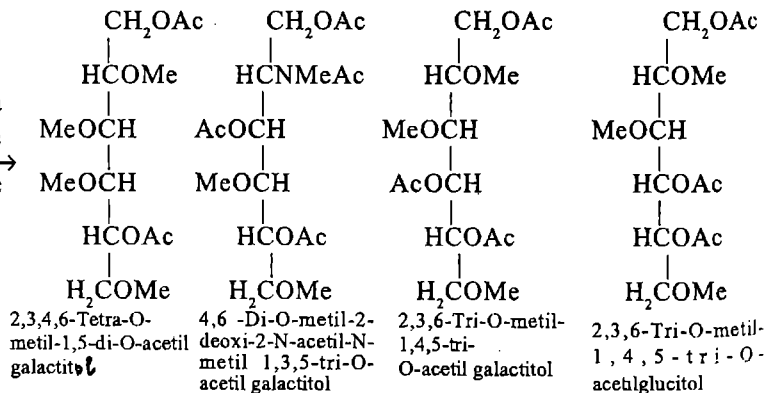


(vi) *Gangliotetraozil-ceramidul (asialo-GM1a*; vezi și D. P. Iga, Silvia Iga, „Methods Used for Distinguishing Between Isomeric Gangliosides”, *Analele Universității București* XLII, 3-11 (1993)):



Asialo GM1a (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1' Ceramid)

1. Metilare
2. Hidroliză
3. Reducere
4. Acetilare



În Tabelul 2.1. sunt prezentați alditolii metilați și acetilați proveniți *exclusiv* din glucidul agliconai diglicidelor studiate la oxidarea cu acid periodic.

Tabelul 2.1.

**Alditoli metilați și acetilați ai glucidului aglicon din unele dizaharide pe bază de glucoză.**

Dizaharid	Alditol metilat și acetilat
$\alpha$ , $\alpha$ -Trehaloză	2,3,4,6-Tetra-O-metil 1,5-di-O-acetil glucitol*
Maltoză	2,3,6-Tri-O-metil 1,4,5-tri-O-acetil glucitol
Izomaltoză	2,3,4-Tri-O-metil 1,5,6-tri-O-acetil glucitol
Nigeroză	2,4,6-Tri-O-metil 1,3,5-tri-O-acetil glucitol
Soforoză	3,4,6-Tri-O-metil 1,2,5-tri-O-acetil glucitol

\* După cum se vede alditol acetatul metilat (două molecule) ce rezultă din  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehaloză este identic cu cel obținut din glucoza liberă.

Se observă din Tabelul 2.1. că o serie de metil alditol acetati sunt izomeri: *metodele cromatografice și/sau spectrometria de masă disting între acești izomeri.*

## 2.2. AMINO-ACIZII

Amino-acizii sunt compuși organici conținând în molecula lor gruparea amino și gruparea carboxil. Structura și proprietățile fizico-chimice ale amino-acizilor a determinat clasificarea acestor compuși în două grupuri: *alifatici* și *aromatici*. Primul grup cuprinde amino-acizi la care atomul de carbon purtător al grupărilor amino și carboxil se găsește în starea de hibridizare  $sp^3$ . Prezența în molecula acestor amino-acizi a unor radicali aromatici tip fenil sau a unor radicali aromatici heterociclici nu afectează apartenența lor la acest grup.

Al doilea grup cuprinde amino-acizi la care atomul de carbon cu grupările funcționale amino și carboxil se găsește în starea de hibridizare  $sp^2$ ; de exemplu, acidul p-amino-benzoic și acidul o-amino-benzoic (antranilic), ambii amino-acizi naturali.

Amino-acizii se găsesc în natură fie în stare liberă, fie în stare condensată, în cadrul structurilor polipeptidice.

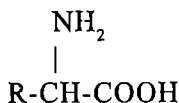
Amino-acizii posedă o mare diversitate de funcții biologice începând de la constituirea unor structuri implicate în medierea unor fenomene fizice și fiziologice până la rolul lor de moleculă-semnal (hormoni).

## 2.2.1. Amino-acizii alifatici

Amino-acizii alifatici se împart, după poziția grupării amino față de gruparea carboxil, în  $\alpha$ -amino-acizi,  $\beta$ -amino-acizi,  $\gamma$ -amino-acizi etc.

### 2.2.1.1. $\alpha$ -Amino-acizii

Din numeroase hidrolizate proteice au fost izolați 20-22  $\alpha$ -amino-acizi cu formula generală:



În afară de obținerea lor prin izolare din surse naturale, acești amino-acizi au fost obținuți prin numeroase sinteze chimice. Rolul acestor sinteze a fost, pe de o parte, de a confirma structura chimică și, pe de altă parte, pentru a introduce în molecula amino-acizilor izotopi radioactivi sau stabili în vederea unor studii metabolice.

O proprietate chimică comună a  $\alpha$ -amino-acizilor este că prin reacție cu acidul azotos dau  $\alpha$ -hidroxi-acizi care prin oxidare duc la  $\alpha$ -ceto-acizi; în acest stadiu, principalul centru chiral dispare.  $\alpha$ -Ceto-acizii se decarboxilează ușor dând combinații aldehydice; aldehydele se oxidează ușor dând compuși carboxilici care pot fi supuși reacțiilor de degradare caracteristice. În Tabelul 2.2 sunt prezentate structurile catenelor laterale (R) ale amino-acizilor.

Există mai multe criterii de clasificare a  $\alpha$ -amino-acizilor:

- criterii chimice (conform căilor de sinteză etc.)
- criterii biochimice (după calea de degradare oxidativă etc.)
- criterii structurale (de ex., după comportarea fizico-chimică a catenei laterale: solubilitate, încărcare electrică, reactivitate chimică, capacitatea de a forma legături de hidrogen).

Trebuie precizat că proprietățile fizico-chimice datorate catenei laterale se manifestă atât în cazul amino-acizilor liberi, precum și în cazul amino-acizilor integrați în structuri polipeptidice. Un criteriu de clasificare a amino-acizilor pe baza catenelor laterale ia în considerare polaritatea acestora (A. Lehninger, 1975). Este însă neîndoios că decisivă pentru polaritatea amino-acidului, considerat ca un tot unitar, este nu polaritatea catenei laterale ca atare, cât raportul dintre polaritatea catenei laterale și polaritatea fragmentului format din carbonul asimetric, gruparea carboxil și gruparea amino. Chestiunea este extrem de evidentă în cazul glicinei și alaninei: cu toate că acești amino-acizi posedă catene laterale nepolare (hidrofobe), ei sunt foarte solubili în apă, întrucât „ponderea”

catenei laterale în cadrul polarității de ansamblu a moleculei este redusă. Conform celor de mai sus, amino-acizii se clasifică astfel:

### 1. Grupa amino-acizilor monocarboxilici cuprinde:

1.1. Glicina sau glicocolul are câteva particularități care-l determină să fie tratat separat. Cu toate că este pus alături de amino-acizii hidrofobi, glicina este foarte solubilă în apă. Pe de altă parte, glicina este singurul  $\alpha$ -amino-acid lipsit de activitate optică. Totodată, integrat în structuri proteice, glicina determină o împiedicare sterică minimă la rotație sau față de grupări adiacente.

1.2. Amino-acizi cu catena laterală hidrofobă: alanina, valina, leucina, izoleucina.

1.3. Fenilalanina și triptofanul sunt amino-acizi cu catene laterale voluminoase, capabile să formeze legături hidrofobe mai ales cu moleculele plate.

1.4. Metionina, un amino-acid cu sulf.

2. Amino-acizi cu catena laterală polară, dar neîncărcată electric. Acești amino-acizi sunt mai solubili în apă decât amino-acizii hidrofobi datorită capacității de a forma cu apa, prin intermediul catenei laterale, legături de hidrogen. Aici sunt integrați:

2.1. Amino-acizi hidroxilici: serina, treonina, tirozina.

2.2. Amino-acizi amidici: asparagina și glutamina.

2.3. Un amino-acid cu sulf, cisteina.

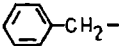

Grupările hidroxilice ale serinei, treoninei și tirozinei se găsesc în natură atât în stare liberă, cât și esterificată: cu acid ortofosforic, cu acid sulfuric sau cu acizi grași. Gruparea SH a cisteinei poate suferi o reacție de oxidare cu o grupare similară dând naștere la punți disulfurice -S-S-; de asemenea, ionii metalelor grele pot înlocui atomul de hidrogen dând naștere la mercaptide.

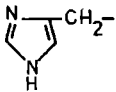
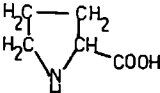
3. Grupa amino-acizilor dicarboxilici: acidul asparagic (*aspartic*) și acidul glutamic. La pH 6,0-7,0 acești amino-acizi posedă în catena laterală o sarcină netă negativă.

4. Grupa diamino-acizilor: ornitina, lizina, arginina și histidina. Trebuie precizat că, dacă la pH neutru cei trei amino-acizi (ornitina, lizina și arginina) au gruparea R încărcată pozitiv, histidina este la pH 7,0 numai în proporție de 10% încărcată pozitiv în fracțiunea imidazolică.

5. Amino-acizi heterociclici: prolina. Acest amino-acid cuprinde o grupare amino secundară. Conformația rigidă a prolinei perturbă structurile proteice ordonate (de ex. structura  $\alpha$ -spiralată). De aceea, procentul de prolină a unei proteine cristalizate poate fi determinat chiar prin difracție cu raze X.

## Aminoacizi constituenți ai proteinelor

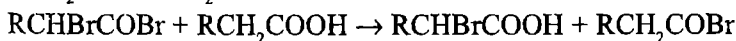
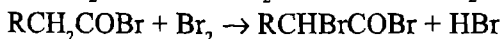
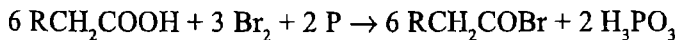
Aminoacid	Catena laterală, R
1	2
1.1. Glicocolul (sau glicina), Gly; acid amino-acetic	H-
1.2.1. Alanina, Ala; acid $\alpha$ -aminopropionic	H <sub>3</sub> C-
1.2.2. Valina, Val; acid $\alpha$ -aminoizovalerianic	H <sub>3</sub> C-CH-   CH <sub>3</sub> H <sub>3</sub> C-CH-CH <sub>2</sub> -
1.2.3. Leucina, Leu; acid $\alpha$ -aminoizocaproic	 CH <sub>3</sub> H <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -CH-
1.2.4. Izoleucina, Ile; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -metil-n-valerianic	 CH <sub>3</sub>
1.3.1. Fenilalanina, Phe; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -fenilpropionic	 -CH <sub>2</sub> -
1.3.2. Triptofan, Trp; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -indolil-propionic	
1.4.1. Metionina, Met; acid $\alpha$ -amino- $\gamma$ -tiometil-n-butiric	H <sub>3</sub> C-S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
2.1.1. Serina, Ser; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxipropionic	HOCH <sub>2</sub> -
2.1.2. Treonina, Thr; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-n-butiric	H <sub>3</sub> C-CH-   OH
2.1.3. Tirozina, Tyr; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -(p-hidroxifenil)-propionic	HO-(p)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -
2.2.1. Asparagina, Asn; acid $\alpha$ -aminosuccinamic	H <sub>2</sub> N-C-CH <sub>2</sub> -    O
2.2.2. Glutamina, Gln; acid $\alpha$ -amino-glutaramic	H <sub>2</sub> N-C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -    O
2.3. Cisteina, Cys; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -tiol-propionic	HS-CH <sub>2</sub> -
3.1. Acid aspartic, Asp; acid $\alpha$ -aminosuccinic	HOOC-CH <sub>2</sub> -

1	2
3.2. Acid glutamic, Glu; acid $\alpha$ -amino-glutaric	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
4.1. Ornitina, Orn; acid $\alpha, \delta$ -di-amino-n-valerianic	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
4.2. Lizina, Lys; acid $\alpha, \epsilon$ -diamino-n-caproic	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
4.3. Arginina, Arg; acid $\alpha$ -amino- $\delta$ -guanidino-n-valerianic	$\text{H}_2\text{N-C-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ $\parallel$ $\text{NH}$
4.4. Histidina, His; acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -imidazolil-propionic	
5. Prolina, Pro; acid piroolidin $\alpha$ -carboxilic	
	

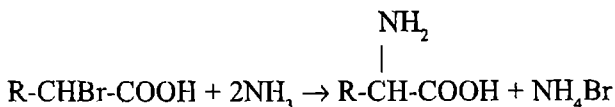
### 2.2.2. Sinteze de aminoacizi

#### 1. Aminarea acizilor $\alpha$ -halogenocarboxilici.

a. Obținerea aminoacizilor prin aminarea acizilor halogenați este condiționată de obținerea acestora din urmă. Spre deosebire de clorurare, care duce la o diversitate de produși monoclorurați și policlorurați, bromurarea este mult mai selectivă, astfel că rezultă numai  $\alpha$ -bromoacidul; pentru aceasta se lucrează în prezență de brom și fosfor roșu (reacția Hell-Volhard-Zelinski) sau tribromură de fosfor. Bromura de acil formată suferă o reacție de halogenare în poziția  $\alpha$  mult mai ușor decât acidul parental. Au loc reacțiile:

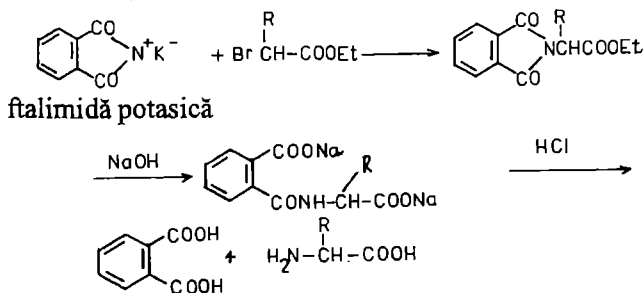


Din amestecul de reacție  $\alpha$ -bromoacizii au fost obținuți, de regulă, prin distilare fracționată în vid. Se realizează apoi reacția de aminare cu amoniac în exces pentru a scădea la minimum formarea aminelor secundare și terțiare:

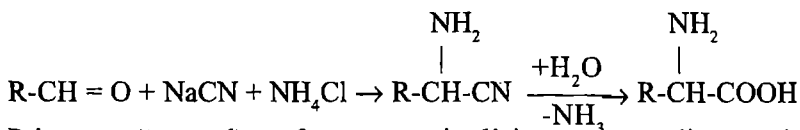


Metoda a fost aplicată, în primul rând, pentru prepararea aminoacizilor la care catena laterală R este o grupare alchil: glicina, alanina, valina, norvalina, norleucina, leucina, izoleucina. În măsura în care a fost disponibil  $\alpha$ -halogenoacidul corespunzător, la amino-acizii de mai sus s-au adăugat: serina, treonina, acidul aspartic, fenilalanina.

b. Randamente mai bune de aminoacizi se obțin prin sinteza Gabriel a ftalimidei; reacția constă în aminarea  $\alpha$ -halogenoacizilor cu ftalimidă potasică:

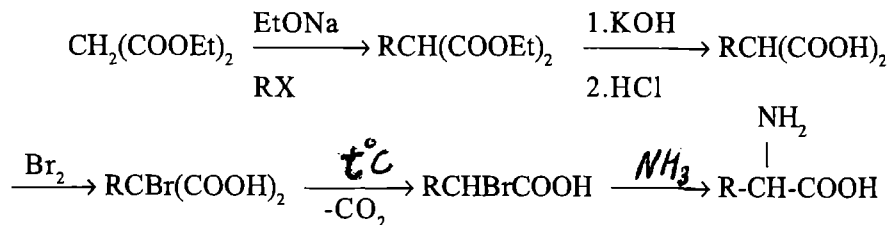


2. *Sinteza Strecker.* Aminonitrilul, obținut prin reacția dintre o aldehydă și un amestec echimolecular de clorură de amoniu și cianură de potasiu, duce prin hidroliză la aminoacizi:



Prin această metodă au fost preparați: glicina, serina, valina, metionina, acidul glutamic, leucina, izoleucina, norleucina și fenilalanina.

3. a. *Sinteze cu ajutorul esterului malonic.* Metoda utilizează, de asemenea, ca intermediari  $\alpha$ -halogenoacizii, dar aceștia sunt obținuți pe o altă cale:

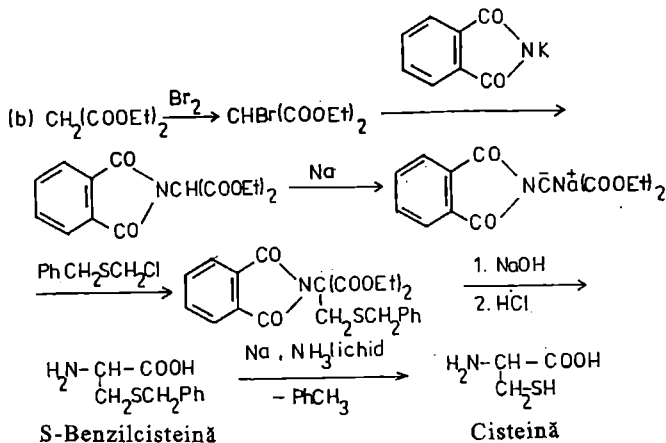
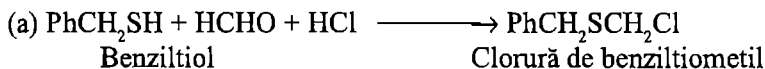


Prin această metodă au fost preparați, pornind de la derivați ușor accesibili, următorii aminoacizi: fenilalanina, prolina, leucina, izoleucina, norleucina și metionina.

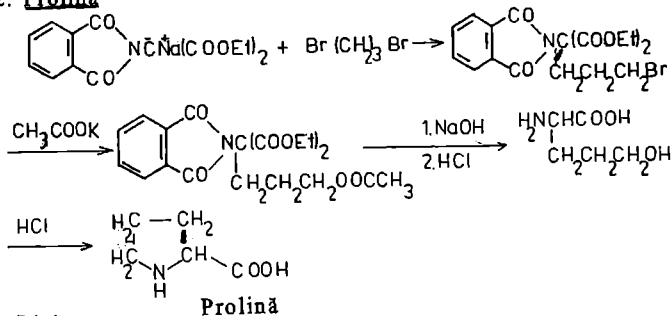


Sinteza cu ester malonic a fost, de asemenea, combinată cu sinteza Gabriel a ftalimidelor pentru a obține: fenilalanină, tirozină, prolină, cisteină, serină, acid aspartic, metionină și lizină.

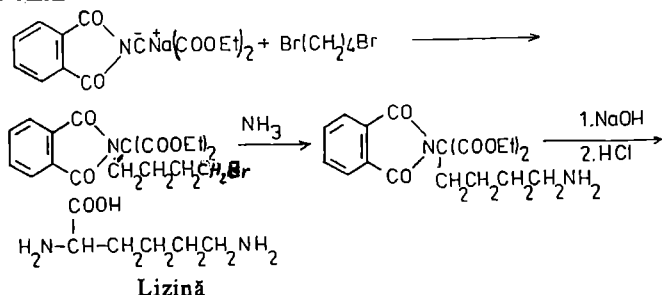
*Exemple. 1. Cisteina:*



**2. Prolina**

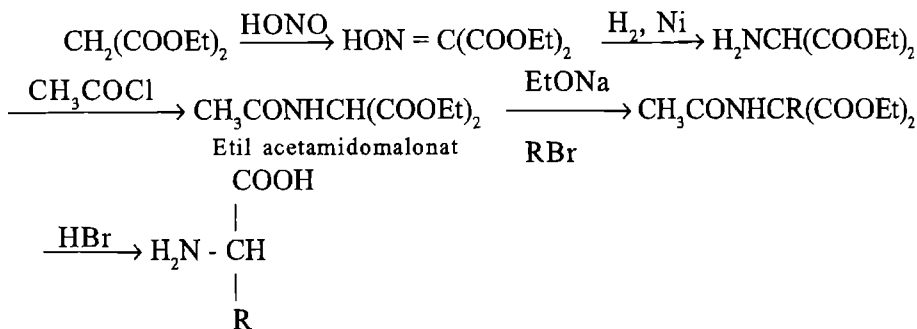


**3. Lizina**



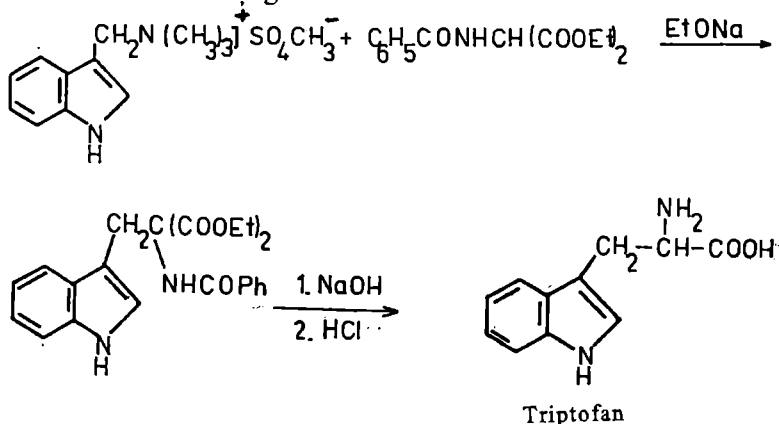
Utilizând 1,3-dibrompropan, în loc de 1,4-dibrombutan, în reacțiile de mai sus rezultă, în final, ornitină.

b. *Sinteze cu derivați arilamido ai esterului malonic.* Se utilizează, de obicei, etilacetamidomalonat:

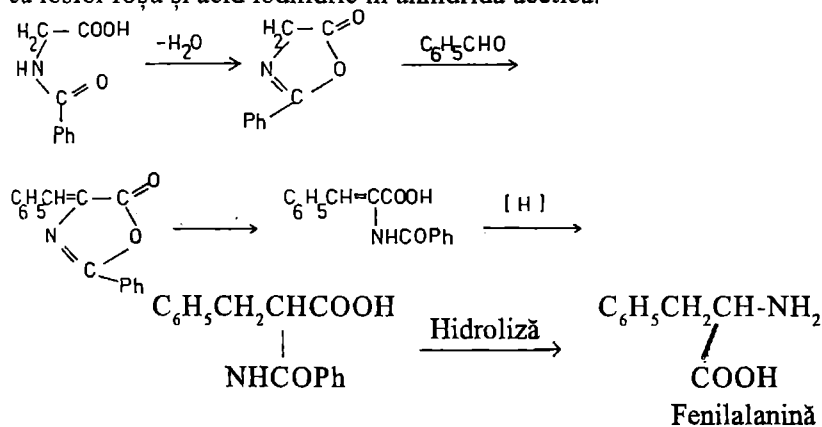


Prin această metodă au fost preparați: serina, leucina, valina, metionina, lizina, acidul glutamic și ornitina. Pentru obținerea serinei, formaldehida se condensează cu dietilacetamidomalonatul; ulterior, prin hidroliză și decarboxilare rezultă aminoacidul. Adiția acrilonitrilului la dietilacetamidomalonat duce la un intermediar ce prezintă un interes dublu. Hidrogenarea acestui intermediar, urmat de hidroliză și decarboxilare duce la ornitină. Pe de altă parte, hidroliza și decarboxilarea intermediarului respectiv duce la acid glutamic. Sinteza metioninei pornește de la 1-clor-2-tiometil-etil, obținut prin adiția hidrogenului sulfurat la etilenoxid urmat de metilarea grupării tio cu dimetilsulfat și de clorurare cu clorură de tionil. Un intermediar cheie în sinteza leucinei este clorura de metilalil (metalil) rezultată printr-o reacție de substituție alilică a izobutenei cu clor.

O variantă a metodei de mai sus a constituit-o prepararea triptofanului din ester benzamidomalononic și gramin metosulfat:

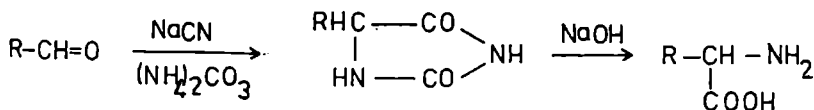


4. a. *Sinteza Erlenmeyer: hidroliza reductivă a arilidenoxazolonei* (azlactone). Această metodă se restrânge îndeosebi la sinteza aminoacizilor cu catenă laterală aromatică. Aceasta deoarece azlactonele nesaturate necesare se prepară ușor pornind de la aldehide aromatice. Etapele de lucru sunt următoarele. Prin încălzirea benzoil-glicinei (acid hipuric) cu anhidridă acetică în prezență de acetat de sodiu are loc o deshidratare intramoleculară și rezultă azlactonă. În mediu bazic are loc o reacție de condensare între aldehida aromatică și azlactonă. Reducerea și hidroliza duc la aminoacidul respectiv. Cele două reacții se realizează, de obicei, într-o singură etapă prin încălzirea azlactonei de condensare cu fosfor roșu și acid iodhidric în anhidridă acetică.

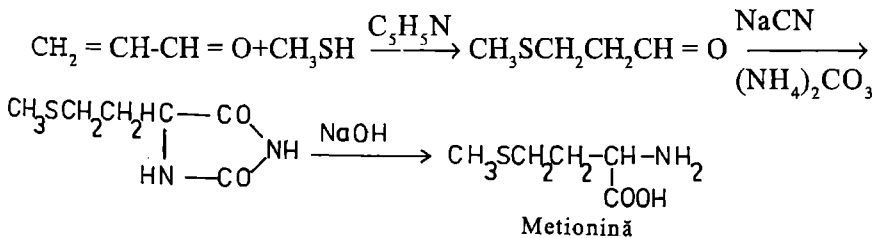


Prin această metodă au fost preparați, pornind de la aldehidele corespunzătoare, tirozina, triptofanul și histidina.

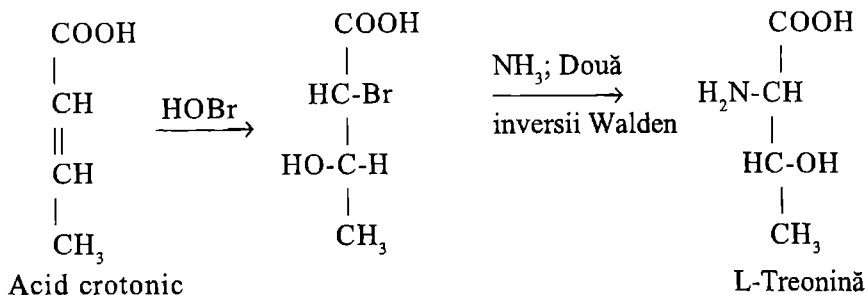
b. *Sinteza Bucherer* constă în obținerea unui derivat 5-substituit al hidantoinei, prin reacția cu carbonatul de amoniu și cianură de sodiu în etanol apos, urmat de hidroliză.



De ex. prepararea metioninei:

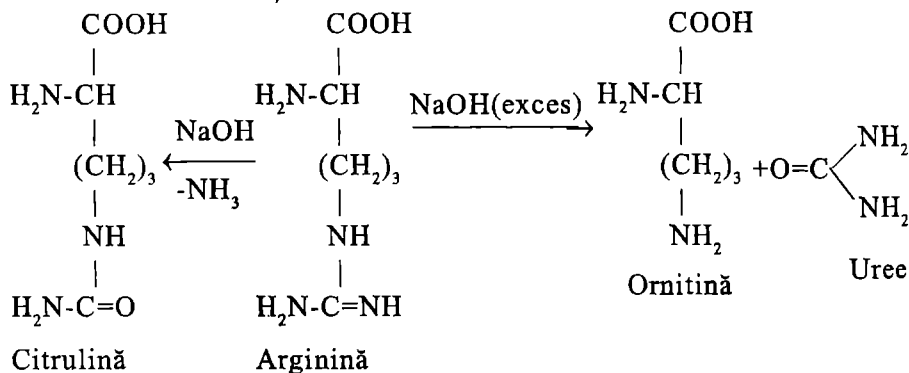


5. Sinteza treoninei a fost efectuată prin următoarele reacții:



6. Structura argininei a rezultat din următoarele argumente (C. Bodea, 1964): L-(+)-arginina, prin tratare cu o cantitate echimoleculară de NaOH în soluție apoasă, trece în L-(+)-citrulină. (L-(+)-Citrulina a fost găsită și în *Citrullus vulgaris*).

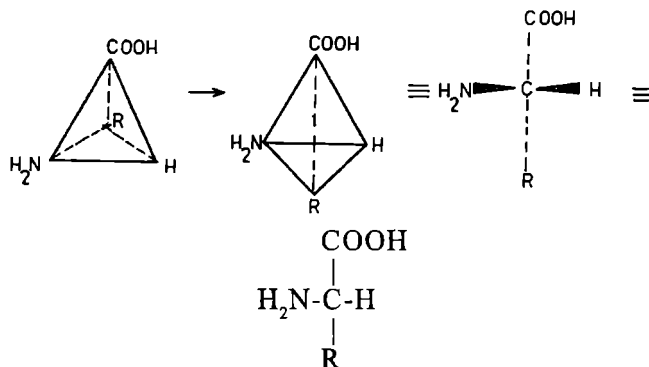
Sub acțiunea enzimei arginaza sau a alcaliilor în exces, arginina se transformă în ornitină și uree:



### 2.2.3. Proprietăți fizice

1. *Activitatea optică.* Datorită asimetriei atomului de carbon asimetric, aminoacizii, cu excepția glicinei la care catena laterală R este H, sunt optic activi. S-a găsit că (+)-alanina izolată din hidrolizate proteice are aceeași configurație cu acidul (+)-lactic; deoarece ultimul compus are configurația L-glicer aldehidei, rezultă că (+)-alanina naturală are configurația L. Relațiile configuraționale ale aminoacizilor izolați din hidrolizate proteice au fost dovedite prin reacții care nu afectează carbonul asimetric (C. D. Nenițescu, 1968).

Prin urmare modelul spațial și formula plană ce se atribuie aminoacizilor naturali sunt următoarele:



Așadar, în formulele plane gruparea amino se găsește în partea stângă, când catena hidrocarbonată este scrisă cu gruparea carboxil în sus. Valoarea unghiului de rotație specifică, și în unele cazuri chiar sensul de rotație, depinde de solvent, concentrație, temperatură și pH (Tabelul 2. 3). De aceea pentru a stabili identitatea și puritatea unui aminoacid cu ajutorul rotației specifice, trebuie reproduse cu rigurozitate condițiile indicate în tabele.

Tabelul 2.3.

#### Proprietăți fizice ale aminoacizilor

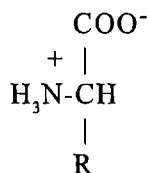
Amino-acidul	Solubilitate (grame în 100 g apă la 25°C)	Temperatura (°C)	Concentrația (Grame la 100 ml soluție)	Solvent	$[\alpha]_D$
1	2	3	4	5	6
Gly	24,99	-	-	-	-
Ala	16,72	25	2,06	HCl 6N	+13,70
		25	10,00	apă	+2,41
		20	1,78	NaOH 3N	+3,0
Val	8,85	20	3,4	HCl 6N	+28,8
		20	3,58	apă	+6,42
Leu	2,19	25	2,00	HCl 6N	+15,2
		25	2,00	apă	-10,57
		20	1,31	NaOH 3N	+7,6
Ile	2,93	20	5,09	HCl 6,1N	+40,61
		20	3,10	apă	+11,29
		20	3,34	NaOH 0,33N	+11,09
Phe	2,965	20	1,93	apă	-35,14
Trp		1,14	20	1,02	HCl 0,5N
Met	3,35	22,7	1,00	apă	-31,5
		20	2,42	NaOH 0,5N	+6,17
		20	5,00	HCl 3N	+23,40
Ser	5,023	25	9,34	HCl 1N	+14,95
Thr	-	26	1,63	apă	-9,1
Tyr	0,045	20	4,40	HCl 6,3N	-8,64
		18	0,90	NaOH 3N	-13,2

1	2	3	4	5	6
Asn	2,46	20	2,24	HCl 3,4N	+34,26
		20	1,41	apă	-5,3
		20	11,23	NaOH, 2,5N	-6,35
Gln	3,6 la 18°C	22	3,6	apă	+5,0
Cys	Foarte ușor solubilă	26	12,1	HCl 1N	+7,6
Cys		0,011	24	1,0	HCl 1N
		18,5	0,4	NaOH 0,2N	-70,0
Cys					
Asp	0,50	24	2,02	HCl 6N	+24,6
		18	1,33	apă	+4,7
		18	1,33	NaOH, 3N	-1,7
Glu	0,843	22,4	1,00	HCl 6N	+31,2
		18	1,47	apă	+11,5
		18	1,47	NaOH, 1N	+10,96
Orn	Foarte solubilă	20	0,84	HCl 0,45N	+14,1
Lys		Foarte solubilă	23	2,00	HCl 6N
		20	6,50	apă	+14,6
Arg	15	23,3	1,65	HCl 6N	+27,58
		20	3,48	apă	+12,5
		20	0,87	NaOH 0,5N	+11,8
His	4,29	25	1,0-4,05	HCl 6,1N	+13,34
		25	0,75-3,77	apă	-38,95
		20	0,77	NaOH 0,5N	-10,9
Pro	162,3	20	0,57	HCl 0,5N	-52,6
		23,4	1,00	apă	-85,0
		20	2,42	KOH 0,6N	-93,0

În cazul aminoacizilor cu două centre asimetrice este posibilă existența a patru izomeri optici.

2. Aminoacizii sunt compuși solizi, cristalizați, care la temperaturi de peste 200°C se topesc cu descompunere. În general sunt solubili în apă dar sunt mai solubili în soluții apoase acide sau bazice (Tab. 2.3.). Solubilitatea aminoacizilor în solvenți organici este mult mai scăzută, și așa se explică cristalizarea frecventă a aminoacizilor din soluții apoase de alcooli.

Comportarea salină a aminoacizilor poate fi redată prin structura unei sări interne (sau zwitterion):

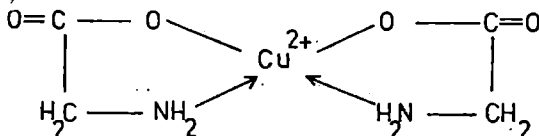


Aminoacizii sunt amfoteri și au un punct izoelectric caracteristic la care multe dintre proprietățile lor fizice și chimice prezintă un maxim sau un minim. Structura bipolară a aminoacizilor a fost impusă de un ansamblu de argumente (E. Soru, 1959; C. D. Nenițescu, 1968):

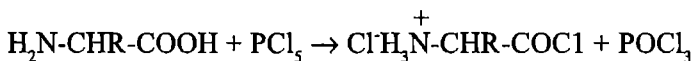
- căldura de ionizare a aminoacizilor în soluții acide și bazice
- constanta dielectrică
- electrostricția
- spectrele de absorbție în IR
- spectrele Raman
- difracția cu raze X

#### 2.2.4. Proprietăți chimice

1. *Reacții conferite de gruparea carboxil.* a. Aminoacizii formează cu ioni metalici săruri. Dacă în formarea acestor săruri este implicată și gruparea amino rezultă compuși chelatici:



b. Cu pentaclorură de fosfor, aminoacizii dau cloruri acide:



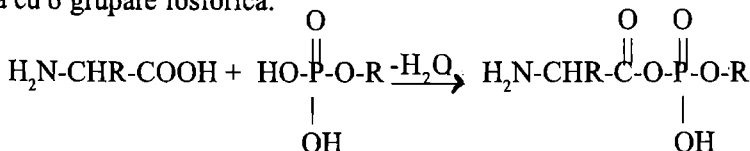
c. Cu alcoolii, în prezența acidului clorhidric, aminoacizii dau esteri:



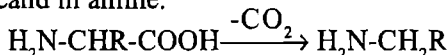
d. Prin reducere cu hidrogen în prezență de catalizatori sau, mai bine, cu  $\text{LiAlH}_4$ , gruparea carboxil a aminoacizilor este redusă la hidroxil:



e. Gruparea carboxil a aminoacizilor formează, cu o altă grupare carboxil, sau cu un alt acid o anhidridă. Importantă prin implicațiile ei este anhidrida mixtă cu o grupare fosforică:



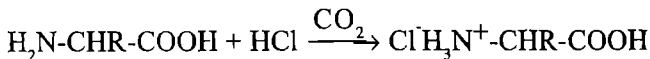
f. Prin încălzire, sau în prezența enzimelor numite decarboxilaze, aminoacizii se decarboxilează trecând în amine:



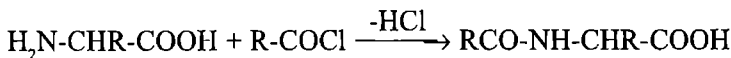
Aminele rezultate au în general funcții biologice importante.

## 2. Reacții determinate de gruparea amino

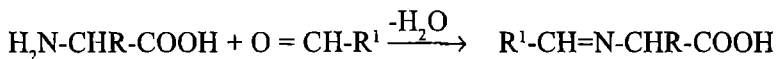
a. Cu acizii, gruparea amino formează săruri:



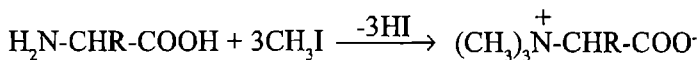
b. Cu cloruri acide, gruparea amino se acilează:



c. O reacție importantă, pentru dozarea titrimetrică a aminoacizilor (Sörensen) și pentru relațiile metabolice ale aminoacizilor, este reacția grupării amino cu compuși carbonilici:

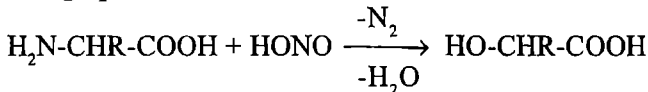


d. Datorită grupării amino, aminoacizii pot fi alchilați ducând la betaine:

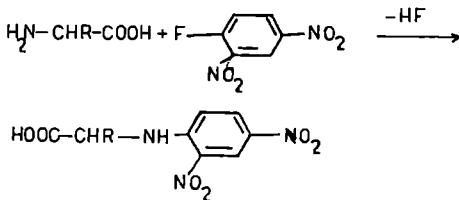


Unele betaine au fost găsite în natură.

e. Prin reacția cu acidul azotos, gruparea amino a aminoacizilor este transformată în grupare hidroxil:



f. Gruparea amino reacționează cu 1-fluor-2,4-dinitrobenzen dând 2,4-dinitrofenil-aminoacid:

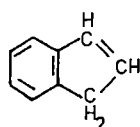


Întrucât legătura chimică dintre aminoacid și restul 2,4-dinitrofenil este mai puternică decât legătura peptidică, reacția de mai sus servește la stabilirea aminoacidului amino-terminal din proteine. Pentru aceasta se compară produșii de hidroliză ai proteinei cu produșii de hidroliză ai derivatului dinitrofenil a proteinei.

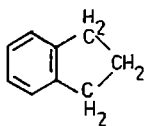
g. Ninhidrina (triketohidriden-hidratul) dă cu aminoacizii, datorită grupării amino, o reacție de culoare. Culoarea variază pentru diferiți aminoacizi între



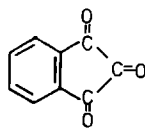
roz și albastru violet iar pentru prolină este galbenă. Ninhidrina este un derivat al indenului.



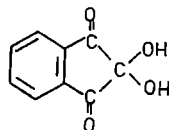
Inden



Hidrinden

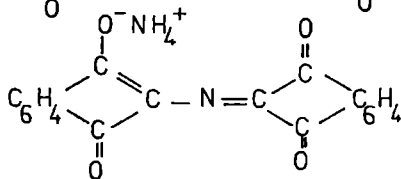
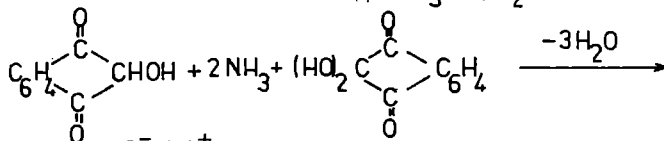
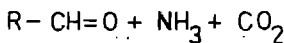
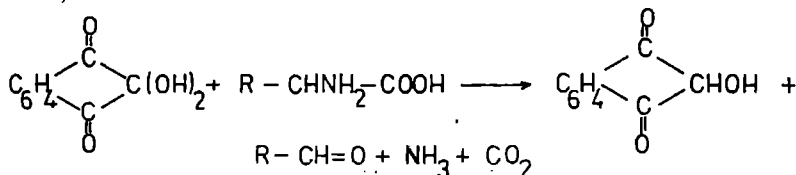


Tricetohidrinden



Tricetohidrinden-hidrat (Ninhidrină)

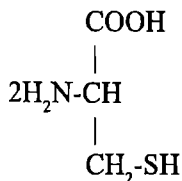
Reacțiile ce au loc sunt următoarele:



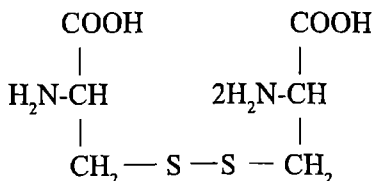
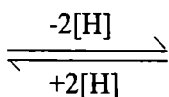
3. *Proprietăți chimice datorate catenei laterale.* Proprietățile chimice ale aminoacizilor datorate catenei laterale se manifestă atât în cazul aminoacizilor liberi cât și a celor integrați în structuri polipeptidice (inclusiv în proteine).

a. Grupările hidroxil din catena laterală a aminoacizilor (Ser, Thr, Tyr) se găsesc atât în stare liberă cât și esterificată: fosfat, sulfat, carboxil-ester. În stare liberă grupările hidroxil participă la formarea legăturilor de hidrogen: cu alte grupări hidroxil, cu grupări carboxil, cu grupări amino etc.

b. Două molecule de cisteină participă la un sistem redox de tipul următor:



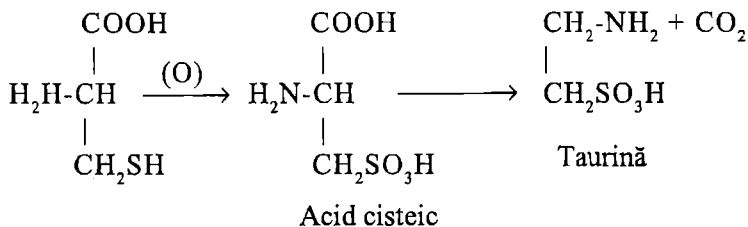
Cys  
(Cisteină)



Cys - Cys  
(Cisteină)

Atomul de hidrogen din gruparea tiol a cisteinei poate fi înlocuit cu un metal greu: cupru, plumb etc. De altfel cisteina sau cistina formează în prezența baritei și a sărurilor de plumb un precipitat negru de PbS.

Gruparea tiol a cisteinei poate fi oxidată la grupare sulfonică; prin decarboxilarea compusului format rezultă taurina:



Taurina se găsește în natură atât în stare liberă cât și sub formă de amidă substituită a acidului colic, acidul taurocolic.

c. Grupările carboxil și amino aparținând catenelor laterale ale aminoacizilor se găsesc, în soluție apoasă, în stare ionizată. Prin urmare proteinele sunt acide sau bazice în funcție de raportul molar al aminoacizilor constitutivi: dacă raportul molar (Asp + Glu):(Lys + Arg) este mai mare decât unu proteina este acidă iar în caz contrar este bazică.

### 2.3. LIPIDELE

Lipidele constituie o clasă eterogenă de substanțe solubile în solvenți organici (cloroform, eter, benzen) și insolubile în apă. Lipidele se împart în:

- lipide simple
- lipide complexe

Lipidele simple sunt lipidele care nu sunt hidrolizate, în mediu acid sau bazic, la molecule mai simple. Din această categorie fac parte:

- acizii grași
- colesterolul
- vitaminele liposolubile
- prostaglandinele etc.

Lipidele complexe constituie un grup de lipide care suferă un proces de hidroliză în mediu acid sau bazic. Aici aparțin:

- trigliceridele
- ceridele (esteri ai alcoolilor monovalenți alifatici cu masă moleculară mare și acizilor grași)
- steridele (esteri ai sterolilor cu acizii grași)
- ceramidele (N-acilamide ale acizilor grași cu amino-alcooli cu catenă lungă ca de ex. sfingozina)
- fosfolipide
- cerebrozide sau hexozil-ceramide (glicolipide)

### 2.3.1. Acizii grași

Acizii grași sunt acizi organici monocarboxilici conținând în molecula lor cel puțin 4 (după alți autori cel puțin 6) atomi de carbon. Acizii grași au de regulă un număr par de atomi de carbon în moleculă. Ei se împart în:

- acizi grași saturați
- acizi grași nesaturați.

#### 2.3.1.1. Acizii grași saturați

Acizii grași saturați au formula generală  $C_nH_{2n}O_2$  și au de regulă catenă liniară.

#### 2.3.1.2. Acizii grași nesaturați

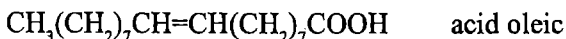
Acizii grași nesaturați conțin în molecula lor cel puțin o legătură dublă. Sunt importanți acizii grași cu 2-6 legături duble, așa-zii acizi grași polinesaturați; ei constituie vitamina F și sunt precursori ai prostaglandinelor.

### ACIZII GRAȘI ESENȚIALI (VITAMINA F)

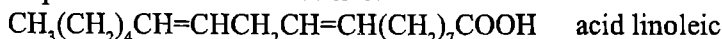
S-a observat că administrarea la șobolani a unei diete lipsite de acizi linoleic și linolenic ducea la încetarea creșterii, la necroza pielii și la alte consecințe. Aceste urmări puteau fi corectate cu un procent de 0,5% din acizii de mai sus adăugați în hrană dar nu cu acid butiric, oleic sau eleostearic (acid trans-9, trans-11, cis-13-octadecatrienoic). Holmann a desemnat ca vitamina F sau acizii grași esențiali acizii: linoleic, linolenic și arahidonic; mai târziu s-a constatat că și alți acizi grași polinesaturați îndeplinesc acest rol. Desemnăm în discuția ce urmează, prin termenul de acizi grași polinesaturați, acizii monocarboxilici cu catenă liniară conținând cel puțin două legături duble în molecula lor.

Acizii grași nesaturați au fost împărțiți în patru tipuri în funcție de numărul de atomi de carbon situați între gruparea metil terminală și cea mai apropiată legătură dublă:

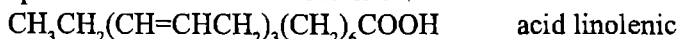
A. Grupul acidului oleic sau  $\omega$ -9:



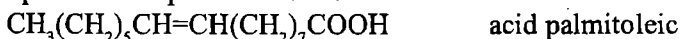
B. Grupul acidului linoleic sau  $\omega$ -6:



C. Grupul acidului  $\alpha$ -linolenic sau  $\omega$ -3:



D. Grupul acidului palmitoleic sau  $\omega$ -7:



Acizii polinesaturați țin îndeosebi de primele trei tipuri (S. H. Rizvi și colab., 1988). S-a constatat că această clasificare a acizilor grași polinesaturați este corelată cu metabolismul acestora atât în sensul biosintezei lor cât și a transformării în alți compuși biologic activi (prostaglandinele).

*Nomenclatură.* La denumirea unui acid polinesaturat se indică lungimea catenei și poziția legăturilor duble, cu numerotarea de la *capătul carboxilic*; este vorba despre legături duble separate printr-o grupare metilen, deci neconjugate. În cele ce urmează va fi vorba practic exclusiv de acizi polinesaturați cu configurația *cis* (total *cis*, all-*cis*). Prin urmare acidul linolenic se va numi acid all-*cis* 9,12, 15-octadecatrienoic; un izomer al acidului linolenic conținând una sau mai multe legături duble *trans* ar fi denumit indicând pozițiile acestora. De exemplu acid 9-*cis*, 12-*trans*, 15-*trans*-octadecatrienoic.

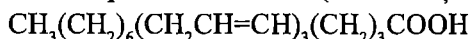
Prin definiție, omega-3 sau n-3 înseamnă că prima legătură dublă începe la al treilea atom de carbon de la *capătul metil terminal* al catenei. În cazul desemnării „număr: număr” primul număr arată lungimea catenei iar al doilea indică numărul de legături duble existente.

*Răspândire.* Acizii polinesaturați au o răspândire, practic, universală în lumea vie. Iată câteva exemple, grupate pe baza tipurilor de mai sus:

A. Grupul acidului oleic sau ω-9.

A.1. Acizi cu 20 atomi de carbon.

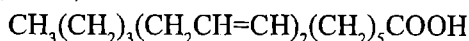
A.1.1. C<sub>20</sub> (20:3): acidul all-*cis* 5,8,11-eicosatrienoic a fost izolat din fosfatidele suprarenalei bovine (E. Klenk și D. D. Eberhagen, 1960):



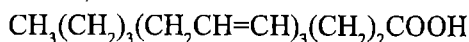
B. Grupul acidului linoleic sau ω-6.

B.1. Acizi cu 16 atomi de carbon.

B.1.1. C<sub>16</sub>(16:2): acid all-*cis* 7,10-hexadecadienoic a fost găsit în alge (E. Klenk și colab., 1963):

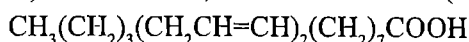


B.1.2. C<sub>16</sub>(16:3): acid all-*cis* 4,7,10-hexadecatrienoic a provenit din aceeași sursă ca acidul precedent și are structura:



B.2. Acizi cu 18 atomi de carbon:

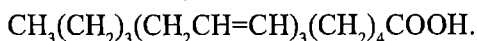
B.2.1. C<sub>18</sub>(18:2): acid all-*cis* 9,12-octadecadienoic (acid linoleic):



Una din sursele preferate de izolare a acidului linoleic este uleiul de șofran (W. E. Parker și colab., 1955). Este un acid larg răspândit în grăsimi și se

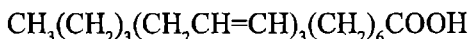
recomandă purificarea lui mai ales prin metode cromatografice (J. Frankel și J. B. Brown, 1941, 1943; C. E. Swift și colab., 1943).

B.2.2.  $C_{18}(18:3)$ : acid all-cis 6,9,12-octadecatrienoic (acid  $\gamma$ -linolenic) a fost găsit în planta *Oenothera lamarckiana* și *Oenothera biennis* (J. P. Riley, 1949; J. C. Nevenzel și D. R. Howton, 1959), ulei de hering american (W. Stoffel și E. H. Ahrens, 1958, 1960), miceliu de *Phycomyces blackesleanus* (K. Bernhard și H. Albrecht, 1948).



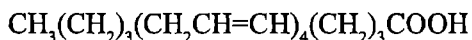
B.3. Acizi cu 20 atomi de carbon.

B.3.1.  $C_{20}(20:3)$ : acid all-cis 8,11,14 eicosa-trienoic (acid di-homo- $\gamma$ -linolenic):



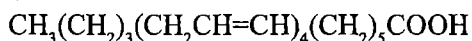
Acidul di-homo- $\gamma$ -linolenic a fost găsit în ulei de rechin (G. Baudart, 1942, 1943), unele țesuturi ale șobolanului (J. F. Mead și A. Slatan, 1956), fosfatidele ficatului bovin (E. Klenk și O. Montag, 1957), ulei de hering american (W. Stoffel și E. H. Ahrens, 1958, 1960), suprarenale bovine (E. Klenk și H. Eberhagen, 1961).

B.3.2.  $C_{20}(20:4)$ : acid all-cis 5,8,11,14-eicosatetraenoic (acid arahidonic):



B.4. Acizi cu 22 atomi de carbon.

B.4.1.  $C_{22}(22:4)$ : acid all-cis 7,10,13,16-docosatetraenoic:



Acest acid a fost izolat din fosfatidele suprarenalei bovine (E. Klenk și D. Eberhagen, 1960).

C. Grupul acidului ( $\alpha$ -) linolenic sau  $\omega$ -3.

Acizi grași aparținând acestui grup, cu lungimea catenei de la  $C_{16}$  la  $C_{22}$  au fost găsiți în fosfatidele suprarenalei bovine (E. Klenk și D. Eberhagen, 1960), în alge (E. Klenk și colab., 1963) dar mai ales în uleiurile de pește. Compoziția în acizi grași  $\omega$ -3 a unor uleiuri de pește este prezentată în Tabelul 2.4. Diferite specii conțin între 0,7 și 15,5 % ulei. Acizii grași  $\omega$ -3 constituie în general 25-30% din conținutul lipidic total, la majoritatea peștilor. Acizii grași majori variază mult cu specia, de exemplu 1,6-8% acid miristic; 0,5-33,4% acid palmitic; 2,0-11,2% acid palmitoleic; 5,2-29,1% acid oleic; 0,7-10,5% acid eicosenoic; 0,2-11,6% acid docosenoic; 5,0-21,5% acid eicosapentaenoic și 5,9-26,2% acid docosahexaenoic.

Compoziția în acizi grași  $\omega$ -3 (%) din câteva uleiuri de pește

Acid gras omega-3	Hering	Anșoa ( <i>Engraulis encrasicolus</i> )	Sardină	Hering american ( <i>Brevoortia tyrannus</i> )
16:3	-	-	0,20	0,20
18:3	2,00	0,75	1,00	1,30
18:4	3,15	3,05	3,15	2,75
20:4	0,75	0,70	1,05	1,35
20:5	7,45	17,00	11,00	11,50
22:3	-	0,15	0,15	0,15
22:4	0,25	0,55	0,70	0,50
22:5	0,75	1,60	1,30	1,90
22:6	6,75	8,75	13,00	9,10
Total omega-3	21,10	32,55	31,55	28,75

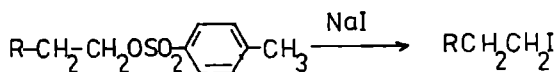
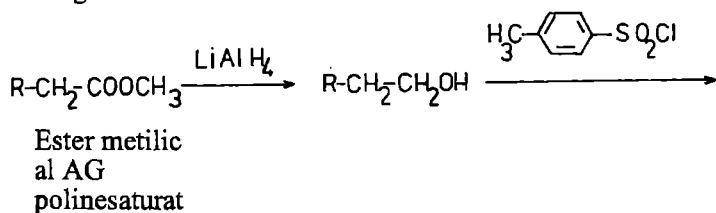
*Elucidarea structurii* acizilor polinesaturați presupune o varietate de metode fizice și chimice. Reacția de hidrogenare duce la acidul saturat al cărui p. t. și masă moleculară indică lungimea catenei. Numărul de legături duble rezultă din reacția de hidrogenare cantitativă și din spectrul UV după alcaliizomerizare (vezi mai jos). Poziția legăturilor duble se determină prin degradarea oxidativă (vezi la acidul arahidonic). Acizii polinesaturați au fost separați din amestecurile naturale complexe prin cromatografia esterilor metilici pe silicagel, eluția realizându-se cu un gradient discontinuu de eter etilic în eter de petrol. Calitatea separării a fost mult îmbunătățită prin adăugarea sărurilor de argint (5-20%) la suportul cromatografic. Mecanismul separării constă în formarea reversibilă a unui complex între ionii de argint ( $Ag^+$ ) și electronii  $\pi$  ai legăturilor duble ale acizilor grași polinesaturați. În aceste condiții eluția este cu atât mai înceată cu cât acidul este mai nesaturat. De ex. dacă se supune unei astfel de cromatografii un amestec de esteri metilici ai acizilor polinesaturați conținând 2-6 legături duble ordinea de eluție va fi: dienoici, trienoici etc., hexaenoici. Separarea s-a realizat nu numai ca esteri metilici dar și ca esteri ai colesterolului.

*Sinteze.* În vederea studiului interrelației metabolice dintre acizii polinesaturați au fost sintetizați următorii acizi (E. Klenk și H. Mohrhauer, 1960):

- acid  $\Delta^{6,9,12,15}$ -octadecatetraenoic-(2- $^{14}C$ )
- acid  $\Delta^{11,14,17}$ -eicosatrienoic-(2- $^{14}C$ )
- acid  $\Delta^{8,11,14,17}$ -eicosatetraenoic-(2- $^{14}C$ )
- acid  $\Delta^{7,10,13,16,19}$ -docosapentaenoic-(2- $^{14}C$ ).

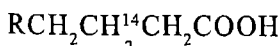
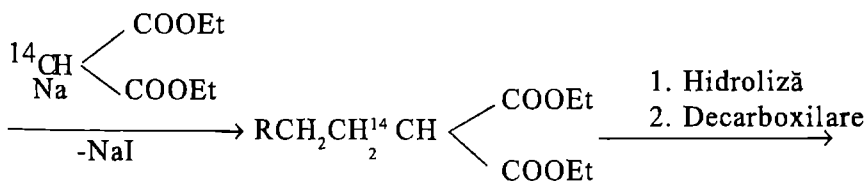
(Litera Δ indică poziția legăturilor duble începând de la capătul carboxilic; este vorba despre acizi grași polinesaturați cu configurația total cis).

Precursorii lor au fost următorii: acid Δ<sup>4,7,10,13</sup>-hexadecatetraenoic (purificat din alga *Scenedesmus obliquus*), acid Δ<sup>9,12,15</sup>-octadecatrienoic (acid linolenic), acidul Δ<sup>6,9,12,15</sup>-octadecatetraenoic (purificat din ulei de hering) și respectiv acid Δ<sup>5,8,11,14,17</sup>-eicosapentaenoic purificat din ulei de hering. Schema sintezei a fost următoarea: esterul metilic al acidului precursor a fost redus cu tetrahidroaluminat de litiu (LiAlH<sub>4</sub>) la alcoolul corespunzător. Acesta a fost transformat, prin reacție cu p-toluen-sulfoclorură, la esterul p-tosil iar ultimul, prin reacție cu iodură de sodiu, în iodura de polialchenil corespunzătoare. Aceasta, prin reacție cu derivatul monosodic al esterului malonic-(2-<sup>14</sup>C) în soluție de butanol, a fost convertit la diester malonic. Ultimul compus, prin hidroliză și decarboxilare dă acidul marcat 2-<sup>14</sup>C alungit cu doi atomi de carbon:



Ester p-tosil

Iodură de polialchenil



AG polinesaturat alungit cu 2C

Metoda de mai sus a fost aplicată pe numeroși acizi grași polinesaturați, între care și pe acidul γ-linolenic pentru a obține acidul all-cis 8,11,14-eicosatrienoic-(2-<sup>14</sup>C). Acesta a fost utilizat ca precursor de biosinteză pentru prostaglandine, dovedindu-se că este precursorul prostaglandinelor din seria unu: PGE<sub>1</sub> și PGF<sub>1</sub>α (D. A. van Dorp și colab., 1964; S. Bergström și colab., 1964) (vezi prostaglandinele în Cap. Molecule Semnal).

## ACIDUL ARAHIDONIC

(Acidul all cis eikosa 5,8,11,14-tetraenoic)

Acidul arahidic tetraenesaturat a fost descoperit în lipidele ficatului, rinichiului și inimii (P. Hartley, 1909); în același an acest nou compus a fost denumit acid arahidonic (J. Lewkowitsch, 1909). Hartley a separat acidul arahidonic ca octabromură cu formula moleculară  $C_{20}H_{32}O_2Br_8$  sau ca acid octahidroxiarahidic, după oxidare blândă cu permanganat de potasiu. Acidul octahidroxiarahidic este solubil în apă, spre deosebire de acidul arahidonic care este practic insolubil.

Un procedeu mult utilizat pentru estimarea cantitativă a acestui acid era adăugarea de brom în exces la o soluție în eter etilic a acizilor grași sau esterilor lor, urmată de cântărirea octabromurilor insolubile (J. B. Brown, 1929; W. C. Ault și J. B. Brown, 1934). Să presupunem că amestecul ce conține acid arahidonic nu este impurificat cu un acid trienoic (de ex. acid linolenic sau gamma-linolenic) dar este impurificat cu acizi saturați, acid oleic și acid linoleic. În aceste condiții acizii saturați precum și dibromurile și tetrabromurile respective sunt solubile în eter etilic în timp ce octabromura acidului arahidonic (dar și hexabromura acizilor trienoici) sunt insolubile în acest solvent. Prin urmare, prin spălarea repetată cu eter etilic a bromurilor insolubile este îndepărtat atât excesul de brom precum și: acizii grași saturați, acidul dibromostearic și acidul tetrabromostearic. Din fericire multe din materialele lipidice pe care s-au efectuat o serie de studii ale acidului arahidonic conțineau ca acizi nesaturați îndeosebi acid oleic, acid linoleic și acid arahidonic; numai în aceste condiții dozarea acidului arahidonic ca bromuri insolubile dă valori apropiate de cele reale.

Prin debromurarea acidului cu pudră de zinc se obține un acid arahidonic în care poziția legăturilor duble nu este modificată dar produsul conține un procent apreciabil de legături duble trans (D. E. Dolby și colab., 1940; C. L. Arcus și I. Smeadley-MacLean, 1943; O. E. McElroy și colab., 1956).

Acidul arahidonic, în amestec cu alți acizi grași liberi, se obține prin hidroliza lipidelor (J. B. Brown, 1929; W. C. Ault și J. B. Brown, 1934) sau a țesutului total (O. S. Privett și colab., 1959).

Separarea acizilor grași saturați de cei nesaturați se realizează prin intermediul sărurilor de plumb (P. Hartley, 1909; W. C. Ault și J. B. Brown, 1934), de litiu, recristalizarea la temperaturi joase (G. Y. Shinowara și J. B. Brown, 1940; D. P. Iga, 1979) sau complecși cu uree la temperaturi joase (O. E. McElory și colab., 1955). Principiul separării este următorul: sărurile metalice de Pb sau Li ale acizilor grași polinesaturați sunt mult mai solubile în eter sau etanol decât sărurile acizilor saturați. Pe de altă parte, solubilitatea în



acetona la temperaturi de  $-20 - -70^{\circ}\text{C}$  a acizilor polinesaturați este mult mai mare decât a acizilor saturați; complexarea cu uree este cu atât mai dificilă cu cât nesaturarea este mai pronunțată.

*Distilarea fracționată în vid* a esterilor metilici a acizilor grași duce la separarea acestora după lungimea catenei (O. S. Privett și colab., 1959). Separarea acizilor grași nesaturați, cu aceeași lungime a catenei, conform cu gradul de nesaturare, se realizează prin cromatografia esterilor metilici (S. F. Herb și colab., 1951) sau a esterilor cu colesterolul (P. D. Klein și E. T. Jansen, 1959).

*Răspândire.* Acidul arahidonic a fost identificat și dozat ca octabromuri insolubile în acizii lipidelor totale provenite din: ficat, tiroidă, suprarenală, splină, creier; a fost deasemenea găsit în lecitina ficatului (P. A. Levene și H. S. Simms, 1922) și oului (P. A. Levene și I. P. Rolf, 1922). Deoarece aceste surse conțin și alți acizi grași mai nesaturați decât acidul arahidonic, aceștia interferă în metoda de dozare dând un procent mai înalt decât cel real. Prin utilizarea metodelor de separare mai blânde (recristalizarea la temperaturi joase, distilarea în vid avansat pe coloane cu înaltă rezoluție, distribuția în contracurent, cromatografia de partiție în fază inversată), dublate de metode analitice sensibile (spectrofotometria în UV după alcaliizomerizare, gaz-cromatografia) s-au obținut niște cifre foarte apropiate de cele reale în ce privește compoziția în acizi grași saturați și nesaturați. Astfel a fost determinată compoziția în acizi grași a glicerofosfatidelor din suprarenală bovină (E. Klenk și D. Eberhagen, 1960), ulei de hering (E. Klenk și L. Brucker-Voigt, 1961), alge de ape dulci precum și alge marine (E. Klenk și colab., 1963), ficat de porc. Acidul arahidonic a fost izolat și caracterizat, alături de acidul gamma-linolenic, din protozoarul *Ochromonas danica* (T. H. Haines și colab., 1962).

În majoritatea acestor surse se găsește un procent apreciabil (de ordinul zecilor, din acizii grași totali) de acid arahidonic. În Tabelul 2.5 prezentăm compoziția în acizi grași a fosfatidelor suprarenalei bovine.

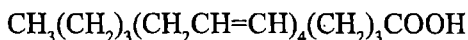
Tabelul 2.5.

Compoziția în acizi grași ai fosfatidelor din suprarenală bovină  
(% din acizii grași totali)

	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>17</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>19</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>22</sub>	C <sub>23</sub>	C <sub>24</sub>
Saturați	Urme	Urme	Urme	15,5	1,5	19,5	Urme	Urme	Urme	Urme	Urme
Monooici				1,0		22,5		Urme			Urme
Dienoici						9,0		1,0			
Trienoici						Urme		1,5			
Tetraenoici						Urme		19,0	1,0		
Pentaenoici								2,0	1,5		

Klenk și Brucker-Voigt au găsit în uleiul de hering un izomer al acidului arahidonic, acidul all cis 8,11,14,17-eicosatetraenoic, raportul molar între cei doi acizi fiind cam de 1:1.

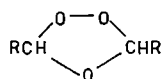
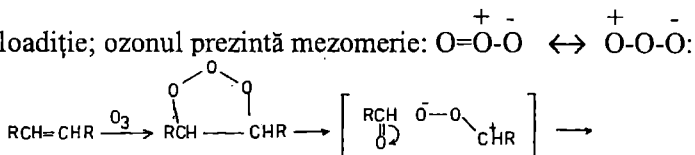
*Elucidarea structurii.* Între descoperirea acidului arahidonic și cunoașterea structurii sale au trecut peste trei decenii. Elucidarea structurii acidului arahidonic a fost rezultatul competiției a două grupuri de cercetători. Prima elucidare corectă a realizat-o grupul care, alături de argumentele chimice, a utilizat și un argument biologic. Este vorba despre constatarea că ficatul șobolanilor hrăniți cu o dietă bogată în acid linoleic (a cărui structură era cunoscută la acea dată) se îmbogățește în acid arahidonic. Presupunând, în mod corect, că legătura dublă dintre capătul metil-terminal este plasată identic în cei doi acizi grași și corelând această presupunere cu date chimice autorii respectivi au prezentat structura corectă a acidului arahidonic. Degradarea oxidativă (cu  $\text{KMnO}_4$ ) a arătat că atât acidul arahidonic cât și acidul linoleic duc la acid caproic (capătul metil-terminal); din acidul arahidonic s-a mai obținut acid glutaric (capătul carboxil-terminal). Corelând aceste date cu existența a patru legături duble neconjugate (prin oxidare s-a mai obținut acid formil acetic,  $\text{O}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) a rezultat structura acidului arahidonic (D. E. Dolby și colab., 1940; C. L. Arcus și I. Smedley-MacLean, 1943):



Configurația total cis a legăturilor duble a fost găsită odată cu studiul spectrelor în IR.

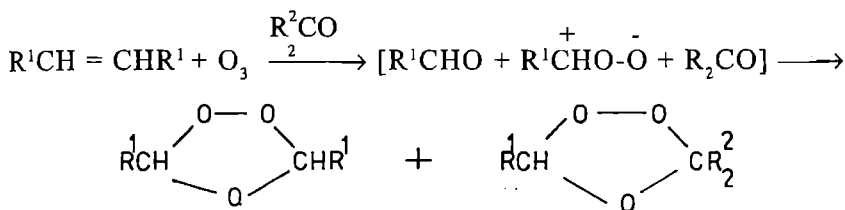
### REAȚIA DE OZONOLIZĂ

Alchenele adăunează ozon pentru a forma ozonide. În stare liberă acestea sunt de obicei explozive. Un mecanism larg acceptat implică o reacție de cicloadiție; ozonul prezintă mezoimerie:  $\text{O}=\text{O}-\text{O} \leftrightarrow \text{O}-\text{O}-\text{O}$ :



Ozonidă

Mecanismul scindării urmat de recombinație se bazează pe faptul că dacă reacția este realizată în prezența unei cetone rezultă două ozonide:

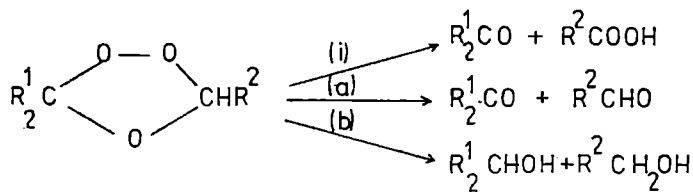


Ozonidele se prepară prin dizolvarea compusului olefinic într-un solvent care nu este afectat de ozon ca de ex. cloroform, tetraclorură de carbon, acid acetic glacial, eter de petrol, etc., după care prin soluție se trece un curent de oxigen ozonizat. Tratamentul ulterior poate fi unul dintre procedeele următoare:

(i) Ozonida este oxidată cu ajutorul oxidului de argint, a peroxidului de hidrogen sau peracizilor, obținându-se astfel acizi și/sau cetone.

(ii) (a) Reducerea ozonidei cu zinc și un acid, sau hidrogen și nichel Raney, sau trifenilfosfină, dă aldehide și/sau cetone.

(b) Reducerea poate fi realizată deasemenea cu hidrură de litiu și aluminiu sau borohidruură de sodiu; în acest caz produșii sunt alcoolii corespunzători compușilor carbonilici formați la punctul (a):

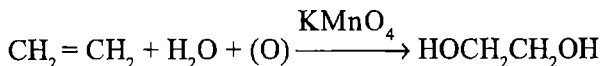


Procesul complet de preparare a ozonidei și descompunere a ei (inclusiv identificarea produșilor formați) este cunoscut sub numele de ozonoliză și este utilizat pentru determinarea poziției legăturilor duble într-un compus olefinic. Ozonoliza este deasemenea utilizată ca un mijloc de preparare a aldehydelor, cetonelor și acizilor. Cromatografia, în special cromatografia gaz-lichid și cromatografia în strat subțire, au fost folosite pentru izolarea produșilor. Cu toate acestea, există tendința de a utiliza peroxidul de hidrogen concomitent cu acidul periodic în locul ozonolizei (vezi reactivul Lemieux, la formarea diolilor).

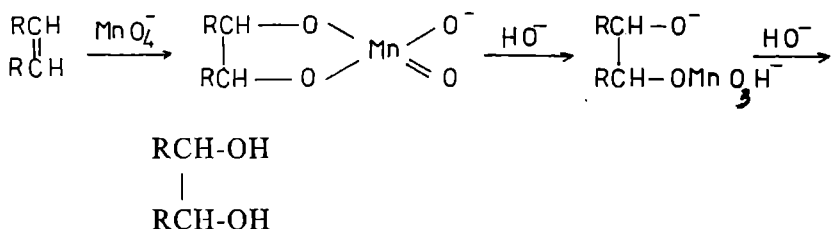
### *Prepararea și proprietățile derivaților hidroxilați*

Compușii conținând una sau mai multe legături duble izolate pot fi hidroxilați ușor. Hidroxilarea constă în adăugarea de grupări hidroxil pentru a forma compuși dihidroxi- sau polihidroxi. Reacția de hidroxilare poate fi efectuată prin mai multe modalități:

(i) cu ajutorul unei soluții diluate de permanganat alcalin la rece (cis-hidroxicolare). În acest fel etena a fost transformată în etilen glicol:

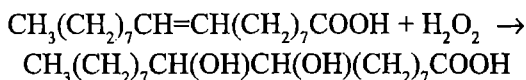


Există ipoteza că mecanismul hidroxicolării cu permanganat decurge prin intermediul unui intermediar ciclic:



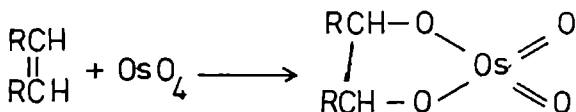
Mecanismul de mai sus se bazează pe faptul că utilizarea permanganatului de potasiu marcat cu  $^{18}\text{O}$  duce la un glicol marcat la ambii atomi de oxigen.

(ii) Cu ajutorul peroxidului de hidrogen în acid acetic glacial sau și mai bine în acid formic. În aceste condiții acidul oleic este transformat în acid 9,10-dihidroxicaric:



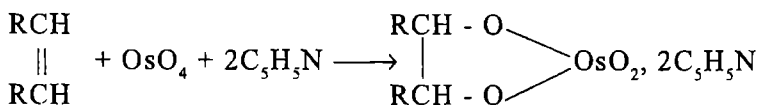
Adiția peroxidului de hidrogen poate fi catalizată de diferiți oxizi: tetraoxid de osmiu în t-butanol (adiție cis), dioxid de seleniu în t-butanol sau acetonă (adiție trans).

(iii) Cu ajutorul tetraoxidului de osmiu. Acest compus se adăunează foarte ușor la legăturile duble etilenice, la temperatura camerei:



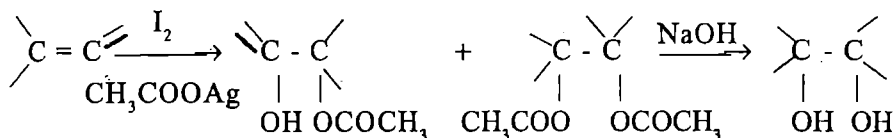
Acești compuși ciclici (esteri osmici), prin refluxare cu soluție etanolic apoasă de bisulfid de sodiu, sunt hidrolizați la 1,2-glicoli (cis-glicoli).

Dacă adiția tetraoxidului osmic este realizată în prezență de piridină, se obțin compuși cristalizați, de obicei cu randament teoretic:



Mai convenabil decât tetraoxidul de osmiu este tetraoxidul de ruteniu care este mai puțin toxic.

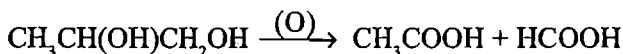
(iv) cis-Hidroxilarea unei legături duble poate fi deasemenea efectuată prin tratarea alchenei cu iod și acetat de argint în prezență de acid acetic apos, urmat de hidroliza alcalină a amestecului de mono- și di-acetați:



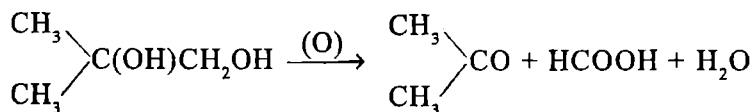
Dacă reacția de mai sus se realizează în acid acetic uscat, di-acetatul și diolul au configurația trans.

Glicolii (sau alchenele înseși) sunt ușor oxidați la acizi sau cetone cu permanganat sau dicromat, ambii în mediu acid, natura produșilor fiind determinată de structura glicolului. De ex. :

(a) Propilen glicolul dă acid acetic și acid formic:

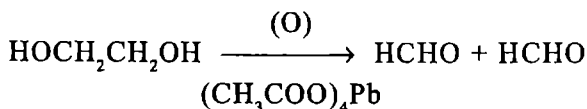


(b) Izobuten glicolul dă acetonă și acid formic:

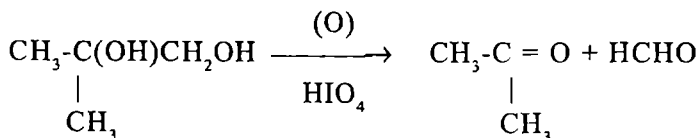


Oxidarea unui glicol poate fi deasemenea efectuată cu tetraacetat de plumb,  $(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{Pb}$ , sau acid periodic,  $\text{HIO}_4$  sau  $\text{H}_5\text{IO}_6$ , produșii fiind aldehide sau cetone, în funcție de structura glicolului. De ex.:

(a) Etilen glicolul dă două molecule de formaldehidă:



(b) Izobuten glicolul dă acetonă și formaldehidă:

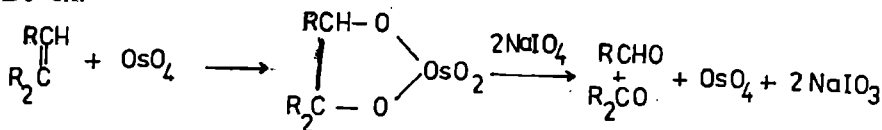


Se poate vedea că oridecâteori este utilizat un agent oxidant, glicolul este scindat în două fragmente, având loc ruperea catenei de carbon între cei doi atomi de carbon care poartă grupări hidroxil. Deoarece acești doi atomi de carbon sunt uniți împreună printr-o legătură dublă în alchena originală, identificarea celor două fragmente (care pot fi acizi, aldehide sau cetone) va indica poziția legăturii duble în alchenă. De ex.



Metoda clivării oxidative a legăturilor olefinice descrisă mai sus a fost înlocuită prin reactivul Lemieux. Acesta este mai avantajos atât pentru determinarea poziției unei legături duble cât și pentru prepararea compușilor carbonilici. Reactivul constă dintr-o soluție de periodat de sodiu și urme de permanganat de potasiu. Alchena este oxidată la cis-diol, care este apoi clivată de către periodat la aldehide și/sau cetone. Aldehidele sunt oxidate mai departe de către permanganat la acizi (formaldehida este obținută deobicei dintr-o alchenă terminală). Reacția are loc la temperatura camerei iar manganul în formă de oxidare inferioară este reoxidat la gradul de oxidare mai înalt de către periodat (de aceea sunt necesare numai urme de permanganat).

În loc de permanganat sunt recomandate urme de tetroxid de osmiu; în acest caz rezultă aldehide, și nu mai are loc oxidarea suplimentară la acizi. De ex.



## ALCALIIZOMERIZAREA

S-a observat că încălzirea acizilor grași polinesaturați cu hidroxizi alcalini la temperaturi de 150-200°C în solvenți adecvați duce la un amestec de izomeri cu absorbție puternică în UV. Metoda este specifică în funcție de numărul de legături duble, lungimea catenei fiind practic fără semnificație, produșii rezultând având coeficienți de extincție cu valoare ridicată.

Mediul de izomerizare este o soluție 21% de KOH în etilen glicol (timp de izomerizare 25 min) sau o soluție de 11% de KOH în glicerol (timp de izomerizare 45 min) iar încălzirea se face la temperatura de 180°C în atmosferă inertă sau în aer. S-a observat că în urma tratamentului de mai sus acidul linoleic (dar și acizii grași dienici) dau o curbă cu un singur maxim, diene conjugată, la

233 nm. În aceleași condiții acidul gamma-linolenic (dar și alți acizi trienoici) dau curbe cu două maxime: la 233 nm (dienă conjugată) și 268 nm (trienă conjugată). Acidul arahidonic (și alți acizi grași tetraenoici) dă un spectru de absorbție cu următoarele maxime: 233 nm (dienă), 268 nm (trienă), 315 nm (tetraenă); acizii grași pentaenoici mai dau în plus față de acidul arahidonic un maxim la 346 nm (pentaenă). Acizii hexaenoici dau spectre cu următoarele maxime: 233 nm (dienă), 268 nm (trienă), 315 nm (tetraenă), 346 (pentaenă) și 374 nm (hexaenă). Comparând rezultatele de mai sus se poate conchide că: absorbția la 233 nm este caracteristică dienei, la 268 - trienei, la 315 - tetraenei, la 346 - pentaenei, la 374 nm - hexanei. Tabelul 2.6 prezintă coeficienții de extincție specifică a unor acizi polinesaturați.

Tabelul 2.6.

**Valori de referință pentru utilizarea în analiza  
spectrofotometrică**

Acid izomerizat	Coeficient de extincție specifică la:		
	233 nm	268 nm	315 nm
Acid arahidonic	59,3	53,4	22,6
Acid linolenic	60,9	53,2	-
Acid linoleic	86,0	-	-

Au fost propuse metode analitice spectrofotometrice pentru dozarea acizilor polinesaturați în diferite materiale biologice. Pentru aceasta au fost elaborate ecuații matematice din care rezultă procentul din fiecare acid gras polinesaturat în amestec. Se determină coeficienții de extincție specifică a probei date și se iau în calcul coeficienții de extincție specifică a eșantioanelor pure din acizii respectivi. De ex. :

$$100 k_{315} = x K_{315}^4$$

$$100 k_{268} = x K_{268}^4 + y K_{268}^3$$

$$100 k_{233} = x K_{233}^4 + y K_{233}^3 + z K_{233}^2$$

unde: x, y, z sunt procentele de acid arahidonic, linolenic și respectiv linoleic din amestecul care ar conține cei trei acizi;  $k_{315}$ ,  $k_{268}$  și  $k_{233}$  sunt coeficienții de extincție specifică ai probei la respectivele lungimi de undă;  $K_{315}^4$  este coeficientul de extincție specifică a acidului tetraenoic la 315 nm etc.

*Sinteza.* Acizii grași polinesaturați au fost sintetizați îndeosebi prin intermediul derivaților poliinici. Iată o sinteză a acidului arahidonic (D. A. van

Dorp, 1969): alcoolul propargilic se obține prin reacția dintre formaldehidă și acetilenă după care se transformă în sarea de sodiu a 2-prop-2'-inil oxipiranului. Ultimul compus reacționează cu bromura de amil în mediu de amoniac lichid după care gruparea protectoare oxipiran este eliminată prin hidroliză cu acid p-toluen sulfonic; se obține 1-hidroxi-2-octină care prin reacție cu tribromură de fosfor duce la 1-brom-2-octină. Reacția cu sarea de sodiu a 2-prop-2'-inil oxipiranului se repetă de două ori obținându-se în final 1-brom-2,5,8-tetradecatriină. Brom-triina reacționează cu acidul 5-hexinoic rezultând, după hidroliză, acidul 5,8,11,14-eikosatetraioic. Acest acid prin hidrogenare pe catalizator Lindlar dă acidul arahidonic. Catalizatorul Lindlar constă din paladiu metalic fin divizat, otrăvit cu ioni de plumb ( $Pb^{2+}$ ) (H. Lindlar, 1956).

În tabelul 2.7. prezentăm câțiva acizi poliinoici mai importanți (D. A. van Dorp, 1969).

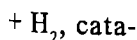
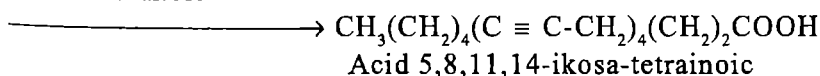
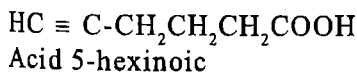
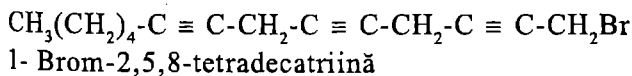
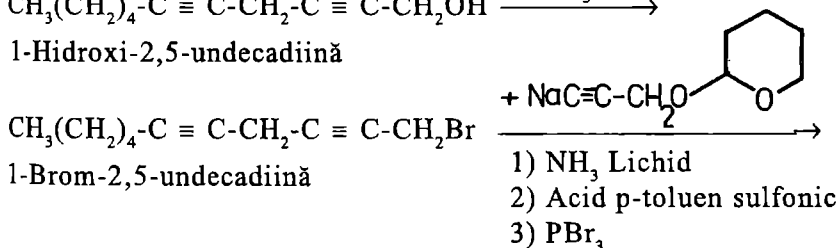
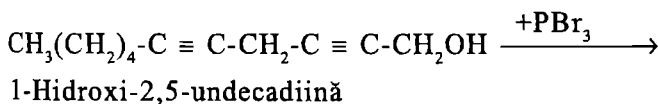
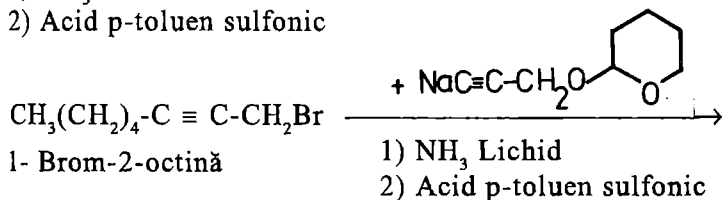
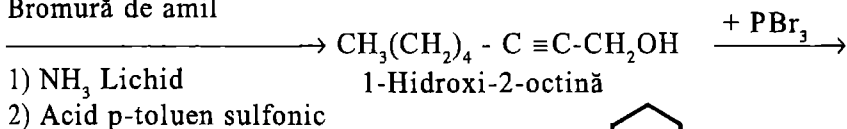
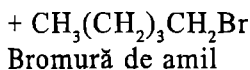
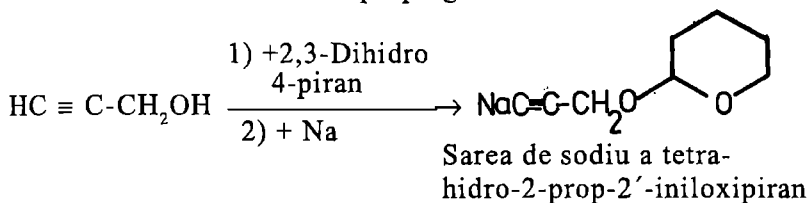
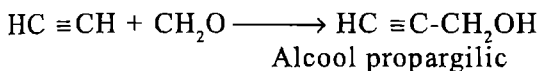
Tabelul 2.7.

**Punctele de topire ale acizilor tri- și tetraioici**

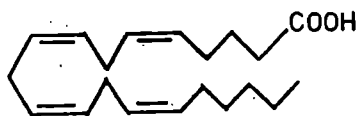
Acidul	Tipul acidului	P. t.
Acid triioic	18 $\omega$ 4	47-48,5
	19 $\omega$ 5	48,5-49,5
	20 $\omega$ 5	65-66
	$\omega$ 6	51-52
	$\omega$ 7	63,5-65,5
	$\omega$ 8	50-51
	$\omega$ 9	70,5-71,5
	21 $\omega$ 7	56-57,5
	22 $\omega$ 8	55-57
Acid tetraioic	18 $\omega$ 6	112-113
	19 $\omega$ 5	81-82
	$\omega$ 6	80-80,5
	20 $\omega$ 6	82-82,5
	21 $\omega$ 6	64-67
	$\omega$ 7	82-83,5
	22 $\omega$ 6	82-82,5

Sinteza acidului arahidonic decurge prin următoarele reacții:



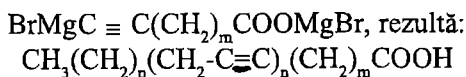


lizador  
Lindlar

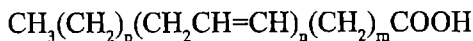


Acid arahidonic

Trebuie adăugat că metoda de sinteză de mai sus prezintă o mare elasticitate. Astfel pomind de la  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_p\text{CH}_2\text{Br}$  și realizând de (n-1) ori reacția cu sarea de sodiu a tetrahidro-2-prop 2'-iniloxipiranului, iar în final cu compusul bromagnezian



Iar prin reducere cu catalizator Lindlar se obține:



Se observă că în funcție de valoarea lui p este obținut acidul dintr-o anumită serie:

p=0	ω-3
p=3	ω-6
p=6	ω-9
p=4	ω-7

Pe această cale au fost sintetizați numeroși acizi grași polinesaturați, cu catenă și grad de nesaturare variabile (vezi și Tabelul 2.7) (C. B. Struijk și colab. 1966; K. Beerthuis și colab. 1968).

#### *Proprietăți fizice ale acizilor nesaturați*

Acidul oleic: p.t.  $\alpha$  13,0-13,2°C,  $\beta$  16,0-16,3°C (forme polimorfe); p. f. 200-201°C/1,2 mm, 215-216°C/5 mm, 234°C/15 mm;  $n_D^{20} = 1,4585$ ; densitatea (20°) = 0,8905; indice de iod 89,0. Oleatul de metil: p. t. -19,6- -19,9°C:  $n_D^{20} = 1,4522$ . Acidul oleic este solubil în: acetona, metanol, eter.

Acidul linoleic: p. t. -5°C,  $n_D^{50} = 1,4588$ ,  $n_D^{20} = 1,4699$ ; indice de iod 181; p. f. 202°C/1,4 mm: densitatea (18°) = 0,9038. Linoleatul de metil: p. t. -35°C,  $n_D^{25} = 1,4593$ , indice de iod 172,4. Acidul linoleic este solubil în acetona, alcool, eter; eter de petrol.

Acidul arahidonic: p. t. -49,5°C; p. f. 163°C/1 mm; densitatea (20°) = 0,9082;  $n_D^{20} = 1,4824$ . Acidul arahidomic este solubil în: acetona, eter, metanol, eter de petrol.

Acidul 5,8,11,14,17-ikosapentaenoic a fost găsit în: ulei din ficat de pește (sardea (*Sardinia pilchardus*), J. M. Whitcutt și colab. 1956; cod, hering (*Clupea harengus*), hering american (*Brevoortia tyrannus*), W. Stoffel și E. H. Ahrens, 1958, 1960; E. Klenk și Brucker-Voigt, 1961), fosfatidele ficatului bovin (E. Klenk și O. Montag, 1957), musculatura inimii (L. Hörhammer și colab. 1959), suprarenale bovine (E. Klenk și H. Eberhagen, 1961).

*Confirmări metabolice ale interrelației structurale  
ale acizilor polinesaturați*

După cum s-a mai spus, relațiile metabolice, din ce în ce mai complete, ale compușilor organici naturali, constituie argumente din ce în ce mai evidente în sprijinul structurilor chimice. Unele rezultate, legate de aceasta, din lucrările lui E. Klenk și D. A. Van Dorp sunt prezentate în Fig. 2.2 și în Fig. 2.3.

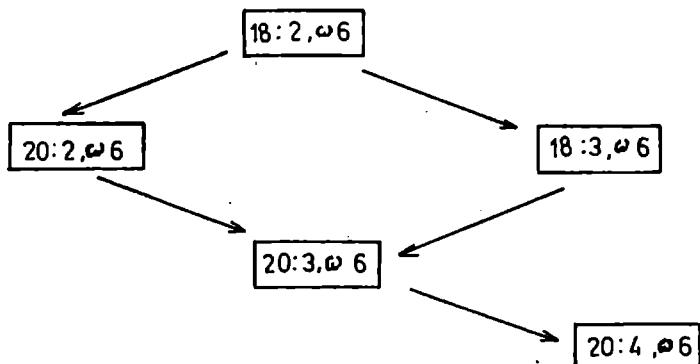


Fig. 2.2. Biosinteza acidului arahidonic din acid linoleic (D. A. Van Dorp, 1969).

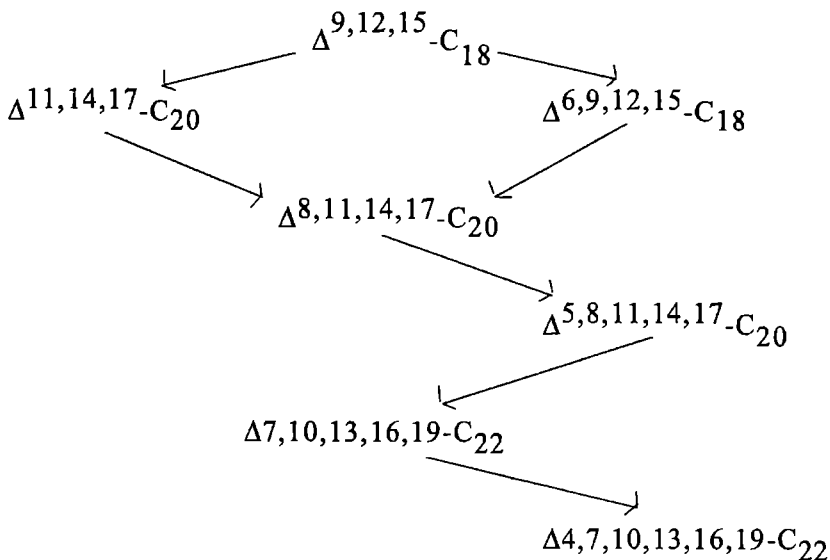
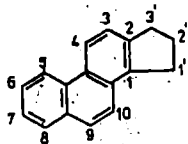


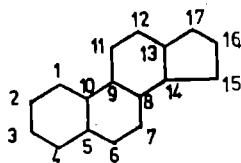
Fig. 2.3. Transformarea acizilor polienoici de tip linolenic. Săgețile îndreptate spre stânga indică alungirea catenei, iar cele îndreptate spre dreapta indică dehidrogenarea (E. Klenk și H. Mohrhauer, 1960).

## 2.3.2. STEROIZII

Steroizii, un grup de compuși înrudiți structural, sunt larg răspândiți în organismele animale și vegetale. Steroizii includ sterolii (compuși hidroxilici de la care provine și denumirea de *steroid*), vitamina D, acizii biliari, un număr de hormoni sexuali, hormonii cortexului suprarenalei, câteva hidrocarburi cancerigene, anumite sapogenine etc. La baza structurilor steroizilor este scheletul perhidro-1,2-ciclopentofenantrenului:



1,2-Ciclopentofenantren



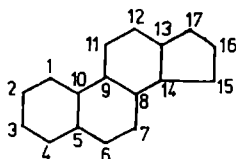
Perhidro 1,2-ciclopentofenantren

Toți steroizii dau, prin dehidrogenare cu seleniu la  $360^{\circ}\text{C}$ , hidrocarbura lui Diels. De aici definiția: este steroid orice compus care dă hidrocarbura lui Diels prin distilare cu seleniu la  $360^{\circ}\text{C}$ . (Când distilarea cu seleniu se realizează la  $420^{\circ}\text{C}$ , steroizii dau îndeosebi crisenă și, într-o cantitate redusă, picenă).

### 2.3.2.1. Clasificarea steroizilor

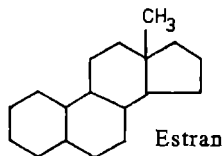
Steroizii se clasifică după numărul de atomi de carbon din moleculă sau după funcția lor. În general există o suprapunere a celor două criterii, după cum se va vedea în continuare. Utilizarea primului criteriu este dublată de existența unei hidrocarburi de referință care, de cele mai multe ori, poate fi obținută din steroidul respectiv. Astfel, steroizii se clasifică în felul următor.

1.  $\text{C}_{17}$ -Steroizi. Hidrocarbura de bază este gonanul ( $\text{C}_{17}\text{H}_{28}$ ):



Gonan

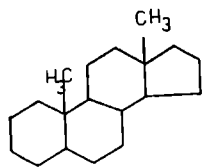
2.  $\text{C}_{18}$ -Steroizi. Hidrocarbura de bază este estranul ( $\text{C}_{18}\text{H}_{30}$ ), care se distinge prin existența unei grupări metil la C-13:



Estran

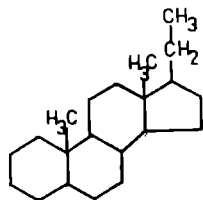
De acest grup țin toți hormonii estrogeni naturali.

3.  $C_{19}$ -Steroizi. Hidrocarbura de bază este androstanul ( $C_{19}H_{32}$ ), care posedă câte o grupare metil la C-10 și C-13. În acest grup se găsesc toți hormonii androgeni naturali.



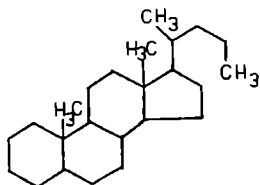
Androstanul

4.  $C_{21}$ -Steroizi. Hidrocarbura de bază este pregnanul ( $C_{21}H_{36}$ ), având câte o grupare metil la C-10 și C-13 și o catenă laterală de doi atomi de carbon la C-17. Aici aparțin toți corticosteroidii naturali:



Pregnan

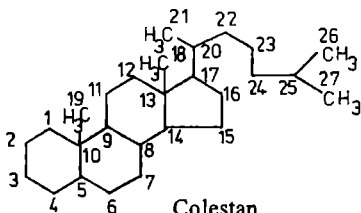
5.  $C_{24}$ -Steroizi. Hidrocarbura de bază este colanul ( $C_{24}H_{42}$ ); compusul posedă câte o grupare metil la C-10 și C-13 și o catenă laterală ramificată, constând din cinci atomi de carbon, la C-17:



Colan

Aici se găsesc cea mai mare parte a acizilor biliari.

6.  $C_{27}$ -Steroizi. Hidrocarbura de bază este colestanul ( $C_{27}H_{48}$ ); în pozițiile C-10 și C-13 se găsesc câte o grupare metil iar la C-17 o catenă laterală ramificată constând din opt atomi de carbon:



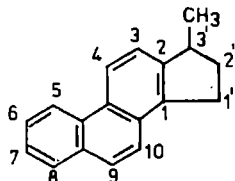
Colestan

Un reprezentant important al acestui grup este colesterolul.

Hidrocarburi de referință pentru alți steroizi naturali sunt ergostanul (24-metil-5 $\alpha$ -colestan), stigmastanul (24-etil-5 $\alpha$ -colestan) etc. (Vezi mai departe semnificația lui  $\alpha$ ).

### 2.3.2.2. Hidrocarbura lui Diels

Hidrocarbura lui Diels, cu formula moleculară C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>, este un compus solid cu p.t. 126-127°C. Degradarea oxidativă, analiza cu raze X pe substanța cristalizată precum și analiza spectrelor au dovedit că hidrocarbura lui Diels este 3'-metil-1,2-ciclopentenofenantren:



Hidrocarbura lui Diels  
(3'-Metil-1,2-ciclopentenofenantren)

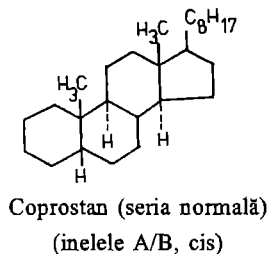
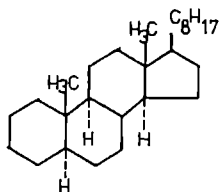
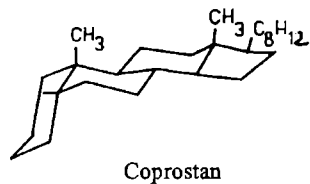
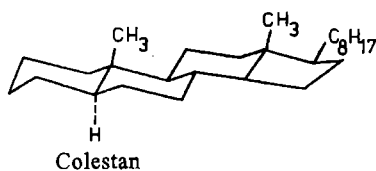
Structura compusului numit hidrocarbura lui Diels a fost confirmată și prin sinteză.

### 2.3.2.3. Izomeria sterolilor

Derivații perhidro 1,2-ciclopenteno fenantrenului conținând substituenți la C-3, C-10, C-13 și C-17 prezintă un număr de izomeri optici de ordinul zecilor sau chiar sutelor. Se observă că un astfel de compus posedă opt carboni asimetrici, prin urmare există  $2^8 = 256$  izomeri. Dintre aceștia, cel puțin în momentul actual, sunt mai importanți izomerii la C-3, C-5 și C-17.

*Izomeria C-3.* Atomul de carbon trei se găsește, la mulți steroizi, în starea de hibridizare  $sp^3$ . Prin urmare un substituent se va găsi fie deasupra planului general al moleculei fie dedesubt. Când molecula este proiectată în plan astfel încât catena laterală de la C-17 se găsește în dreapta sus plasarea unui substituent (de cele mai multe ori o grupare hidroxil) deasupra planului (spre cititor) este desemnată cu  $\beta$  iar în caz contrar cu  $\alpha$ ; în primul caz valența substituentului este reprezentată printr-o linie continuă iar în al doilea printr-o linie punctată.

*Izomeria C-5.* Primele două cicluri ale perhidro-1,2-ciclopenteno-fenantrenului pot fi legate între ele prin două legături ecuatoriale (ca în trans-decalină) sau printr-o legătură ecuatorială și una axială (ca în cis-decalină); primul tip de legătură este regăsit în colestani iar al doilea în coprostan:



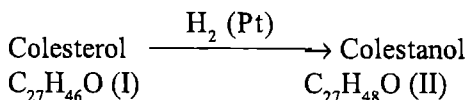
În toți steroidii inelele B și C, și C și D sunt unite între ele prin legături trans.

Se mai observă că un atom de hidrogen la C-5 poate fi orientat în configurația  $\alpha$  sau  $\beta$ . Când acest atom de hidrogen este  $\alpha$ -orientat ciclurile A și B sunt legate în configurația *trans* iar în cazul  $\beta$ -orientării atomului de H de la C-5, ciclurile A și B sunt legate în configurația *cis*. Atomul de hidrogen de la C-5 este  $\alpha$ -orientat în toți hormonii steroidi care conțin un atom de hidrogen în acea poziție. Dimpotrivă, acizii biliari posedă un atom de hidrogen  $\beta$ -orientat la C-5. Concluzia este că legătura cis între inelele A și B este caracteristică acizilor biliari iar legătura trans tuturor hormonilor steroidi care posedă un atom de hidrogen la C-5. Legătura trans dă o structură aproape plană în timp ce legătura cis dă o structură încovoiată.

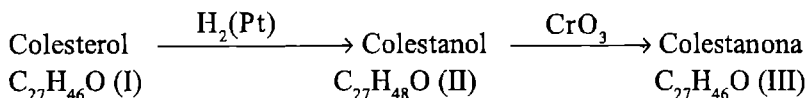
#### 2.3.2.4. Structura colesterolului

1. *Grupări funcționale.* Formula moleculară a colesterolului este  $C_{27}H_{46}O$ ; în stare pură colesterolul se prezintă ca un solid cu p.t.  $149^{\circ}C$ .

Molecula de colesterol posedă o legătură dublă. Rezultă aceasta din adiția hidrogenului (în prezența platinei) precum și din adiția bromului când se obține un compus dibromurat.

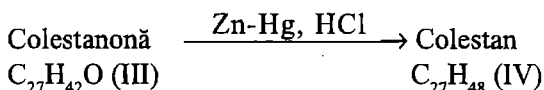


Atomul de oxigen aparține unei grupări hidroxil secundare: prin oxidare se obține o cetonă, colestena; dacă oxidarea este precedată de hidrogenare compusul obținut este colestanona:



Când o soluție de colesterol se amestecă cu o soluție de digitonină (o saponină), se formează un precipitat abundent de digitonidă de colesterol. Acesta este un complex molecular conținând o moleculă de colesterol și una de digitonină, din care componentele pot fi recuperate prin dizolvarea complexului în piridină (care realizează disocierea completă) și apoi adăugând eter: colesterolul rămâne în soluție iar digitonina este precipitată. Formarea digitonidei este utilizată pentru estimarea colesterolului. Un aspect interesant este că 3 β-hidroxisteroidii formează de obicei complexe cu digitonina, în timp ce compușii 3α corespunzători nu formează.

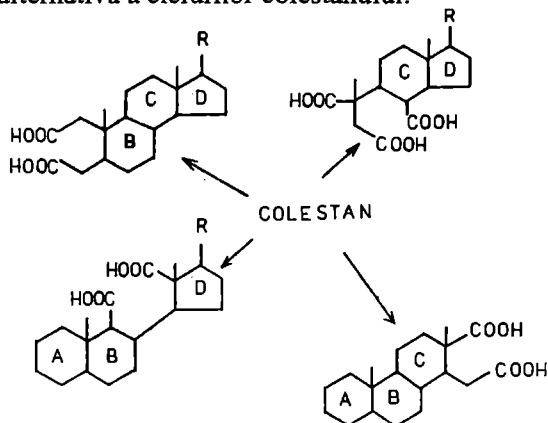
2. *Structura sistemului ciclic.* Hidrogenarea colestanonei duce la colestan:



Colestanul este o hidrocarbură saturată și se observă că posedă cu opt atomi de hidrogen mai puțin decât alcanul corespunzător ( $\text{C}_{27}\text{H}_{56}$ ); prin urmare molecula colesterolului este tetraciclică.

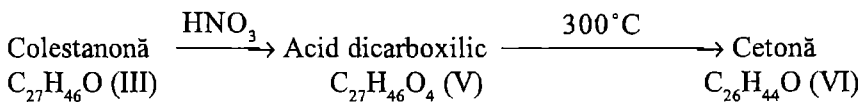
Când colesterolul este distilat cu seleniu la 360°C se obține hidrocarbura lui Diels; prin urmare la baza structurii sale este scheletul perhidro 1,2-ciclopenteno fenantrenului.

S-a arătat că ciclurile A, B și C din molecula colesterolului sunt de șase atomi iar ciclul D este de cinci atomi. La această concluzie s-a ajuns prin identificarea produșilor de oxidare ai colestanului: s-au izolat compuși rezultați prin deschiderea alternativă a ciclurilor colestanului:





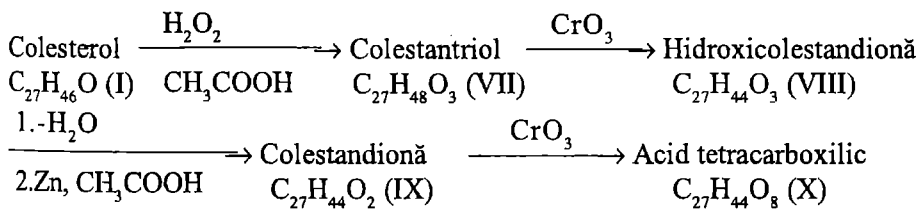
3. *Pozițiile grupării hidroxil și a legăturii duble.* Se consideră următoarele reacții:



Deoarece acidul dicarboxilic V conține același număr de atomi de carbon ca și cetona III din care este derivat, gruparea ceto din III trebuie prin urmare să fie într-un ciclu. Deasemenea, deoarece piroliza acidului dicarboxilic V produce o cetonă prin pierderea unui atom de carbon rezultă din regula lui Blank că V este fie un acid dicarboxilic 1,6 sau 1,7. (NOTA: regula lui Blank afirmă că: la încălzire cu anhidridă acetică acizii 1,5-dicarboxilici formează anhidride ciclice iar acizii 1,6-dicarboxilici formează ciclopentanone prin eliminare de dioxid de carbon). Am văzut că molecula colesterolului conține trei cicluri de șase atomi și unul de cinci atomi. Astfel acidul dicarboxilic V trebuie să fie obținut prin deschiderea ciclurilor A, B sau C și prin urmare gruparea hidroxil din colesterol (care a fost convertită în grupare ceto în colestanonă este în ciclul A, B sau C).

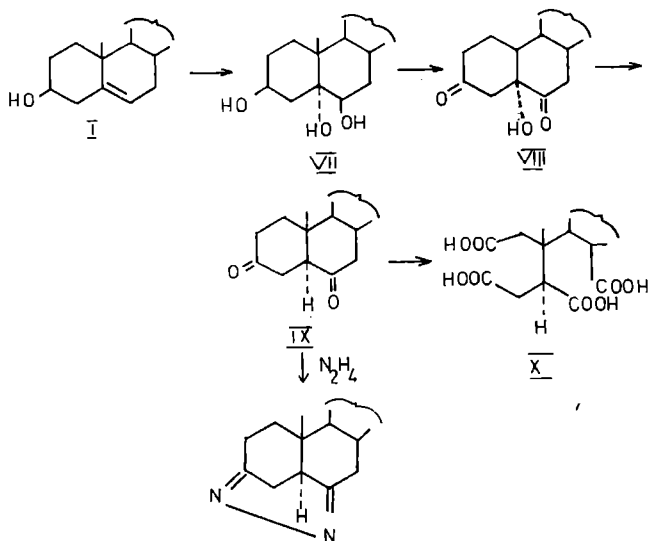
De fapt când colestanonă este oxidată se obțin *doi* acizi dicarboxilici izomeri. Formarea acestor doi acizi arată că gruparea ceto din colestanonă este flancată pe fiecare latură de către o grupare metilen, adică în colestanonă este prezentă gruparea  $-\text{CH}_2\text{COCH}_2-$ . Un astfel de aranjament este posibil numai dacă gruparea hidroxil este în ciclul A.

Să considerăm acum următorul set de reacții:



În conversia lui I la VII, legătura dublă din I este hidroxilată. Deoarece numai două din cele trei grupări hidroxil din VII sunt oxidate pentru a rezulta VIII, aceste două grupări sunt grupări hidroxilice secundare (una dintre acestea fiind grupare hidroxil secundară în colesterol), iar a treia, fiind rezistentă la oxidare, este grupare hidroxil terțiară. Deshidratarea lui VIII (prin încălzire în vid) și reducerea ulterioară a legăturii duble formează pe IX iar acesta, prin oxidare, duce la un acid tetracarboxilic fără pierdere de atomi de carbon. Astfel cele două grupări ceto din IX sunt situate în cicluri diferite; dacă cele două grupări ceto erau în același ciclu s-ar fi pierdut un atom de carbon și X nu ar mai

fi fost obținut. Rezultă deci că gruparea hidroxil și legătura dublă din colesterol sunt situate în cicluri *diferite*. În plus, deoarece IX formează cu hidrazina un derivat piridazinic, rezultă că IX este o  $\gamma$ -dicetonă. Plasarea grupării hidroxil în ciclul A a fost deja justificată; dacă admitem că gruparea hidroxil este situată în ciclul A în poziția 3 și legătura dublă între C-5 și C-6, reacțiile de mai sus sunt ușor de explicat. (NOTĂ: acolada arată că restul moleculei este intact; aceasta constituie o convenție internațională de reprezentare):

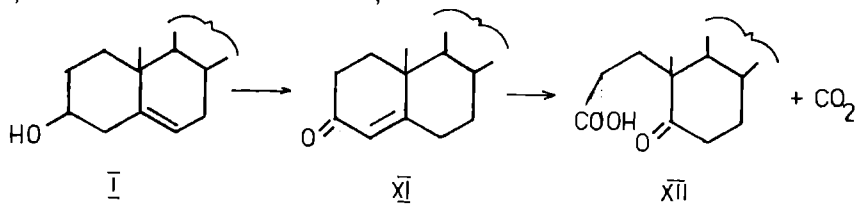


### Derivat piridazinic

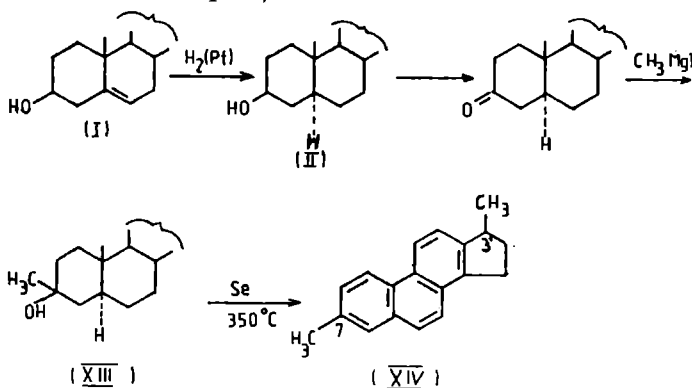
Reamintim că liniile pline reprezintă grupările care se situează deasupra planului, iar liniile întrerupte grupările care sunt situate sub plan.

O dovadă suplimentară pentru interpretarea de mai sus provine din faptul că la încălzirea colesterolului cu oxid de cupru la  $290^\circ\text{C}$  se obține colestenona XI iar aceasta la oxidarea cu permanganat formează ceto-acidul XII cu pierderea unui atom de carbon. Formarea lui XII indică că gruparea ceto și legătura dublă în colestanonă sunt în același ciclu. Spectrul de absorbție în ultraviolet al colestenonei XI,  $\lambda_{\text{max}}$  240 nm, arată că gruparea ceto și legătura dublă sunt conjugate. Aceste rezultate pot fi explicate dacă se presupune că legătura dublă din colesterol migrează la formarea colestenonei XI, explicația cea mai simplă fiind

că gruparea hidroxil este în poziția 3 iar legătura dublă între carbonii 5 și 6, poziția 5 fiind comună ciclurilor A și B. Astfel:

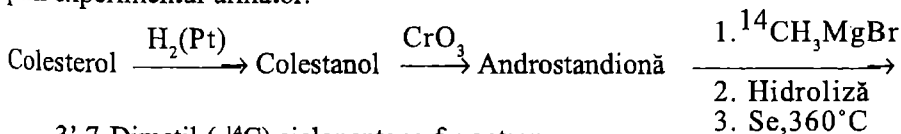


Poziția grupării hidroxil la C-3 în ciclul A a fost dovedită definitiv prin experimentele lui Kon et al (1939). Acești autori au redus colesterolul I la colestanol (II), l-au oxidat pe acesta la colestanonă (III), au tratat-o pe aceasta cu iodură de metil-magneziu și au dehidrogenat produsul, alcoolul terțiar XIII, la 3',7-dimetilciclopenteno-fenantren (XIV) cu ajutorul seleniului. Structura lui XIV a fost dovedită prin sinteză, așa că reacțiile pot fi formulate după cum urmează, cu hidroxilul în poziția 3:



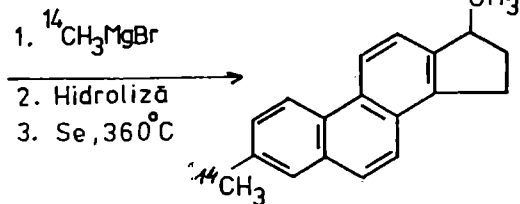
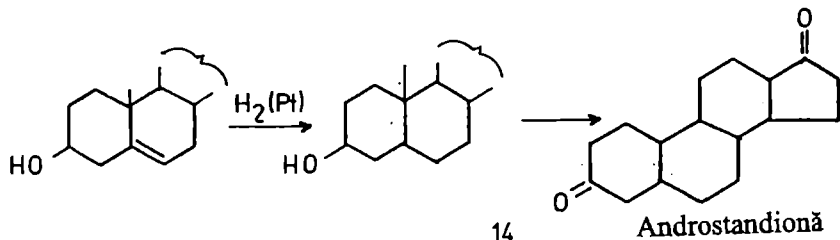
### Natura și poziția catenei laterale

1. Poziția catenei laterale, în raport cu gruparea hidroxil, a fost stabilită prin experimentul următor:



3',7-Dimetil ( $^{14}\text{C}$ ) ciclopenteno fenantren

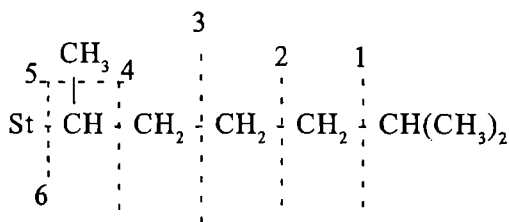
Rezultă de aici că poziția catenei laterale a colesterolului este la C-17 iar reacțiile de mai sus decurg astfel:



3',7-Di-(<sup>14</sup>C)-metil-ciclopenteno-fenantren

2. Natura catenei laterale a fost stabilită prin experimentul următor: acetilarea colesterolului produce colesteril acetat iar acesta, la oxidare cu CrO<sub>3</sub>, formează o cetonă antrenabilă cu vapori și acetatul unei hidroxicetone, ultimul compus nu este antrenat cu vapori de apă. Cetona s-a dovedit a fi izohexil metil cetonă, CH<sub>3</sub>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Prin urmare scheletul hidrocarbonat al acestei cetone constituie catena laterală a colesterolului, punctul de atașare al acesteia fiind C-17.

Analiza mai detaliată a degradării oxidative a catenei laterale a colesterolului a arătat că această degradare decurge în următoarele etape:

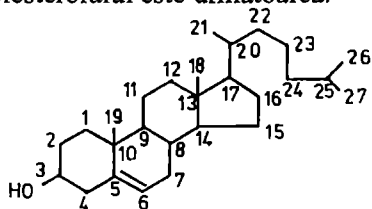


(St este nucleul steroidic)

Prin urmare primul fragment detașat prin oxidare din catena laterală a colesterolului este acetona, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, urmat de câte un atom de carbon sub formă de CO<sub>2</sub>.

Studiul fragmentelor de oxidare a colesterolului și colestanolului a dus deasemenea la elucidarea poziției celor două grupări metil. Rezultatele de mai

sus, corelate cu analiza RMN, difracție cu raze X, studii metabolice etc., au arătat că structura colesterolului este următoarea:

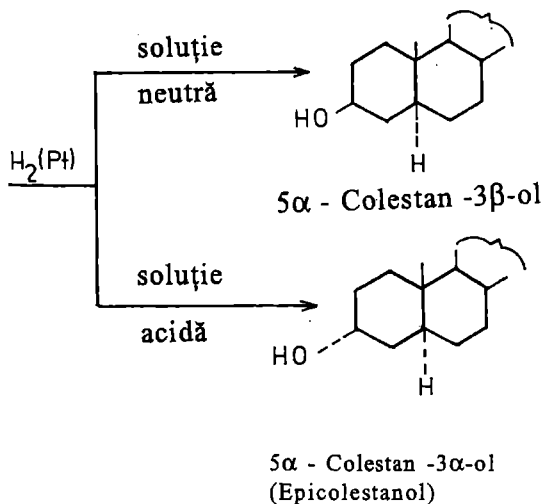
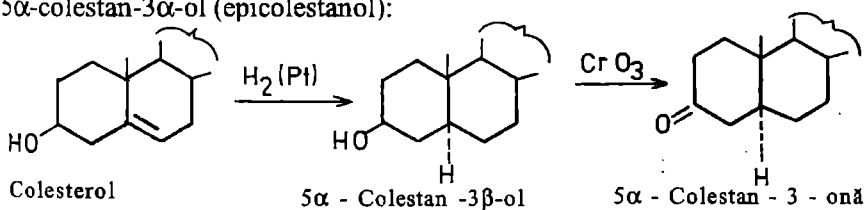


Colesterol (3- $\beta$ -Hidroxi-5-colesten)

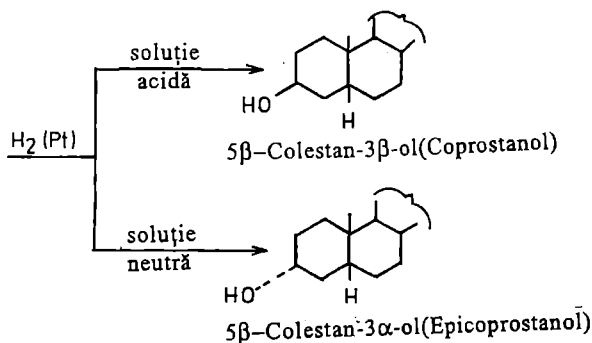
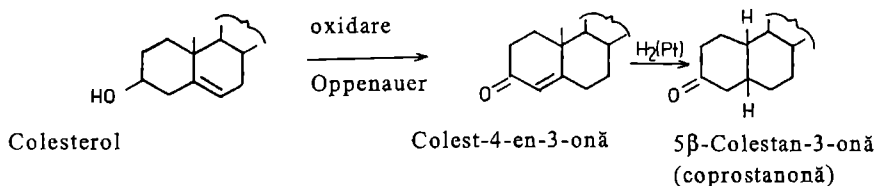
(NOTĂ. În cazul steroizilor și a lipidelor gruparea metil este reprezentată printr-o liniuță).

### 2.3.2.5. Relații fizico-chimice între stereozomeri

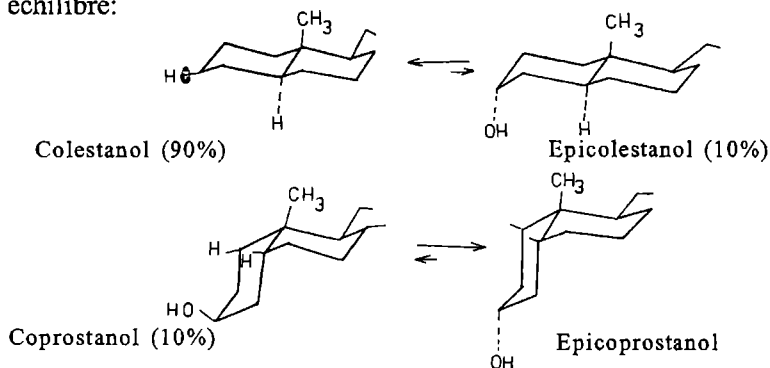
Hidrogenarea catalitică (Pt) a colesterolului duce exclusiv la 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol (colestanol). Pe de altă parte, oxidarea 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol cu CrO<sub>3</sub> în acid acetic dă 5 $\alpha$ -colestan-3-onă iar aceasta, prin reducere catalitică în soluție neutră, dă îndeosebi 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol, în timp ce reducerea în soluție acidă dă 5 $\alpha$ -colestan-3 $\alpha$ -ol (epicolestanol):



Epimerii C-5 corespunzători, 5 $\beta$ -coleston-3- $\beta$ -ol (coprostanol) și 5 $\beta$ -coleston-3 $\alpha$ -ol (epicoprostanol) au fost preparați din colesterol astfel:



Etoxidul de sodiu, la temperatura de 180°C, duce la stabilirea următoarelor echilibre:

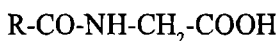


Poziția unei legături duble izolate în compușii steroidici a fost investigată prin tratarea compusului cu tetroxid de osmiu pentru a se obține esterul osmic ciclic care a fost redus cu LiAlH<sub>4</sub> la 1,2-di-ol iar acesta a fost clivat cu tetraacetat de plumb. Analiza produșilor oxo a dus la localizarea poziției legăturii duble etilenice.

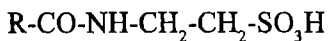
Tetroxidul de ruteniu a fost deasemenea utilizat; acesta duce direct la ruperea legăturii duble, și prezintă avantajul că este mai puțin toxic decât tetroxidul de osmiu.

### 2.3.2.6. Acizii biliari

Acizii biliari se găsesc în cantități apreciabile în vezica biliară. Hidrocarbura de referință pentru acizii biliari este colanul,  $C_{24}H_{42}$ . Acizii biliari propriu-ziși sunt compuși steroidici monocarboxilici hidroxilați. În bilă ei se găsesc sub formă de amide, rezultate prin eliminarea unei molecule de apă între gruparea carboxil a acidului biliar și gruparea amino a glicocolului sau a taurinei. De ex. acidul colic se găsește sub formă de sare de sodiu a acidului glicocolic și a acidului taurocolic:



Acid glicocolic



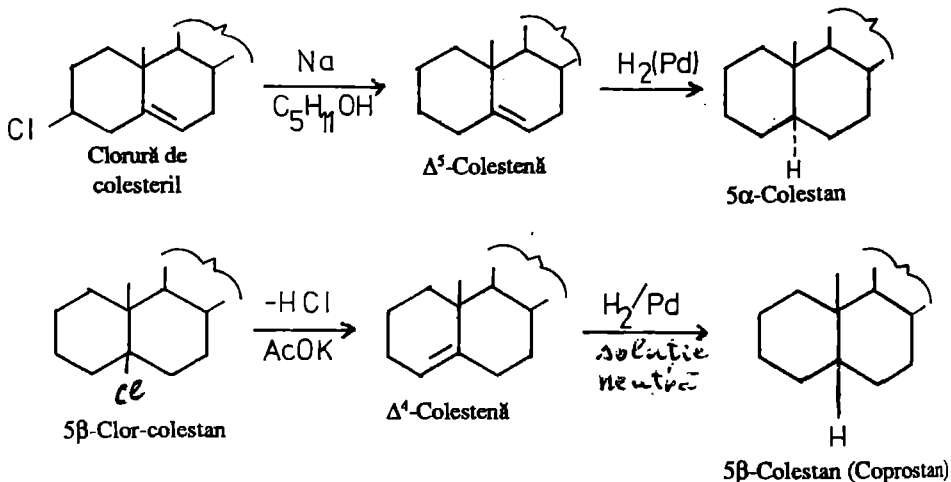
Acid taurocolic

Prin hidroliză rezultă acidul biliar ca atare și glicocol sau taurină. Acizii biliari majoritari din bila de om sunt:

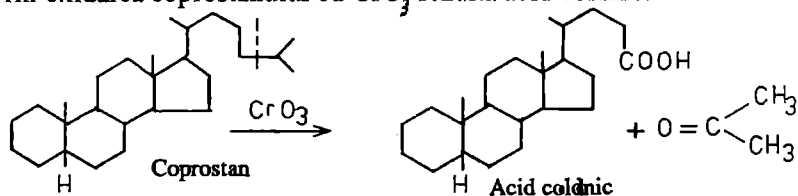
- acidul colic,  $C_{23}H_{39}O_3-COOH$
- acid deoxicolic,  $C_{23}H_{39}O_2-COOH$
- acidul litocolic  $C_{23}H_{39}O-COOH$

Pozițiile grupărilor hidroxil din acizii biliari au fost localizate prin degradarea oxidativă; astfel s-a constatat că acestea se găsesc în fragmentul steroidic astfel: la acidul colic în pozițiile 3,7,12; la acidul deoxicolic în pozițiile 3,12; la acidul chenodeoxicolic în pozițiile 3,7 iar la acidul litocolic în poziția 3. S-a constatat că acizii biliari nu sunt precipitabili cu digitonină, prin urmare toate grupările hidroxil se găsesc în configurația  $\alpha$ . Prin încălzire în vid acizii biliari se deshidratează ducând la acizi steroidi nesaturați: acidul colic duce la un amestec de acizi colatrienici, acizii deoxicolic și chenodeoxicolic se transformă într-un amestec de acizi coladienici iar din acidul colic se obține acid colenic. Toți acești acizi se transformă prin hidrogenare într-un acid numit *acid colanic*. Prin urmare acidul colic este acid  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihidroxil colanic; acidul deoxicolic este acid  $3\alpha$ ,  $12\alpha$ -dihidroxil colanic; acidul chenodeoxicolic este acidul  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ -dihidroxil colanic iar acidul litocolic este acid  $3\alpha$ -colanic.

Poziția și lungimea catenei laterale a acizilor biliari au fost clarificate astfel. Atomul de carbon C-5 din acizii biliari are configurația  $5\beta$  identică cu  $5\beta$ -colestonul (coprostanul);  $5\alpha$ -colestonul și  $5\beta$ -colestonul rezultă din colesterol prin următoarele reacții:

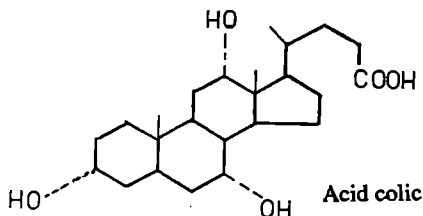


Prin oxidarea coprostanului cu  $\text{CrO}_3$  rezultă acid colanic:



5 $\alpha$ -Colestanul duce prin oxidare la un izomer al acidului colanic, acidul allocolanic.

Prin urmare structura acidului colic este următoarea:



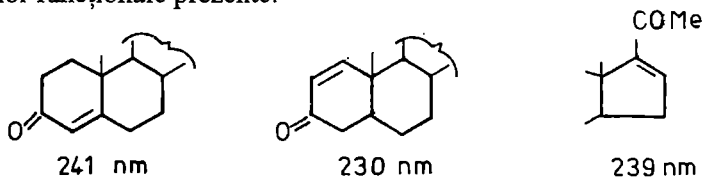
### 2.3.2.7. Proprietăți spectrale ale steroizilor

1. *Spectroscopia în IR.* În studiul structurii steroizilor cele mai importante grupări pentru spectroscopia în IR sunt: OH, C=O, C=C, C=C-C=O, COOH, COOR. Maximele de absorbție a acestor grupări sunt cele indicate în Tabelul 1.10. S-a arătat că dacă nucleul conține două grupări ceto, fiecare prezintă un maxim de absorbție propriu, cele două maxime fiind mai mult sau mai puțin



apropiate, în funcție de structura studiată. De ex. compusul 3,17-diceto (1719 și 1745  $\text{cm}^{-1}$ ) și compusul 11,17-diceto (1713 și 1751  $\text{cm}^{-1}$ ). În ultimul caz cele două grupări ceto sunt suficient de apropiate pentru a permite interacția vibrațională.

2. *Spectroscopia în UV*. Maximele de absorbție în UV sunt caracteristice grupărilor funcționale prezente:



După cum se observă datele de mai sus privesc sisteme conjugate; în privința legăturilor duble izolate, spectroscopia în UV detectează legături duble de tipul  $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}_2$  (170-210 nm).

3. *Spectrele RMN* ale steroizilor prezintă deasemenea anumite regularități. Astfel steroizii prezintă o regiune „amprăntă” care este caracteristică protonilor CH și  $\text{CH}_2$  din nucleul steroic. Deasemenea, protonul grupării =CH- are o valoare  $\tau$  definită astfel că detectarea și evaluarea numerică a acestor grupări rezultă din spectrul RMN protonic.

S-a găsit că grupările metil angulare la C-10 și C-13 au deplasări chimice care depind de prezența diferitelor grupări funcționale ca de ex. C=C, C=O. Astfel gruparea 3-ceto determină o deplasare de 0,15 ppm pentru linia metilului C-19, dar nu are nici un efect asupra liniei grupării metil C-18. Prin urmare se poate deduce atât natura cât și poziția unei grupări funcționale în moleculă. S-a găsit de ex. că protonii metil ai unei grupări acetoxi au o valoare  $\tau$  caracteristică ce depinde de poziția sa în nucleu. În felul acesta se poate determina poziția unei grupări hidroxil în moleculă.

4. *Spectrometria de masă* este extrem de utilă pentru analiza structurală a steroizilor. Acești compuși dau de obicei un ion molecular abundent astfel că este ușor de determinat masa moleculară și formula moleculară. Se mai observă de regulă patru maxime: (a)  $(\text{M}-\text{R})^+$ , unde R este catena laterală; (b)  $(\text{M}-(\text{R}+42))^+$ , unde 42 este masa fragmentului  $\text{C}_3\text{H}_6$ ; (c)  $(\text{M}-15)^+$ , datorată pierderii unui metil angular; (d)  $(\text{M}-(\text{R}+42+15))^+$ . Datorită acestui model caracteristic de fragmentare, este ușor de detectat un nucleu steroic.

Hidroxi-steroizii prezintă un maxim la  $m/e$  egal cu  $(\text{M}-18)^+$  datorat pierderii apei și un maxim la  $(\text{M}-(18+15))^+$  datorat pierderii apei și a grupării metil

angulare. Pe de altă parte modelul de fragmentare al cetonelor depinde de poziția grupării ceto.

### 2.3.3. Esteri ai colesterolului

Colesterol esteraza hidrolizează esterii colesterolului, obținându-se colesterolul liber și acidul gras respectiv (L. Swell și C. R. Treadwell, 1955).

Esterii colesteril ai unor acizi grași au fost preparați prin încălzirea colesterolului cu acidul gras respectiv la 200°C timp de 3-4h (L. H. Page și H. Rudy, 1930); metoda a fost aplicată la obținerea oleatului de colesteril (L. Swell și C. R. Treadwell, 1955). S-au obținut unii esterii cu randamente de 40-46% refluxând un amestec de colesterol și acidul gras respectiv în benzen (E. L. Cataline și colab., 1944). O serie de esterii ai colesterolului cu lungimea catenei variabilă au fost preparați de către Swell și Treadwell prin reacția dintre clorurile acide corespunzătoare și colesterol, cu excepția acidului oleic (vezi Tabelul 2.8).

Pentru a obține esterii colesterolului cu acizii oleic, linoleic și linolenic s-a utilizat un preparat enzimatic din pancreas bovin (E. R. Diller și colab., 1962). A fost elaborată și o metodă chimică pentru prepararea esterilor colesterolului cu acizi grași cu catenă lungă, îndeosebi a celor polinesaturați. Principiul metodei este următorul: colesteril acetatul reacționează, de exemplu, cu arahidonatul de etil în prezența etilatului de sodiu care este catalizator. În aceste condiții are loc o interesterificare a grupărilor carboxil. Arahidonatul de colesteril obținut astfel este purificat cromatografic pe acid silicic și recristalizat din acetonă la -20°C (V. Mahadevan W. O. Lundberg, 1962; V. Mahadevan, 1963).

Esterii colesterolului cu acizii grași au fost izolați și din plasma sanguină umană (J. Hirsch și E. J. Ahrens Jr., 1958).

*Proprietăți.* Arahidonatul de colesteril, cristale de culoare albă, are p.t. 24-25°C,  $[\alpha]_D^{25} = -23,4^\circ$  (c=5% în cloroform). La cromatografie în strat subțire se obține un singur spot. Arahidonatul de metil a fost identificat prin cromatografie gaz-lichid după recuperarea sa din arahidonatul de colesteril (W. Stoffel și colab., 1959).

Unele proprietăți fizice ale esterilor grași cu colesterolul sunt prezentate în tabelul 2.8.

Unele proprietăți ale esterilor colesterolului cu acizii organici.

Esterul colesterolului	Punct de topire*		Masa moleculară		$[\alpha]_D^{20}$ ***
	Soluție turbure °C	Soluție limpede °C	Teoretică	Găsită**	
acetat	-	114,0	428,7	424,5	-43,5
propionat	97,0	113,0	442,7	434,8	-40,6
butirat	102,0	111,0	456,7	458,8	-35,4
valerat	87,5	90,0	470,9	471,7	-34,3
izovalerat	109,8	110,5	470,9	463,3	-34,6
caproat	93,5	94,5	484,9	481,1	-32,5
caprilat	104,6	106,0	512,9	505,5	-31,6
caprinat	83,0	91,0	540,9	536,3	-28,7
laurat	91,8	92,0	569,0	558,6	-27,5
miristat	73,0	80,0	537,0	588,1	-26,5
palmitat	75,0	80,5	625,8	618,8	-25,4
stearat	71,0	79,5	653,1	639,2	-25,1
oleat	-	45,0	651,1	-	-21,6

\* Esterii colesterolului se topesc formând un lichid turbure care încălzit în continuare se transformă într-un lichid limpede.

\*\* Determinată din indicele de saponificare

\*\*\* Determinată pe soluție 5% în cloroforn

### 2.3.4. Fosfolipidele

Fosfolipidele se clasifică, după scheletul de bază al moleculei în:

- fosfoglicerolipide
- sfingolipide

Fosfoglicerolipidele sau glicerofosfatidele se clasifică în:

- acid fosfatidic
- fosfatidil serină
- fosfatidil etanolamină
- fosfatidil colină (lecitină)
- fosfatidil glicerol
- di-fosfatidil glicerol (cardiolipină)
- fosfoinozotide

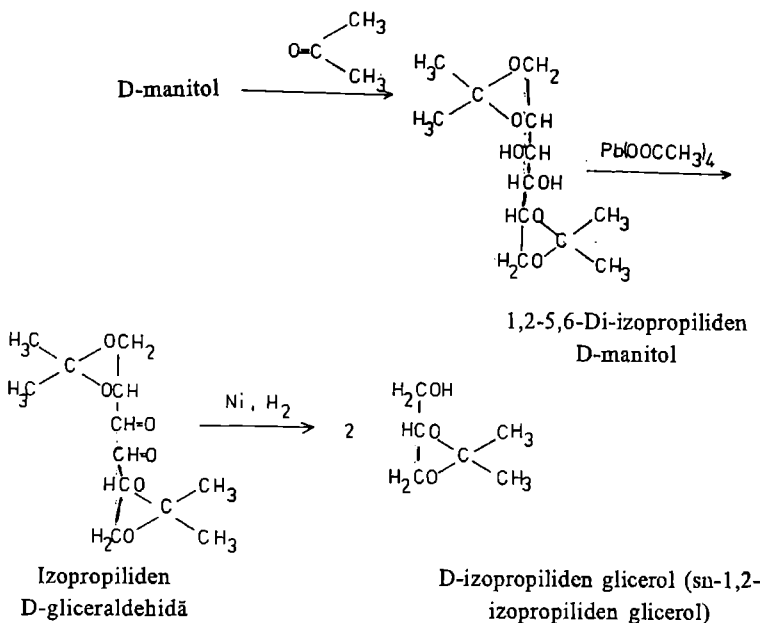
#### 2.3.4.1. Fosfoglicerolipide și derivați

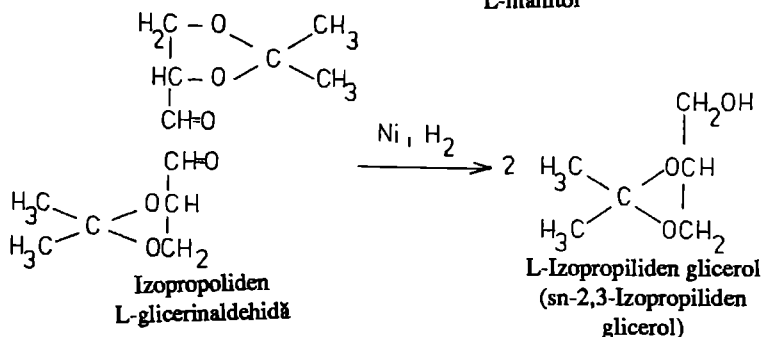
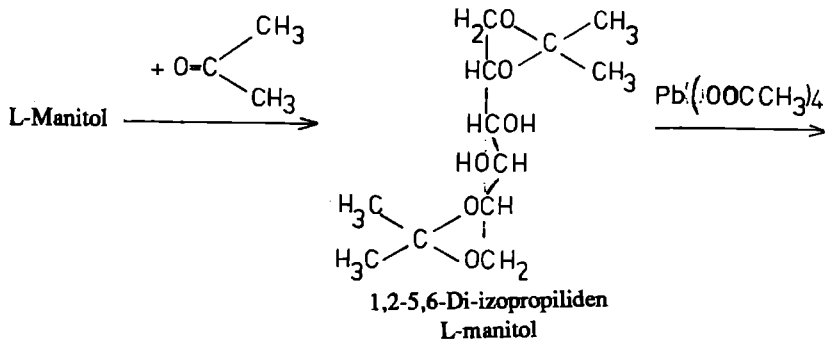
Lecitina este una dintre fosfoglicerolipidele cele mai cunoscute și mai larg răspândite în natură. Lecitina a fost descoperită de către Gobley care a găsit-o în gălbenușul de ou, în icrele și lapții de crap, în creier de găină, în sângele uman

și bovin. Structura lecitinei a fost sugerată de către Strecker și s-a dovedit corectă; în cadrul acestei structuri acidul fosforic este atașat la unul dintre hidroxilii primari ai glicerolului. Această formulă a fost susținută de observația că acidul glicerolfosforic rezultat prin hidroliza lecitinei este optic activ, cu toate că rotația specifică este foarte acăzută (R. Willstätter și K. Lüdecke, 1904). Acidul glicerofosforic poate fi optic activ numai dacă acidul fosforic este atașat la unul dintre hidroxilii terminali ( $\alpha$ ) a glicerolului.

Structura exactă a fosfoglicerolipidelor naturale a devenit posibilă odată cu sinteza formelor optic active a izopropiliden glicerolului, adică D-izopropiliden glicerol (sn-1,2-izopropiliden glicerol) și L-izopropiliden glicerol (sn-2,3-izopropiliden glicerol) (H. O. L. Fischer și E. Baer, 1937; E. Baer și H. O. L. Fischer, 1939). Acești derivați ai glicerolului substituiți asimetric și optic activi au devenit substanțe cheie în sinteza gliceridelor și fosfolipidelor optic active. Pe de altă parte, în virtutea relației lor stereochemice cunoscute cu D- și L-gliceraldehida, a devenit posibilă stabilirea configurației gliceridelor și fosfogliceridelor naturale.

D- și respectiv L-izopropiliden glicerolul se obțin în felul următor: D- și respectiv L-manitolul reacționează cu acetona în prezența clorurii de zinc; 1,2-5,6-diizopropiliden manitolul rezultat este clivat oxidativ cu tetraacetat de plumb. Producții de oxidare, doi moli de izopropiliden D-gliceraldehidă sau doi moli de izopropiliden L-gliceraldehidă, dau prin reducere catalitică D-izopropiliden glicerol (sn-1,2-izopropiliden glicerol) și respectiv L-izopropiliden glicerol (sn-2,3-izopropiliden glicerol):





Fosforilarea D-izopropiliden glicerolului cu oxicloriger de fosfor și chinolină, urmat de îndepărtarea grupării protectoare prin hidroliză acidă blândă, duce la acid L- $\alpha$ -glicerolfosforic pur cu o rotație specifică de  $-1,45^\circ$  (în acid clorhidric 2N). Rotația specifică are o valoare scăzută dar prin metilarea exhaustivă a sării de argint a acidului  $\alpha$ -glicerolfosforic cu iodură de metil și carbonat de argint rezultă dimetileterul  $\alpha$ -glicerofosfatului de dimetil, cu o rotație specifică considerabil mai ridicată și anume egală cu  $-4,8^\circ$  (Fig. 2.4.).

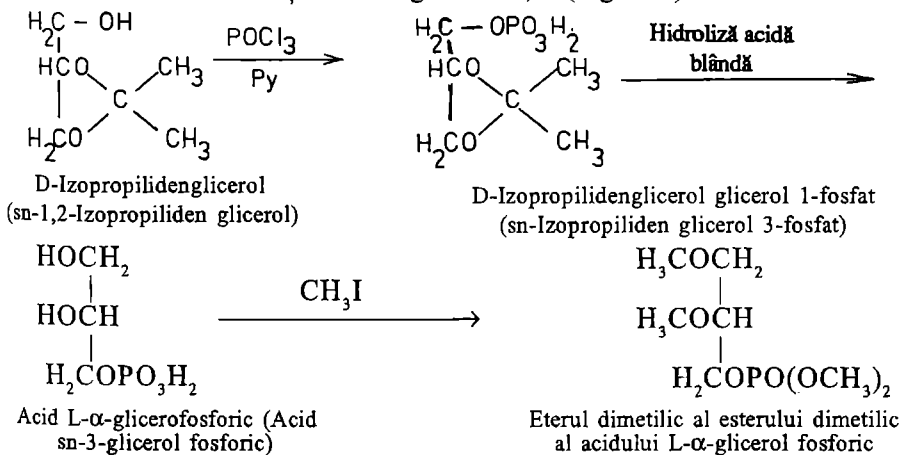
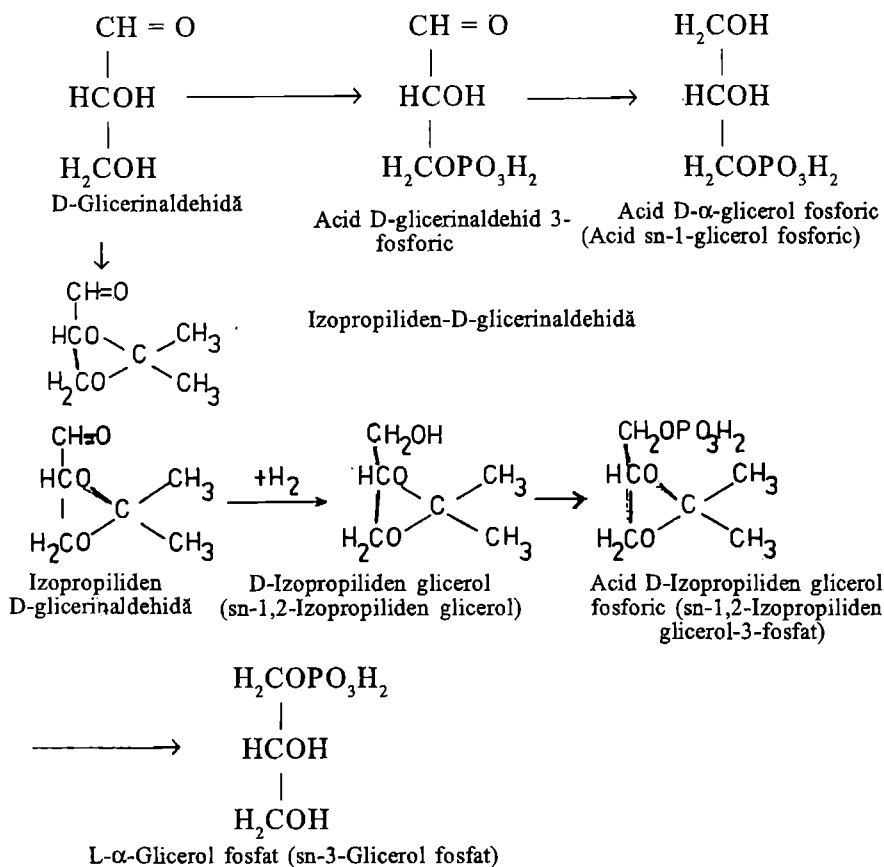


Fig. 2.4. Sinteza L- $\alpha$ -glicerolfosfatului

Odată preparat unul dintre cei doi stereoizomeri ai acidului  $\alpha$ -glicerolfosforic i s-a stabilit configurația după cum e indicat în următoarele reacții:



După cum se poate observa din reacțiile de mai sus acidul fosforic este atașat la gruparea hidroxil formată prin reducerea grupării carbonil a izopropiliden D-glicerinaldehidei (regăsită în D-izopropiliden glicerol). Acidul fosforic se găsește deci în poziția opusă cu cea ocupată de acidul fosforic din D-glicerinaldehid-3-fosfat sau produsul său de reducere D- $\alpha$ -glicerolfosfatul. Prin urmare fosforilarea D-izopropiliden glicerolului dă acid L- $\alpha$ -glicerolfosforic. Comparând activitățile optice ale derivatului dimetil-ester dimetil-eter al acidului L- $\alpha$ -glicerolfosforic sintetic cu al derivatului dimetil-ester dimetil-eter al acidului glicerol-fosforic obținut prin hidroliza lecitinei naturale s-a dovedit că în constituția lecitinei intră acidul L- $\alpha$ -glicerolfosforic.

$\alpha$ -Glicerilfosforil colina a fost preparată din autolizate de pancreas bovin (G. Schmidt și colab., 1945); un procedeu de sinteză al acestui compus a fost realizat de către Baer și Kates (1948) Fig. 2.5.).

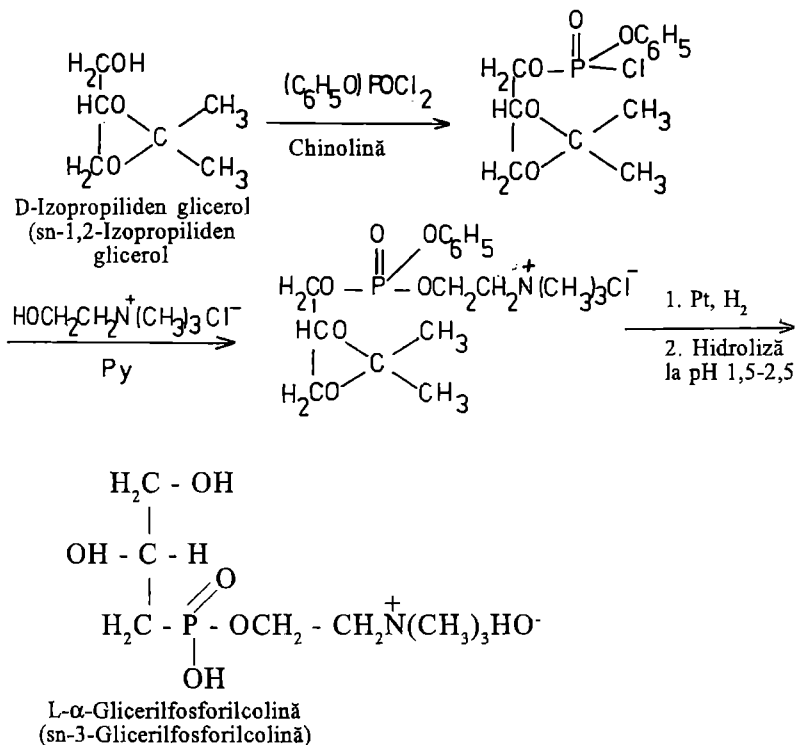


Fig. 2.5. Sinteza L- $\alpha$ -glicerilfosforil colinei (sn-3-Glicerilfosforilcolinei).

Au fost sintetizate deasemenea L- $\alpha$ -glicerilfosforil etanol amină și L- $\alpha$ -cefalină (E. Baer și colab., 1953) precum și L- $\alpha$ -lecitina (E. Baer și M. Kates, 1950). Comparația între L- $\alpha$ -glicerilfosforilcolină și L- $\alpha$ -glicerilfosforiletanolamină sintetice, pe de o parte, (E. Baer și H. C. Stancer, 1953) și respectiv compușii corespunzători obținuți din surse naturale, pe de altă parte, au arătat identitatea acestora. Astfel rotația specifică a L- $\alpha$ -glicerilfosforilcolinei sintetice este egală cu rotația specifică a glicerilfosforilcolinei naturale iar rotația specifică a L- $\alpha$ -glicerilfosforiletanolamnei sintetice este egală cu a glicerilfosforiletanolamnei naturale. S-a confirmat astfel structura tip  $\alpha$  și configurația L a lecitinei și cefalinei naturale.

S-a preconizat ca metodele de sinteză a lecitinei și cefalinei să demonstreze relația stereochemică a fosfolipidelor sintetice cu compușii stereochemici de referință D- și L-gliceraldehida. Atât sinteza L- $\alpha$ -lecitinei cât și L- $\alpha$ -cefalinei necesită ca substanță de pornire D- $\alpha$ ,  $\beta$ -digliceride. Prepararea acestora (J. Sowden și H. O. L. Fischer, 1941) este schițată în Fig. 2.6.

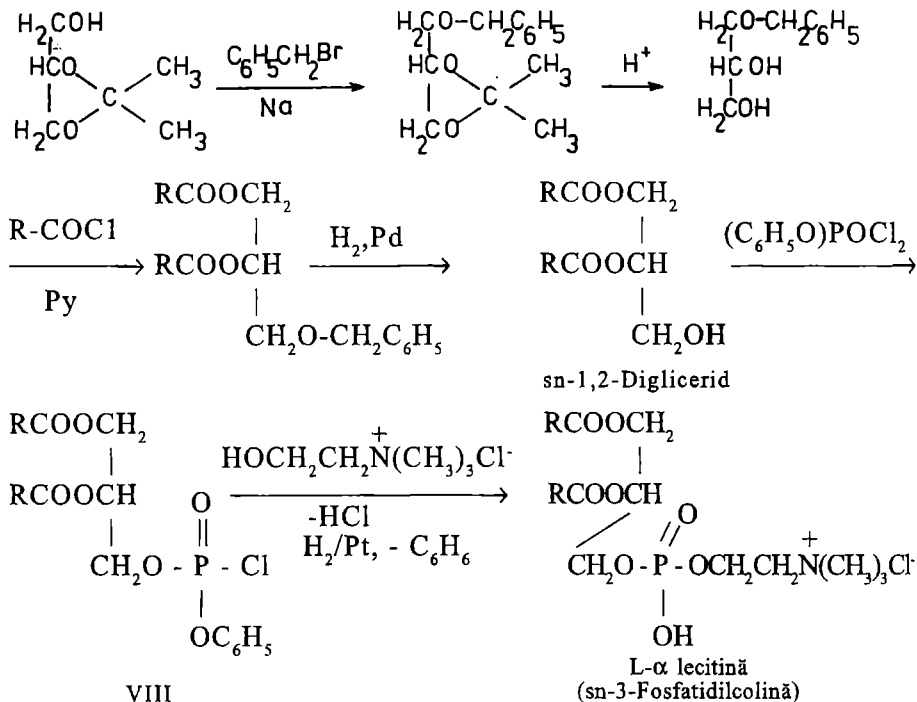


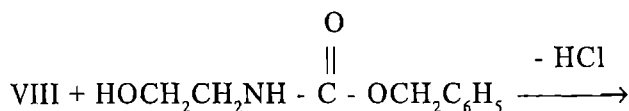
Fig. 2.6. Sinteza L- $\alpha$ -lecitinei (sn-3-Fosfatidilcolinei).

Izopropiliden glicerolul a fost convertit la eterul benzilic cu ajutorul sodiului și bromurii de benzil. Gruparea protectoare izopropiliden a fost apoi îndepărtată prin hidroliză acidă iar acizii grași au fost introduși prin acilare cu cloruri acide și piridină. Îndepărtarea grupării benzil prin hidrogenoliză catalitică a dus la D- $\alpha$ ,  $\beta$ -digliceridă. Acestea au fost fosforilate (E. Baer și M. Kates, 1950) (Fig. 2.6) cu fenil fosforil diclorură în piridină. Esterul fenil al clorurii acidului fosfatidic a fost esterificat cu colin clorură iar esterul fenil obținut al lecitinei a fost supus hidrogenolizei catalitice pentru îndepărtarea radicalului fenil. În acest fel au fost preparate o serie de L- $\alpha$ -lecitine omoloage cu acizi grași între 6 și 18 atomi de carbon (E. Baer și J. Maurukas, 1952; E. Baer, 1953; E. Baer și V. Mahadevan, 1959). L- $\alpha$ -(Dipalmitoil) lecitina sintetică și o dipalmitoil-lecitină izolată din *Cysticercus fasciolaris* (A. Lesuk și R. J. Anderson, 1941) și din organe (plămân, splină și creier) bovine (S. J. Thannhauser și colab., 1946, 1948) s-au dovedit a fi identice. Prin urmare fosfolipidul natural posedă structură  $\alpha$  și configurație L. Aceeași structură și configurație au fost atribuite lecitinei

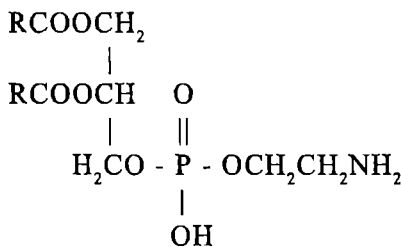
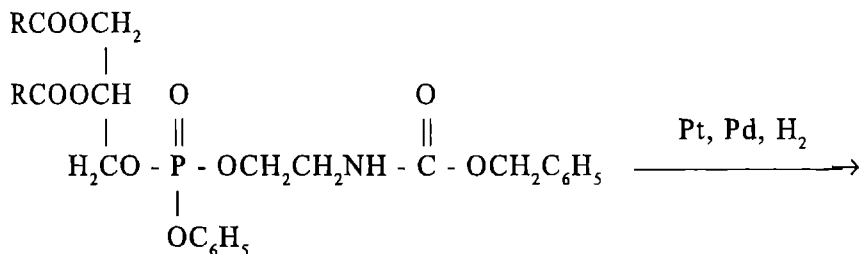


din gălbenuș de ou, întrucât la hidrogenare catalitică aceasta dă o distearoil lecitină care este identică în toate privințele cu L- $\alpha$ -(distearoil) lecitina sintetică.

Sinteza L- $\alpha$ -cefalinei (E. Baer și colab., 1951, 1952) seamănă cu cea a lecitinei:



Derivat carbobenzoxi al etanolamiei



L- $\alpha$ -cefalină

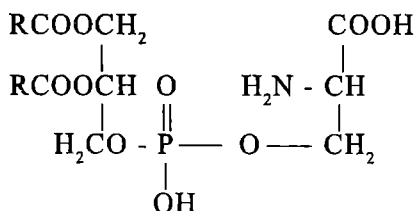
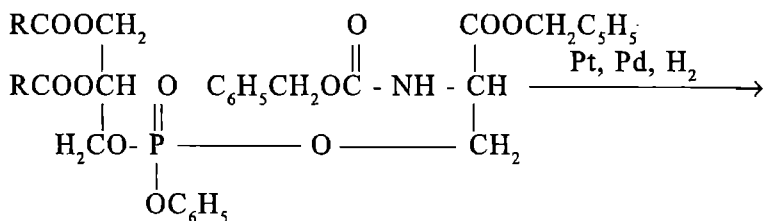
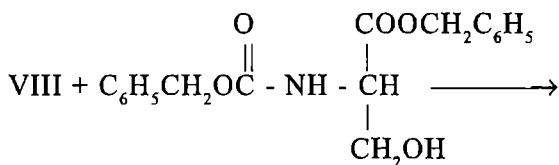
(sn-3-Fosfatidil etanolamină)

Pentru a evita fosforilarea grupării amino aceasta a fost protejată cu o grupare carbobenzoxi. Îndepărtarea simultană a grupărilor fenil și carbobenzoxi prin hidrogenoliză catalitică a dus la cefalină. Au fost preparate o serie de L- $\alpha$ -cefaline cu acizii: stearic, palmitic, miristic și caproic. Una dintre acestea, L- $\alpha$ -(distearoil) cefalina, s-a dovedit identică cu o cefalină izolată dintr-un amestec de fosfolipide hidrogenate din gălbenuș de ou. Prin urmare cefalina și lecitina din gălbenuș de ou posedă structura  $\alpha$  și configurație L.

Sinteza fosfatidil serinei (E. Baer și J. Maurukas, 1955), care fusese descoperită de Folch (1941, 1949), a decurs similar: s-a început cu sinteza L- $\alpha$ -fosfatidil-L-serinei (Fig. 2.7). D- $\alpha$ ,  $\beta$ -Distearina a fost fosforilată cu fenil-fosforildiclorură și piridină iar compusul rezultat a fost pus în reacție cu esterul benzilic al N-carbобенzoxi L-serinei, formându-se o nouă legătură ester

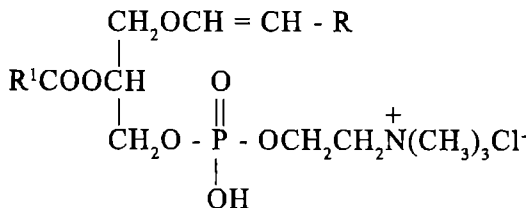
fosfat. Îndepărtarea simultană a celor trei grupări protectoare, prin hidrogenoliză catalitică, a dus la distearoil L- $\alpha$ -glicerofosforil-L-serină. Acest compus și produsul de reducere al fosfatidil serinei din creier bovin s-au dovedit compuși identici. Fosfatidil serina este deci a treia clasă majoră de fosfolipide naturale care posedă structura  $\alpha$  și configurația L. Deoarece plasmalogenii posedă și ei această structură și configurație este cert că structura  $\alpha$  și configurația L sunt comune pentru toate fosfoglicerolipidele naturale (Fig. 2.8).

Prin metode similare a fost sintetizată fosfatidil treonina (E. Baer și F. Eckstein, 1962); compusul a fost găsit apoi în gălbenuș de ou (D. N. Rhodes



L- $\alpha$ -Fosfatidil-L-serină  
(sn-3-Fosfatidil-L-serină)

Fig. 2.7. Sinteza L- $\alpha$ -fosfatidil-L-serinei (sn-3-fosfatidil-L-serină)



Plasmalogen  
(sn-1-Alchenil-2-acil-3-fosforilcolină-glicerol)

Fig.2.8. Configurația L- a plasmalogenilor.

și C. H. Lea, 1957) și în musculatura peștelui tuna (H. Igarashi și colab., 1957, 1958). În același timp au fost sintetizați N-monometil-cefalina și N, N-dimetil-cefalina (E. Baer și S. K. Pavanaram, 1961), compuși intermediari în biosinteza lecitinei, de la cefalina prin metilarea progresivă a grupării amino.

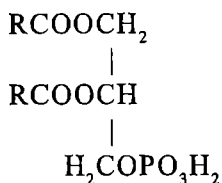
Întrucât în natură au fost găsite fosfolipide conținând doi acizi grași nesaturați identici (D. J. Hanahan și M. E. Jayko, 1952) s-a realizat și sinteza L- $\alpha$ -(dioleoil) lecitinei (E. Baer și colab., 1956). Sinteza a decurs astfel: D-izopropiliden glicerolul a fost fosforilat cu fenilfosforil diclorură și chinolină iar izopropiliden L- $\alpha$ -gliceril (fenil) fosforil clorura rezultată a fost esterificată cu etilenclorhidrină (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl) în piridină. Din produsul de reacție a fost îndepărtată gruparea fenil prin hidrogenoliză catalitică iar gruparea izopropiliden prin hidroliză acidă blândă. L- $\alpha$ -Glicerilfosforil etilen clorhidrina obținută astfel a fost acilată, ca sare de bariu, cu clorură de oleoil; tratarea produsului de reacție cu trimetilamină a dat L- $\alpha$ -(dioleoil) lecitina.

A fost pus la punct deasemenea un procedeu care permite atât obținerea lecitinelor saturate cât și nesaturate (E. Baer și D. Buchnea, 1959). Lecitina a fost obținută în acest caz prin acilarea L- $\alpha$ -gliceril fosforil colinei, sub formă de complex al clorurii de cadmiu, cu clorura acidă a acidului gras saturat sau nesaturat în prezența piridinei. Reacția de acilare decurge rapid, la temperatură scăzută, și dă cu randamente bune L- $\alpha$ -lecitina saturată sau nesaturată.

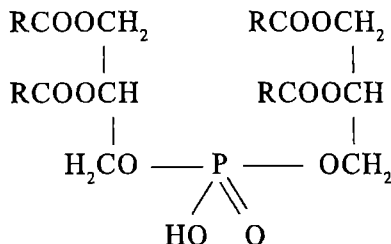
Au fost elaborate metode de sinteză a cefalinelor nesaturate, mai precis a L- $\alpha$ -(dioleoil) cefalinei (E. Baer și colab., 1963; E. Baer și J. Blackwell, 1964) care se pretează atât la obținerea  $\alpha$ -cefalinelor saturate cât și nesaturate. Prin fosforilarea D-izopropiliden glicerolului cu oxiclaură de fosfor și chinolină, urmat de esterificarea diclorurii acidului izopropiliden  $\alpha$ -gliceril fosforic cu 2-hidroxietyl-ftalimidă, îndepărtarea grupării izopropiliden prin hidroliză acidă blândă, acilarea sării de bariu a L- $\alpha$ -glicerilfosforil-2-hidroxietylftalimidei cu clorura acidă a acidului gras și îndepărtarea grupării ftaloil prin hidrazinoliză, se obține cefalina. S-au preparat astfel L- $\alpha$ -cefalina conținând acid stearic, palmitic, oleic și linoleic.

În natură se găsesc rar fosfolipide conținând doi acizi grași identici. Cel mai adesea fosfolipidele naturale posedă doi acizi grași diferiți, unul dintre ei în multe cazuri nesaturat. De aceea a fost sintetizată  $\alpha'$ -stearoil  $\beta$ -oleoil-L- $\alpha$ -cefalina precum și izomerul acesteia (E. Baer și D. Buchnea, 1961). Fosforilarea D- $\alpha'$ -stearoil  $\beta$ -oleoil glicerolului cu oxiclaură de fosfor și chinolină dă diclorura acidului fosfatidic; acesta, prin esterificare cu ftaloiletanolamină în piridină, formează N-ftaloilcefalina. Aceasta, prin tratare cu hidrazină, dă  $\alpha'$ -stearoil  $\beta$ -oleoil-L- $\alpha$ -cefalina.

Au mai fost sintetizați și alți esteri fosforici. Aceștia includ acizii fosfatidici și acizii bis-fosfatidici cu doi acizi grași saturați sau nesaturați, identici sau diferiți (E. Baer, 1952; E. Baer și D. Buchnea, 1958), fosfatidil gliceroli saturați și nesaturați (E. Baer și D. Buchnea, 1958), acid bis-(L- $\alpha$ -gliceril) fosforic (E. Baer și D. Buchnea, 1958), L- $\alpha$ -gliceril fosforil serina (E. Baer și colab., 1959):



Acid L- $\alpha$ -fosfatidic  
(Acid sn-3-fosfatidic)



Acid L- $\alpha$ -bisfosfatidic  
(Acid sn-3-bis-sn-3-fosfatidic)

## PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE FOSFOGLICERIDELOR ȘI DERIVAȚILOR LOR

1. *Acidul L- $\alpha$ -glicerofosforic* se prezintă ca un lichid siropos, incolor, ușor solubil în apă, metanol, etanol, dar insolubil în eter. De obicei se obține ca sare de bariu, care este mai solubilă în apă rece decât în apă caldă și precipită în formă cristalină când o soluție rece este adusă la punctul de fierbere. Ca sare de bariu L- $\alpha$ -glicerofosfatul nu are o activitate optică observabilă. Acidul liber are  $[\alpha]_D^{20} = -1,45^\circ$  (sare de bariu 10% în HCl 2N). Pentru aprecierea activității optice s-a utilizat eterul dimetilic al esterului dimetilic sau derivatul etilic corespunzător (E. Baer și H. O. L. Fischer, 1940).

Acidul glicerofosforic este remarcabil de rezistent la hidroliză apoasă în prezența acizilor sau alcaliilor. Pentru hidroliză completă a fost necesară încălzirea la 160°C în acid sulfuric 10% (G. I. de Sütö-Nagy și R. J. Anderson, 1947).

Unele fosfataze (din măduvă osoasă de șobolan, rinichi) hidrolizează acidul  $\alpha$ -glicerofosforic. În toate cazurile forma D este hidrolizată mai rapid decât forma L.

2. *L- $\alpha$ -Glicerofosforil-colina* a fost izolată inițial din autolizate de pancreas bovin (G. Schmidt și colab., 1945). S-a observat apoi că hidroliza alcalină blândă a lecitinei din ou duce la L- $\alpha$ -glicerofosforil colină (R. M. C. Dawson, 1956). O metodă ușor accesibilă de preparare a L- $\alpha$ -glicerofosforil colinei este hidroliza lecitinei sub acțiunea catalitică a ionilor mercurici (N. H. Tattrie și C. S. McArthur, 1955).

L- $\alpha$ -Glicerofosforil colina este un compus cristalin de culoare albă cu p.t. 142-143°C (sinterizare la 141°C). Are  $[\alpha]_D^{25} = -2,89^\circ$  (c = 4,61% în apă). S-a găsit că 0,059 milimoli de compus consumă 0,0588 milimoli HIO<sub>4</sub> în 30 min, ceea ce corespunde la un conținut în glicol vicinal de 99,7% din teorie.

L- $\alpha$ -Glicerofosforil colina, ca și lecitina, formează un complex cu clorura de cadmiu: (C<sub>8</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>NP)<sub>2</sub>(CdCl<sub>2</sub>) sau C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>NP • CdCl<sub>2</sub> • 3 H<sub>2</sub>O.

3. L- $\alpha$ -Fosfatidiletanol-amina (cefalina). O moleculă de L- $\alpha$ -fosfatidil etanol amină reacționează cu trei molecule de adenzil-metionină (vezi acolo), în prezența enzimelor respective, dând lecitină.

L- $\alpha$ -Fosfatidil etanol amina (cefalina) a fost purificată din fosfatide provenite din soia (C. R. Scholfield și H. J. Dutton, 1955) sau din fosfatidele creierului (J. Folch, 1942).

L- $\alpha$ -Fosfatidil etanol amina se prezintă ca un solid ceros de culoare alb-gălbui. Analiza fosforului, azotului aminic (inclusiv reacția cu ninhidrina) spectrul IR, indicele de ester, sunt metode utilizate în caracterizarea fosfatidil etanol aminei.

L- $\alpha$ -Fosfatidil-colina (lecitina). Mai multe enzime acționează asupra lecitinei, produsul de reacție fiind în funcție de tipul enzimei (Fig. 2.9).

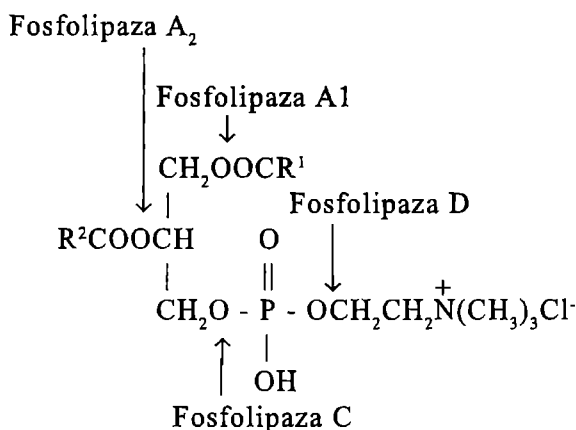


Fig. 2.9. Acțiunea fosfolipazelor asupra lecitinei (În afară de aceasta lizolecitina (1-acilglicerilfosfinico colina) este hidrolizată de către fosfolipaza B).

Lecitina a fost extrasă îndeosebi din gălbenuș de ou utilizând complexarea cu clorură de cadmiu (P. A. Levene și I. Rolf, 1927; M. Pangborn, 1950). Metodele cromatografice au fost deasemenea utilizate (D. J. Hanahan și colab., 1951; D. J. Hanahan și M. E. Jayco, 1952).

Lecitina pură este o substanță de culoare albicioasă, cu aspect parafinos și extrem de higroscopică. În stare uscată poate fi adusă în stare de pudră dar

absorbind apă devine o masă ceroasă și lipicioasă. Expusă la aer și lumină se închide la culoare și dezvoltă un miros neplăcut datorită instabilității acizilor grași nesaturați. Nu are un punct de topire definit. Lecitina este ușor solubilă în metanol, etanol, benzen, eter, eter de petrol, cloroform, tetraclorură de carbon și sulfură de carbon. Este deasemenea solubilă în piridină, glicerol și acid acetic. Este insolubilă în acetat de metil și acetonă. Lecitina conținând acizi grași saturați (hidrolectina) este insolubilă în eter. Lecitina este ușor hidrolizată de către acizi sau alcalii.

Lecitina există sub formă de zwitterion. Gruparea puternic acidă neutralizează intern gruparea puternic bazică. Punctul izoelectric este 6,4 (H. B. Bull și V. L. Frampton, 1936). Lecitina este optic activă: pentru (dipalmitoleil)-L- $\alpha$ -glicerilfosforil colină ( $\alpha$ )<sup>25</sup><sub>D</sub> = +6,62°.

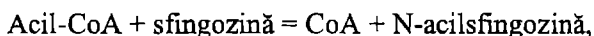
#### 2.3.4.2. Sfingofosfolipidele

Sfingofosfolipidele sunt lipide ce conțin în molecula lor sfingozină și fosfor, de cele mai multe ori ca ester fosfat. Printre cei mai cunoscuți reprezentanți ai sfingofosfolipidelor este sfingomielină.

#### SFINGOZINA

(D-Eritro-1,3-dihidroxi-2-amino-4-trans-octadecenă)

N-Acilsfingozina (ceramidul), componentă a cerebrozidelor, sulfatidelor și gangliozidelor, ia naștere prin reacția:

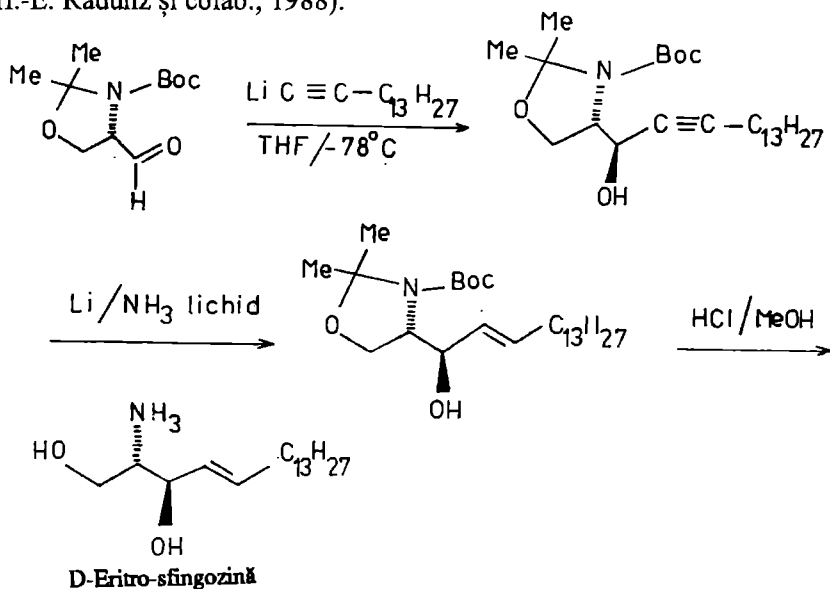


în prezența sfingozin aciltransferazei. Reacția de mai sus are loc imediat după formarea sfingozinei aceasta fiind toxică pentru celule. Administrată unui organism viu sau în culturi de celule sfingozina este imediat fosforilată și clivată în două fragmente: unul din doi carboni și celălalt din 16 carboni. Sfingozina a fost descoperită de către Thudichum (1874). O metodă de preparare frecvent utilizată consta în hidroliza sfingolipidelor din creier bovin sau cordon spinal, cu acid sulfuric metanolic (H. E. Carter și colab., 1947). Prin acest tratament se obțineau însă și cantități considerabile de eteri metilici în poziția 3 a sfingozinei (H. E. Carter și colab., 1951). A fost elaborat și un procedeu de degradare a cerebrozidelor la sfingozină care evită folosirea acizilor tari (J. A. Rothfus, 1960). Acesta se bazează pe oxidarea cerebrozidelor cu periodat, reducerea cu borohidruură de sodiu ( $\text{NaBH}_4$ ), degradare la ceramid și hidroliza alcalină a ceramidului.

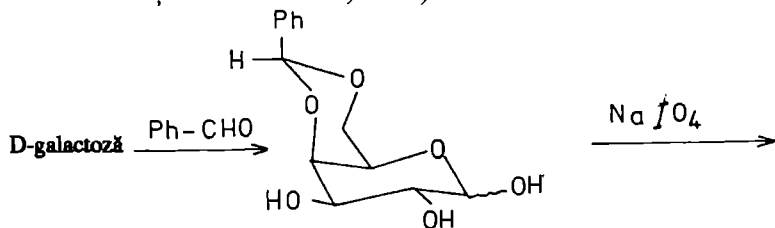
Ceramidele izolate din ficat de porc (E. Frankel și A. Bielschowsky, 1932; S. J. Thannhauser și E. Frankel, 1931), splină bovină (C. Tropp și V. Wiedersheim, 1933), ficat (E. Klenk și O. von Schonebeck, 1932), plămân (C. Tropp, 1935) au servit deasemenea ca sursă de sfingozină.

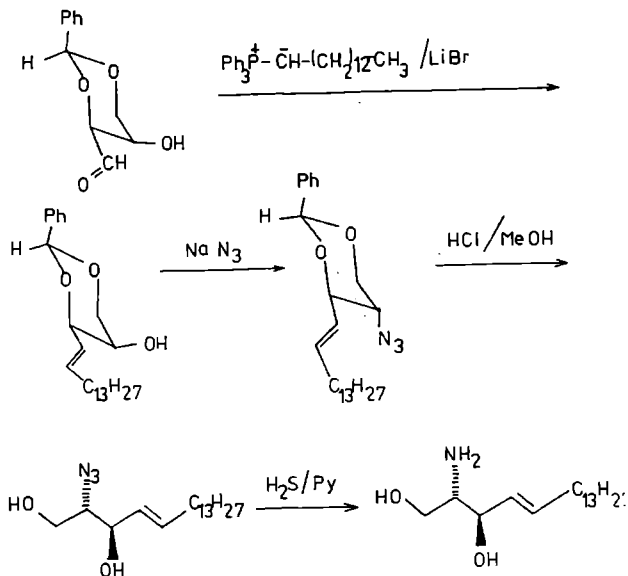
Se cunosc mai multe metode de sinteză a sfingozinei. Iată două dintre acestea care constă în grefarea, pe un rest alifatic, a unui fragment dintr-un compus natural la care configurația carbonilor asimetrici este identică cu a sfingozinei.

(i) Fragmentul mai sus-menționat constă din aminoacidul L-serină, ca serinal (H.-E. Radunz și colab., 1988):



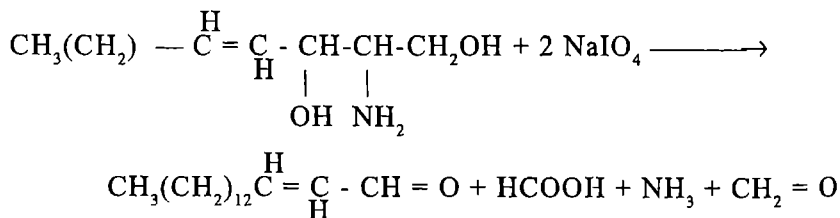
(ii) Legarea unui fragment constând din ultimii patru carboni ai D-galactozei la un radical alifatic, prin reacția Wittig, duce deasemenea la D-eritro-sfingozină (P. Zimmermann și R. R. Schmidt, 1988):





**Proprietăți.** După cristalizare din acetat de etil, sfingozina se obține în formă cristalină, de culoare galbenă care se înmoaie la  $70^\circ\text{C}$ , birefringența persistând până la  $82^\circ\text{C}$ . Spectrul IR arată absorbții puternice la  $1590$  și  $975\text{ cm}^{-1}$  caracteristice pentru gruparea amino și respectiv legătura dublă trans (C. L. Tipton, 1962). Sfingozina poate fi de asemenea cristalizată din eter etilic sau eter de petrol. Ea este ușor solubilă în acetonă, etanol și metanol dar insolubilă în apă. Un compus adecvat pentru caracterizarea sfingozinei este derivatul tribenzoil sau triacetil; ultimul are p. t.  $101-103^\circ\text{C}$  și  $[\alpha]_D^{24} = -12^\circ$ .

Pentru o caracterizare mai completă sfingozina se oxidează cu  $\text{NaIO}_4$ , iar aldehida rezultată este analizată prin gaz-cromatografie (C. C. Sweeley și E. A. Moscatelli, 1959).







timp ce atomii de carbon 3 și 18 provin de la palmitoil-CoA (R. O. Brady și G. J. Koval, 1958).

Sfingomielina a fost descoperită de către Thudichum (1901) care a identificat și produșii de hidroliză a acesteia: acidul fosforic, acidul gras, colina și o amină secundară, sfingozina. Carter și colab., (1947, 1950) au stabilit pozițiile grupării amino și a celor două grupări hidroxil a sfingozinei și au propus structura acesteia.

Aceeași cercetători au izolat din creier și din măduva spinării dihidrosfingozina care s-a arătat a fi prezentă, împreună cu sfingozina, în sfingomielină.

Levene (1916) a izolat, dintr-un hidrolizat parțial de sfingomielină, lignocerilsfingozină care este compusă din sfingozină și acid lignoceric unite printr-o legătură amidică. Prin analogie cu lecitina s-a presupus pentru sfingomielină structura de mai sus. Rennkamp (1949) a relatat izolarea sfingozinfosforil colinei și fosforil colinei din hidrolizate acide de sfingomielină. Demonstrarea directă (G. Rouser și colab., 1953) a prezenței fosforilcolinei ca produs de hidroliză a sfingomielinei s-a realizat prin hidroliză cu acid clorhidric în metanol urmată de extracția fosforilcolinei în faza apoasă și identificarea cromatografică ulterioară. Acest compus poate fi ușor identificat prin comparație cromatografică cu o probă autentică de fosforilcolină (obținută prin sinteză) și prin identificarea acidului fosforic și colinei după hidroliză alcalină prelungită. Colina și ortofosfatul au fost deasemenea identificați cromatografic.

Pentru determinarea punctului de atașare a fosforilcolinei la sfingozină s-a utilizat o metodă bazată pe hidroliza alcalină parțială și oxidarea cu periodat a esterului sfingozin fosforic. Luând în considerare produșii de oxidare cu acid periodic a sfingozinei s-au putut prevedea produșii de oxidare cu periodat al unui derivat al acesteia. Sfingozin fosfatul și sfingozinfosforil colina sunt produși ai hidrolizei alcaline parțiale a sfingomielinei. Acțiunea acidului periodic asupra sfingozinfosfatului și sfingozinfosforil colinei este ilustrată în Fig. 2.10. Cei doi compuși au putut fi separați pe baza diferenței de solubilitate: sfingozin fosfatul este solubil în eter de petrol iar sfingozinfosforil colina în cloroform. În amestecul de oxidare a acestora cu periodat au fost identificați glicolaldehidfosfatul și respectiv glicolaldehidfosforil colina. Sfingozinfosfatul, compusul care conține fosfat și o grupare amino liberă (reacția cu ninhidrina) dă prin hidroliză sfingozină și fosfat. Hidroliza sfingozinfosforil colinei dă sfingozină și fosforil colină. (O probă autentică de sfingozină a fost preparată prin hidroliza totală a cerebrozidului). Produșii hidrolizei parțiale a sfingomielinei și oxidarea acestora sunt prezentate în Fig. 2.10.

Elucidarea structurii sfingomielinei prin metode hidrolitice a fost confirmată printr-o metodă oxidativă. Pentru aceasta sfingomielina a fost hidroxilată cu acid performic. Produsul hidroxilat a fost izolat și găsit a fi mai solubil în metanol decât sfingomielina originală. Totodată spectrul IR al produsului hidroxilat arăta prezența mai multor grupări hidroxil decât în sfingomielină.

Sfingomielină hidroxilată a fost oxidată cu periodat; în amestecul de reacție au fost identificați următorii compuși: (a) acidul formic, prin titrarea cu NaOH și prin reacția Tollens pozitivă a distilatului; (b) aldehida miristică: rezidiul de la distilarea amestecului de reacție a fost extras cu eter: prin reacție cu 2,4-dinitrofenil hidrazina a rezultat 2,4-dinitrofenil hidrazona aldehidei miristice (p. t. 102-103°C); (c) L-serina: rezidiul apos, rămas după distilarea acidului formic și extracția cu eter a aldehidei miristice, a fost tratat cu etilen glicol pentru a distruge excesul de periodat iar apoi oxidat cu permanganat în condiții blânde; după hidroliză cu HCl a rezultat un compus care dădea reacție pozitivă intensă cu ninhidrina și avea o comportare cromatografică identică cu a serinei.

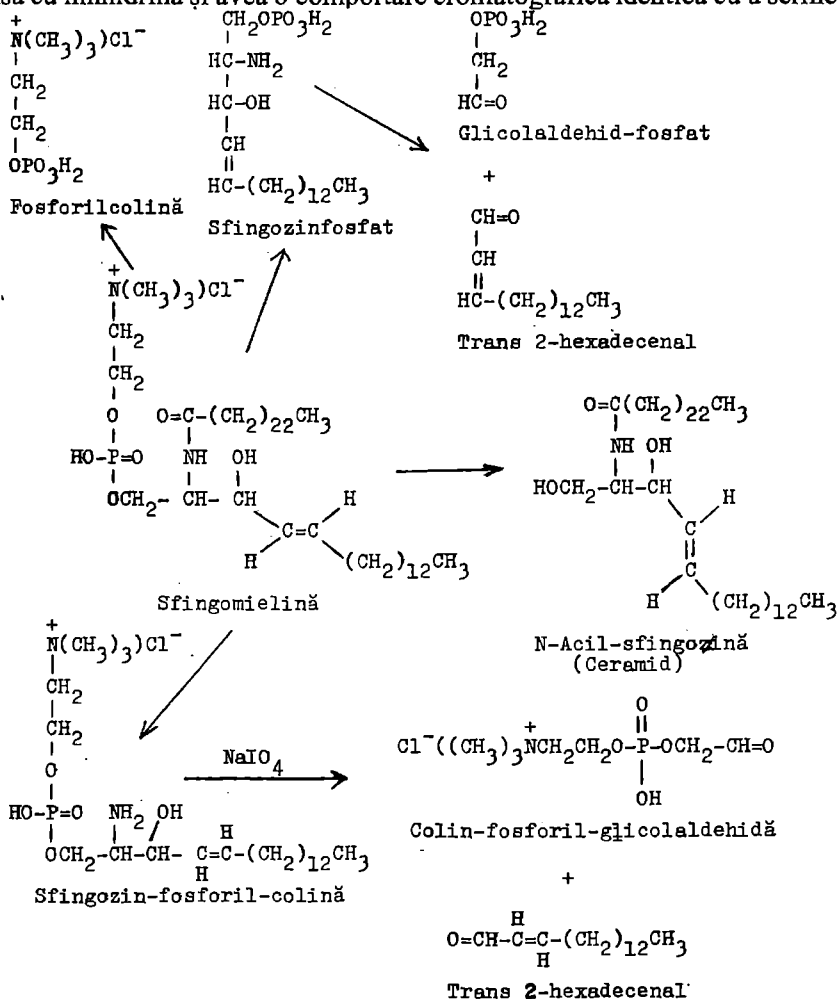


Fig. 2.10. Oxidarea cu periodat a unor produși ai hidrolizei alcaline a sfingomielinei.

Trebuie adăugat că dacă o porțiune din svingomielină originală era tratată în maniera descrisă mai sus, cu excepția hidroxilării cu acid performic, nu rezultă nici acid formic nici serină. Schema reacțiilor oxidative de elucidare a structurii svingomielinei sunt prezentate în Fig. 2.11.

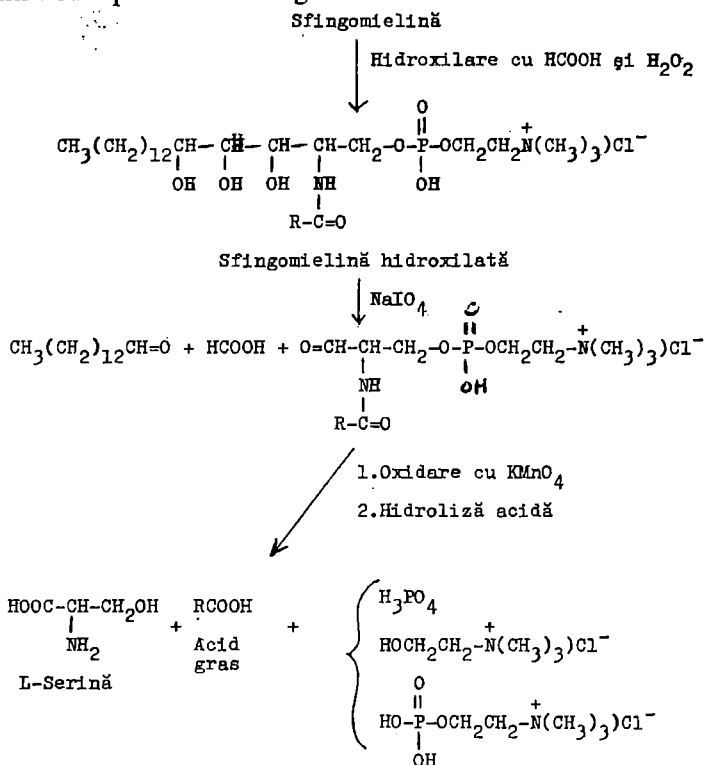


Fig. 2.11. Schema reacțiilor oxidative de elucidare a structurii svingomielinei.

Există astăzi o mare varietate de metode de sinteză ale svingomielinei. Una dintre ele se bazează pe utilizarea compușilor cu ciclul oxazolinic (D. Shapiro și colab., 1959; D. Shapiro, 1965).

**Proprietăți.** Svingomielină provenită din eritrocite bovine este o pudră amorfă de culoare albă. Svingomielină este stabilă la oxidare și poate fi păstrată cel puțin un an într-un exicator la 4°C. rotația optică specifică este  $[\alpha]_D^{25} = +9,76^\circ$  (c=4 în CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 9:1). (Svingomielină din inimă bovină are  $[\alpha]_D^{28} = +4,9^\circ$  (c = 4% în CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 1:1)(M. M. Rapport și B. Lerner, 1958)).

Spectrul IR arată maxime de absorbție la: 3,04, 6,1, 6,98, 8,2, 9,2, 9,55, 10,35 și 13,9 μ. Din spectrul IR al svingomielinei izolate din surse naturale

trebuie să lipsească banda de 5,8  $\mu$  (caracteristică lecitinei). Sfingomielina din creier bovin (p. t. 170-171°C, desc.) prezintă în spectrul IR următoarele benzi: 6,09 și 6,45 (legătura amidică), 10,3  $\mu$  (legătura dublă trans și legătura fosfat), 3,10  $\mu$  (NH, întindere și gruparea hidroxil cu posibile legături de hidrogen urmată de deplasare), 13,85  $\mu$  (hidrocarbură cu catenă lungă) (G. Marinetti și colab., 1953).

N-Lignoceril-sfingomielina sintetică (p. t. 213-216°C cu sinterizare puternică la 180-190°C) prezintă următoarele benzi în spectrul IR: 3,01, 3,42, 3,50, 6,10, 6,42, 6,78, 8,12, 9,41, 10,33, 10,81, 12,01  $\mu$  (D. Shapiro și colab., 1959).

Sfingomielina este rezistentă în mediu acid și alcalin: lăsată peste noapte în KOH 1 N sau în HCl 1N sau în acid formic 96% nu se hidrolizează nici la colină nici la fosforil colină. Legătura ester fosfat din sfingomielină este mai rezistentă la hidroliză decât cea din fosfogliceride.

## 2.4. GLICOLIPIDELE

Glicolipidele existente în țesuturile mamiferelor se împart în două categorii majore:

- glicosfingolipidele
- glicoglicerolipidele

Glicosfingolipidele sunt alcătuite din sfingozină, acid gras și hidrați de carbon iar glicoglicerolipidele conțin glicerol, acid gras (sau alcool gras) și hidrați de carbon.

Glicosfingolipidele pot fi subdivizate suplimentar în trei subgrupuri:

- glicosfingolipide neutre
- sulfato-glicosfingolipide, care conțin o grupare ester sulfat pe fragmentul glucidic
- ganglioziide (glicosfingolipide care conțin acid sialic).

### 2.4.1. Glicosfingolipide neutre (hexozil-ceramide)

Din diferite țesuturi ale vertebratelor (creier, măduvă osoasă, rinichi, splină, ficat, testicul) au fost izolate glicozil-ceramide. Cele mai studiate dintre acestea sunt galactozil-ceramidul (galacto-cerebrozidul) și glucozil-ceramidul (gluco-cerebrozidul).

#### 2.4.1.1. Galactozil-ceramidul (Galacto-Cerebrozidul)

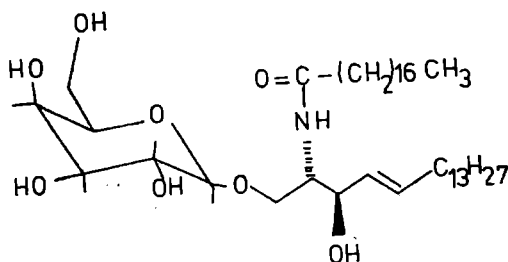
Galactozil-ceramidul este glicosfingolipidul predominant din materia albă a creierului și măduvei spinării și este o componentă caracteristică a mielinei.

Galactozil-ceramidul dă prin hidroliză galactoză, sfingozină și acid gras în raportul molar 1:1:1. Totodată galactozil-ceramidul nu prezintă caracterul reducător al glucidelor libere; prin urmare galactoza este legată la ceramid printr-o legătură glicozidică. Expunerea galactozil-ceramidului la acidul periodic duce la distrugerea galactozei dar sfingozina rămâne intactă.

În condiții adecvate acidul gras poate fi detașat din molecula galactozil-ceramidului și rezultă galactozil-sfingozină (psihozină). Reacția psihozinei cu acidul periodic duce atât la fragmentarea galactozei cât și a sfingozinei; analiza fragmentelor de oxidare au demonstrat că galactoza se leagă glicozidic de atomul C-1 al ceramidului (în aceeași poziție în care se leagă colin-fosfatul în molecula sfingomielinei).

Hidroliza galactozil-ceramidului (și a psihozinei) de către  $\beta$ -galactozidază precum și spectroscopia IR și RMN au indicat că galactoza se găsește în configurația  $\beta$ , inelul fiind de tip piranozic.

Prin urmare structura galactozil-ceramidului este următoarea:



Galactozil-ceramid (Gal $\beta$ -1' Cer)

Reacțiile de mai sus, care au dus la clarificarea structurii galactozil-ceramidului, sunt indicate în Fig. 2.12.

#### 2.4.1.2. Glucozil-ceramidul (Gluco-cerebrozidul)

Glucozil-ceramidul a fost izolat pentru prima oară din splina pacienților cu boala Gaucher. S-a constatat ulterior că splina și ficatul pacienților, care suferă de această maladie genetică, conțin cantități mari de glucozil-ceramid. Acest compus este un constituent normal al țesuturilor și fluidelor extraneurale.

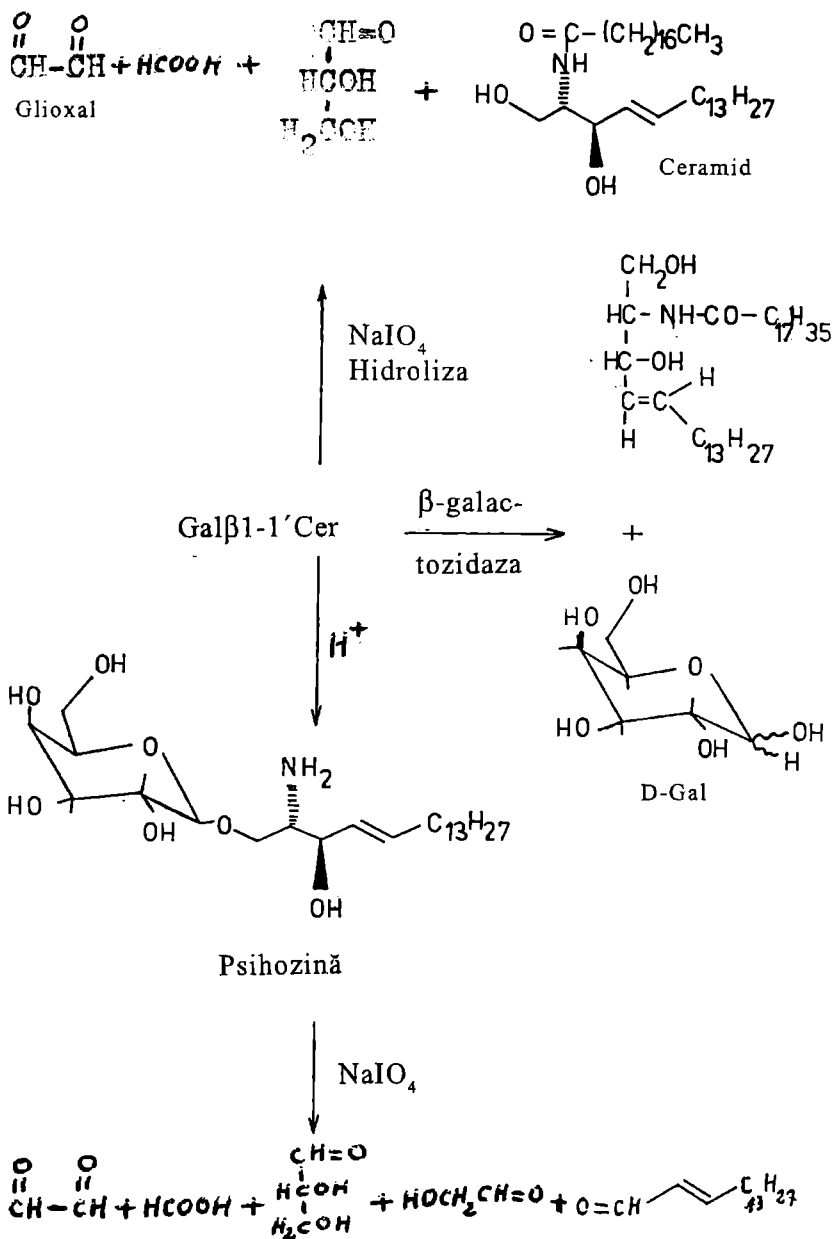
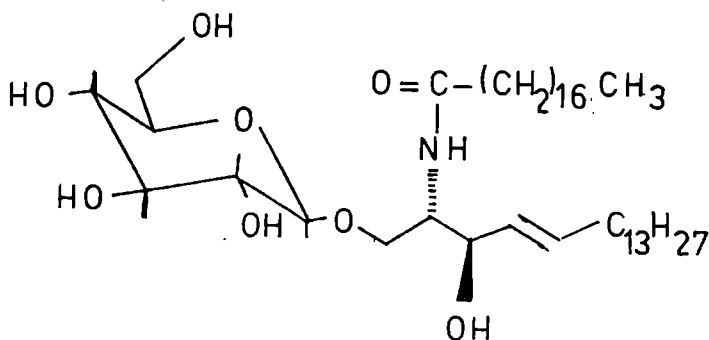


Fig. 2.12. Reacții care au dus la elucidarea structurii galactozil-ceramidului

Argumente fizico-chimice similare au arătat că structura glucozil-ceramidului este următoarea:



Glucozil-ceramid (Glc  $\beta$ 1-1'Cer)

O manieră simplă de a distinge între galactozil-ceramid și glucozil-ceramid o constituie cromatografia pe silicagel în comparație cu cromatografia pe silicagel conținând acid boric: în primul caz cei doi compuși au același  $R_f$  iar în cel de-al doilea galactozil-ceramidul are o valoare  $R_f$  mai mică. Explicația este următoarea: galactoză (din Gal-Cer) are două grupări hidroxil *cis* care interacționează cu acidul boric în timp ce derivatul glucozei nu suferă această interacție.

## 2.4.2. Sulfato-glicosfingolipidele

Sulfato-glicosfingolipidele cuprind glicosfingolipide sulfatate în porțiunea glucidică a moleculei. Cu toate că se cunoaște glicoglicerolipide sulfonate, legătura chimică C-S nu a fost găsită până acum în cazul glicosfingolipidelor.

### 2.4.2.1. 1-O-Galactozilceramid 3-sulfatul

Acest compus (GalCer I<sup>3</sup>-sulfat; sulfatid; sulfato-galactozilceramid; cerebrozid sulfat) a fost izolat din creier uman de către Thudichum (1884) care, l-a numit sulfatid. Blix (1933) a obținut același compus din creier și a prezentat dovezi că el conține 4-sfingenină, acid gras legat ca amidă și galactoză esterificată cu acid sulfuric. S-a presupus inițial că poziția grupării sulfat este la hidroxilul 6 a restului de galactoză (G. Blix, 1933) dar ulterior, Yamakawa și colab. (1962) precum și Stoffyn (1963) au stabilit că esterificarea sulfatului este la hidroxilul din poziția 3 a galactozei. A rezultat aceasta pe baza studiilor de permetilare și rezistența unității galactoză la oxidare cu periodat. Pentru aceasta Taketomi și Yamakawa (1964) au sintetizat GalCer 6-sulfat, prin reacția dintre GalCer din creier bovin și acid clorsulfonic. S-a obținut un compus cu p. t. 165-170°C,  $(\alpha)_D = -0,4^\circ$  (2,4% în piridină). Spectrul IR al celor doi esteri sulfat, natural și



sintetic, era aproape identic. La oxidarea cu periodat, însă, rezultatele erau complet diferite, după cum rezultă din Tabelul 2.9.

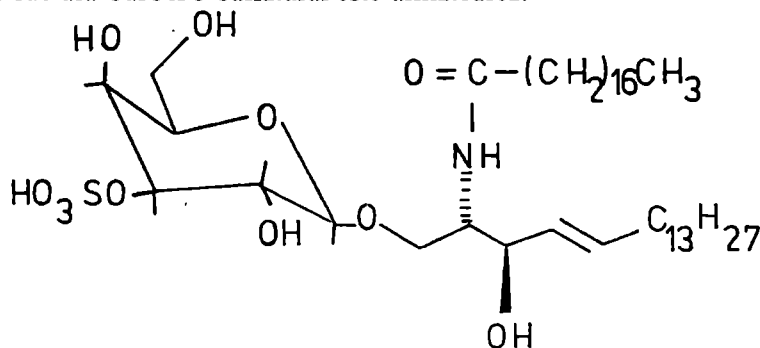
Tabelul 2.9.

Oxidarea cu periodat a sulfatidului natural și sintetic

Compus	Galactoză %	
	Netratat	Tratat
GalCer	20,5	0
GalCer sulfat natural	18,5	18,0
GalCer sulfat sintetic	18,3	0

Experimentele de permetilare au dat rezultatul următor: metilglicozidul permetilat obținut din GalCer sulfat natural s-a dovedit a fi metil-2,4, 6-trimetilgalactozid în timp ce din GalCer sulfat sintetic s-a obținut metil-2,3, 4-trimetilgalactozid (T. Taketomi și T. Yamakawa, 1964). Aceste rezultate au demonstrat că sulfato-monohexozil-ceramidul natural este GalCer 3-sulfat. Galactoza are configurația  $\beta$ , după cum arată spectroscopia în IR și hidroliza enzimatică cu  $\beta$ -galactozidază.

Structura GalCer 3-sulfatului este următoarea:



GalCer 3-sulfat

GalCer 3-sulfatul se acumulează în cantități anormal de mari în sistemul nervos central și rinichi la pacienții cu leucodistrofie metacromatică, o boală concretizată în demielinizarea difuză (H. Jatzkewitz, 1960). Rinichii conțin în mod normal concentrații înalte din acest glicosfingolipid (E. Martensson, 1966). GalCer 3-sulfatul este de asemenea prezent în carcinomul gastric uman și în intestinul subțire de câine precum și în intestinul și mucoasa gastrică porcine (B. L. Slomiany și colab., 1974).

## 2.5. NUCLEOTIDELE

Nucleotidele sunt unități structurale ale acizilor ribonucleici (ARN) și ale acizilor deoxiribonucleici (ADN). Nucleotidele sunt produși de condensare a fracțiunii glucidice din nucleozide cu acidul ortofosforic. Prin urmare nucleotidele sunt nucleozid fosfați. Acizii nucleici (ADN sau ARN) dau produși de hidroliză în funcție de condițiile de reacție (Fig. 2.13).

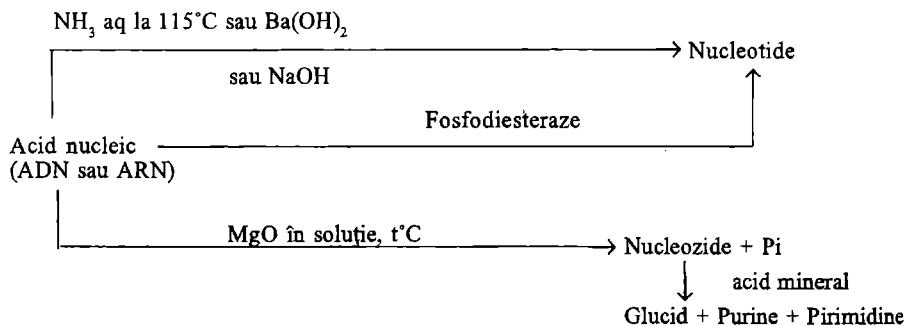


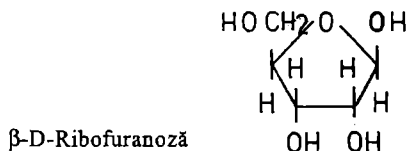
Fig. 2.13. Hidroliza acizilor nucleici.

### 2.5.1. Nucleozidele

Nucleozidele sunt glicozil-amine ale D-ribozei sau 2-deoxi-D-ribozei și bazele azotate purinice sau pirimidinice.

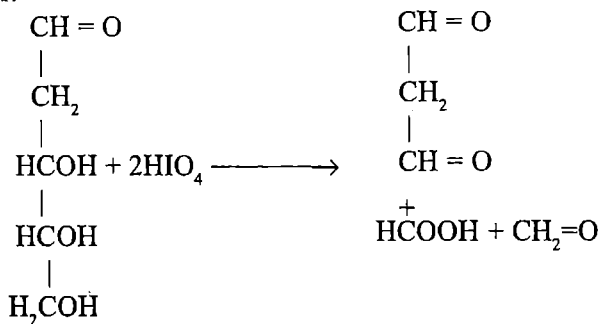
#### 2.5.1.1. Glucidele din acizii nucleici

În acizii nucleici au fost găsite două monozaharide: D-riboza în acizii ribonucleici (ARN) și 2-deoxi-D-riboza în acizii deoxiribonucleici (ADN). Structura D-ribozei este cunoscută din sub-capitolul Hidrații de carbon. În nucleozide și în derivații acestora (nucleotide, derivați nucleotidici, ARN) D-riboza se găsește sub formă de  $\beta$ -D-ribofuranoză:

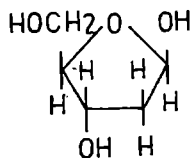


Structura 2-deoxi-D-ribozei rezultă din reacțiile următoare: oxidarea grupăni carbonilice la grupare carboxil urmată de decarboxilare duce la 4-deoxi-L-

eritritol. Pe de altă parte oxidarea 2-deoxi-D-ribozei cu acid periodic decurge în felul următor:



Ambele reacții susțin plasarea grupării metilen (deoxi) în poziția doi. În ADN, 2-deoxi-D-riboza se găsește ca 2 -deoxi-β-D-ribofuranoză:



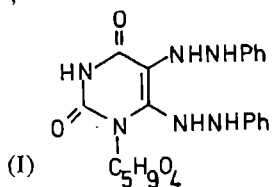
2-Deoxi-β-D-ribofuranoză

### 2.5.1.2. Structura nucleozidelor

Reacția de condensare dintre o bază azotată (purinică sau pirimidinică) și hidroxilul glicozidic al unui glucid (riboza sau deoxiriboza) dă naștere la un *nucleozid*. Pe de altă parte, hidroliza nucleotidelor cu amoniac apos la 175°C sub presiune duce la nucleozide și acid fosforic; prin urmare în nucleozide baza este legată direct la glucid. Deoarece nucleozidele nu au caracter reducător înseamnă că hidroxilul glicozidic al glucidului este blocat prin legătura cu baza azotată, prin urmare nucleozidele sunt glicozide. Identificarea atomului bazei heterociclice care se leagă cu C-1 al glucidului s-a făcut în felul următor.

(i) La citidină punctul de legare nu poate fi nici atomul 3 nici atomul 4 deoarece citozina posedă o grupare amino liberă în poziția 4 și deci nu conține un atom de hidrogen la N-3. Pe de altă parte citidina, prin tratare cu acid azotos, este transformată în uridină (prin această reacție gruparea amino din poziția 4 a citozinei devine grupare hidroxil); rezultă de aici că restul glucidic este legat în aceeași poziție atât în citidină cât și în uridină. În plus, deoarece uridina formează un derivat 5-bromo rezultă că atomul C-5 este liber. Dacă uridina este tratată cu exces de brom, urmat de reacția cu fenilhidrazină, se obține un derivat al uridinei care conține două grupări fenil-hidrazino. Compusul are structura (I) și s-a arătat

că acest compus poate fi obținut numai dacă uracilul este substituit, în cadrul uridinei, în poziția 1 iar pozițiile 5 și 6 sunt libere.



Prin urmare glucidul este atașat la N-1. Într-o manieră similară s-a demonstrat că nucleozidele pirimidinice (ribonucleozidele și deoxiribonucleozidele) au restul glucidic legat la N-1. Acest mod de legare a fost confirmat atât prin sinteză cât și prin difracție cu raze X.

(ii) În cazul nucleozidelor purinice adenzina are o grupare amino în poziția 6; prin urmare glucidul nu se poate lega la C-6 sau N-1 (similar cu citidina). În guanosină deoarece guanina are o grupare amino în poziția 2 glucidul nu poate fi legat la C-2 sau N-3.

În plus, când guanosina este tratată cu acid azotos rezultă xantosina, iar aceasta prin metilare cu diazometan, urmată de hidroliză, dă teofilină (1,3-dimetilxantină). Prin urmare, pozițiile 1 și 3 din guanosină sunt libere. S-a găsit, totodată, că cele două ribonucleotide purinice sunt hidrolizate cu viteză comparabilă de către acizii diluați sau enzimatic; rezultă de aici că restul glucidic este legat în aceeași poziție în ambele nucleozide. Rămân acum disponibile pozițiile 7,8 și 9 ca posibile puncte de legare. Poziția 8 este exclusă, deoarece ar implica o legătură C-C; această legătură este mult mai stabilă decât legătura glicozidică din nucleozide care este hidrolizată ușor cu acizi diluați.

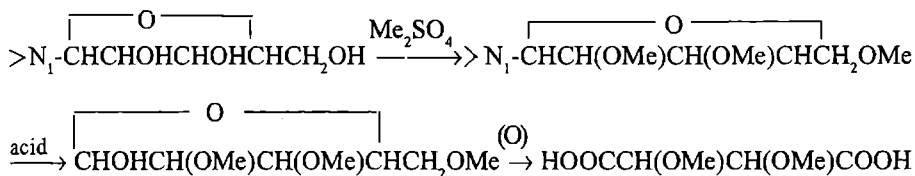
Rămâne să discernem acum între pozițiile 7 și 9. S-a observat că spectrul de absorbție UV al guanosinei este foarte asemănător cu cel al 9-metilguaninei și diferă de cel al 7-metilguaninei. Prin urmare, guanosina este 9-guanin glicozid. Legarea glucidului în poziția 9 la adenină și guanină a fost confirmată și prin sinteză.

Trebuie precizat că glicozidele în sens strict se obțin prin eliminarea unei molecule de apă între un hidroxil glicozidic și o grupare hidroxil. Prin urmare, nucleozidele nu sunt glicozide, ci glicozilamine; mai precis, ele sunt denumite *ribozilpirimidine* și *ribozilpurine*.

*Natura ciclului glucidic.* Iată două argumente distincte care susțin că glucidul se găsește în forma furanozică în nucleozide.

(i) Metilarea unui ribonucleozid, urmată de hidroliză, dă trimetilriboză care formează prin oxidare acid dimetilmezotartric. Rezultă de aici că riboza se găsește

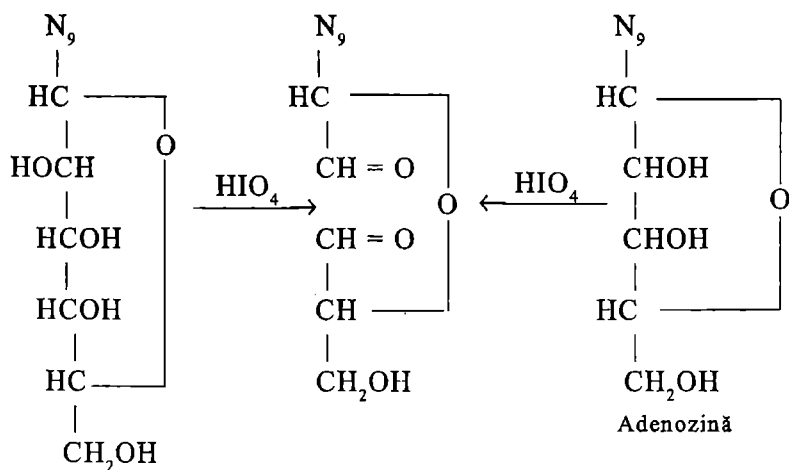
ciclu furanozic; dacă se găsea în ciclu piranozic produsul final ar fi fost acidul trimetoxiglutaric (vezi și Hidrații de carbon). Reacțiile sunt următoarele:



(ii) Oxidarea unui ribonucleozid cu acid periodic consumă o moleculă de reactiv și rezultă două grupări aldehidice fără pierdere de atomi de carbon.

Inelul furanozic al deoxiribozei a fost dovedit de faptul că deoxiribonucleotidele nu reacționează cu acidul periodic; prin urmare, în structura respectivă nu există două grupări hidroxil adiacente (ele ar exista dacă inelul ar fi piranozic).

*Configurația legăturii N-glicozidice.* S-a găsit, prin mai multe metode, că legătura furanozică N-glicozidică este în configurația  $\beta$ . Astfel, prin oxidarea adenozei cu acid periodic s-a ajuns la un produs identic cu cel obținut prin oxidarea cu acid periodic a 9- $\beta$ -D-mano-N-piranozil adeninei (un purin nucleozid de sinteză):



9- $\beta$ -D-Mano-piranosiladenină

S-a confirmat, pe această cale, din nou, că în nucleotidele purinice legătura glicozidică este la N9. Prin urmare, ribonucleozidele și deoxiribonucleozidele au structura indicată în Fig. 2.14, iar denumirile în Tabelul 2.10.

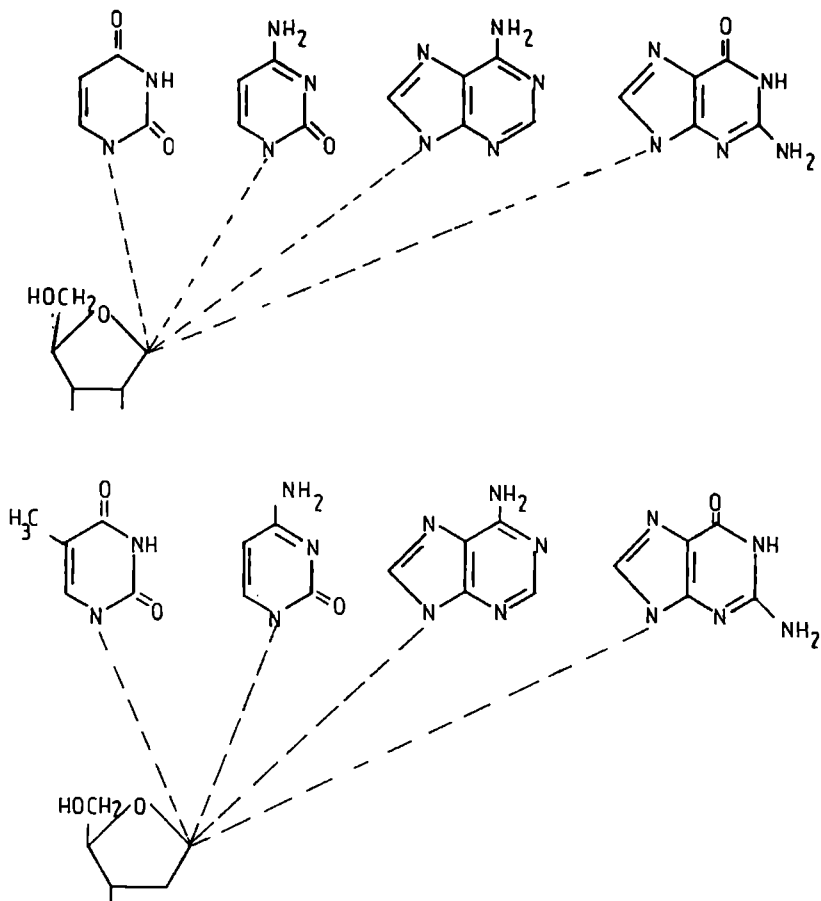


Fig. 2.14. Structura ribonucleozidelor și deoxiribonucleozidelor. Sus, ribonucleozide (de la stânga la dreapta): uridină, citidină, adenozină, guanozină. Jos, deoxiribonucleozide: timidină, deoxi-citidină, deoxiadenozină, deoxi-guanozină.

### 2.5.2. Structura nucleotidelor

Condensarea dintre un nucleozid și  $H_3PO_4$  produce un *nucleotid*, prin urmare, nucleotidele sunt nucleozid fosfați. Trebuie adăugat că termenul de nucleotid este legat de un mare grup de compuși alcătuiți din fosfați N-glicozidelor bazelor heterociclice, precum și din pirofosfații și polifosfații acestora.

Hidroliza atentă a nucleotidelor duce, între altele, la ribozomonofosfat; prin urmare, acidul fosforic este atașat la fracțiunea glucidică a nucleotidului. Pe molecula D-ribofuranzei există trei puncte de legare: atomii C-2', C-3' și

C-5'; toți trei izomerii monofosfat există în realitate. În cazul moleculei de 2-deoxi-D-riboză se cunosc doi izomeri monofosfat: la atomii de carbon C-3' și C-5'.

*Tabelul 2.10.*

**Denumirea ribonucleozidelor, ribonucleotidelor, deoxiribonucleozidelor și deoxiribonucleotidelor. Ribonucleozide și ribonucleotide**

Baza azotată	Simbol	Nucleozid	Nucleotid
Uracil	U	Uridină	Uridin 5'-fosfat Acid 5'-uridilic; UMP*
Citozină	C	Citidină	Citidin 5'-fosfat Acid 5'-citidilic; CMP
Adenină	A	Adenozină	Adenozin 5'-fosfat Acid 5'-adenilic; AMP
Guanină	G	Guanozină	Guanozin 5'-fosfat Acid 5'-guanilic; GMP
Hipoxantină		Inozină	Inozin 5'-fosfat Acid 5'-inozinic; IMP
Xantină		Xantosină	Xantosin 5'-fosfat Acid 5'-xantilic

**Deoxiribonucleozide și deoxiribonucleotide**

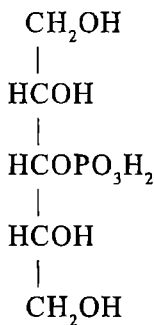
Baza azotată	Simbol	Deoxiribonucleozid	Deoxiribonucleotid
Timină		Timidină**	Timidin 5'-fosfat Acid 5'-timidilic; TMP
Citozină		d-Citidină***	Deoxicitidin 5'-fosfat Acid 5'-deoxi-citidilic; dCMP
Adenină		d-Adenozină	Deoxi-adenozin 5'-fosfat Acid 5'-deoxiadenilic; dAMP
Guanină		d-Guanozină	Deoxi-guanozin 5'-fosfat Acid 5'-deoxiguanilic; dGMP

\* Prescurtarea simplă UMP, CMP, AMP și GMP se referă întotdeauna la 5'-nucleotide.

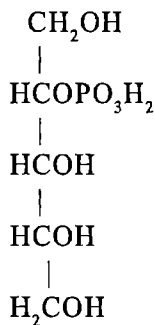
\*\*Nucleozidul timinei cu riboza se numește ribozil-timidină, iar nucleotidul corespunzător riboziltimidin 5'-fosfat (Thd-5'-P).

\*\*\*d este prescurtarea lui deoxi și indică lipsa unei grupări hidroxil.

S-a utilizat un ansamblu de metode fizico-chimice pentru a distinge între ribonucleozid-monofosfații izomeri. Dintre cei trei izomeri numai ribonucleozid 5'-fosfatul este oxidat de către acidul periodic. Mai departe, pentru a distinge între izomerii 2' și 3' se procedează astfel: hidroliza menajată a nucleotidului duce la ribozo monofosfatul corespunzător; acesta, prin reducere, devine fosforibitol. Din ribonucleozid 3'-fosfat rezultă 3-fosforibitol, iar din izomerul 2'-fosfat rezultă 2-fosforibitol:

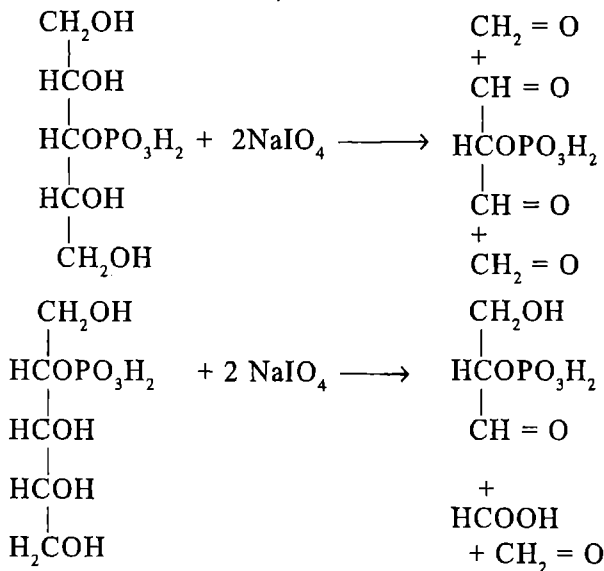


3-Fosforibitol



2-Fosforibitol

Cei doi polioli fosfați izomeri se deosebesc, pe de o parte, prin activitatea optică: 3-fosforibitolul este lipsit de activitate optică, în timp ce fosforibitolul este optic activ. Pe de altă parte, produșii de oxidare cu acid periodic a celor doi fosforibitoli izomeri sunt diferiți:



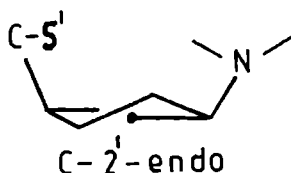
Denumirile nucleotidelor sunt indicate în Tabelul 2.10.



### 2.5.3. Conformația nucleotidelor

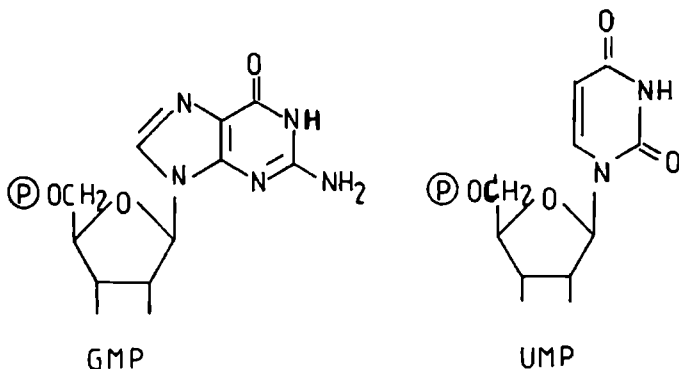
Inelul furanozic al D-ribozei sau 2-deoxi-D-ribozei este aproape plan; mai precis, seamănă cu un plic, astfel încât unul dintre cei cinci atomi ai inelului se plasează succesiv în afara planului celorlalți patru atomi. În nucleotide atomii care execută preferențial această deplasare sunt C-2' și C-3'.

O descriere mai precisă a rezultat raportând pozițiile atomilor 2' și 3' din inelul furanozic la planul format de atomii 1', 4' și heteroatomul (oxigen). Deplasarea deasupra planului (spre baza azotată) este denumită *endo*, iar deplasarea în sens contrar *exo*. Conformațiile C-2'-endo și C-3'-endo sunt cel mai des întâlnite în nucleotide:



Cu excepția guaninei, bazele azotate purinice și pirimidinice au molecula plană. La guanină gruparea amino proeminează deasupra planului general al moleculei.

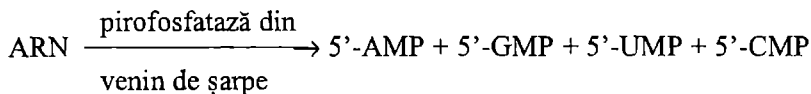
În jurul legăturii glicozidice există rotație liberă, astfel că grupările CO și NH din pozițiile 2 și 3 ale inelului pirimidinic (respectiv, din pozițiile 1, 2 și 6 din inelul purinic) se pot situa în afara ciclului furanozic (conformație *anti*) sau deasupra inelului furanozic (conformație *sin*). În nucleotide și în acizii nucleici se întâlnește cel mai frecvent conformația *anti* (D. Metzler, 1977). Prin urmare, conformația cea mai stabilă termodinamic a nucleotidelor este următoarea:



### 2.5.4. Producerea nucleotidelor și nucleozidelor

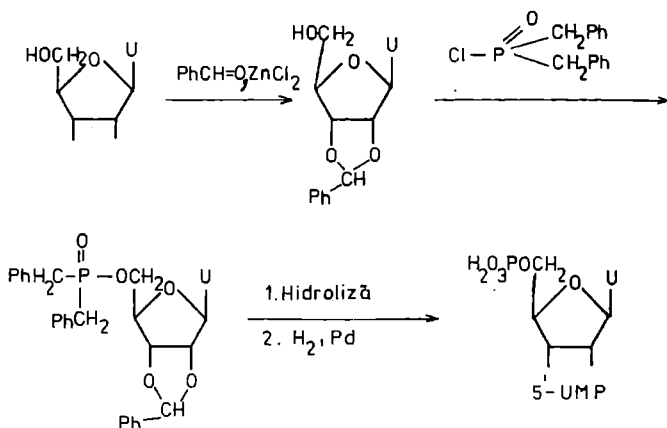
O sursă ieftină și ușor accesibilă de nucleotide (și nucleozide) o constituie ARN din drojzii. Aceste organisme prezintă avantajul că produc ARN în cantități

apreciabile, iar ADN în cantități mult mai mici. Prima etapă o constituie separarea ARN. Hidroliza ARN cu fosfodiesterază din venin de șarpe duce la un amestec de ribonucleozid-5'-fosfați care sunt separați prin cromatografie de schimb ionic:



O alternativă mai ieftină o constituie hidroliza chimică (W. E. Cohn și J. X. Khym, 1957). Pentru aceasta, acizii ribonucleici sunt hidrolizați cu alcalii diluate obținându-se izomerii 2' și 3' (a și b) a celor patru nucleotide. Amestecul de nucleotide este adsorbit pe un anionit adecvat (Dowex-1 sau Dowex-2, Amberlite IRA-400 sau -410, 200-400 mesh, cu 8-10% divinilbenzen). Acizii citidilici și adenilici sunt eluați consecutiv cu HCl 0,002 N, acizii uridilici cu HCl 0,005 N, iar acizii guanilici cu HCl 0,0075 N. După concentrare, fiecare din cele patru fracții este separată în nucleozid 2'- și nucleozid 3'-fosfat printr-o altă cromatografie de schimb ionic pe un anionit.

Nucleozid 2'-fosfații și nucleozid 3'-fosfații se utilizează fie ca atare, fie servesc la prepararea nucleozid 5'-fosfaților. Pentru aceasta, nucleotidele sunt hidrolizate la nucleozide și fosforilate selectiv în poziția 5'. De ex. uridin 5'-fosfatul a fost sintetizat prin fosforilarea 2', 3'-O-benziliden uridinei cu difenilfosfocloridat. Gruparea benzilidenică a fost îndepărtată prin hidroliză, iar gruparea benzil prin hidrogenare (J. M. Gulland și H. Smith, 1947; M. Smith, 1961). Reacțiile sunt următoarele:



Pentru prepararea 5'-UMP s-a utilizat, în loc de 2', 3'-O-benziliden uridină, 2', 3'-O-izopropiliden uridină (obținută prin reacția dintre uridină și acetonă), iar ca agent de fosforilare s-au utilizat: difenilfosfocloridat, oxiclorigură de fosfor sau acid polifosforic.

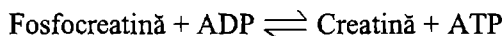
## CAPITOLUL 3

### REACTIVI NATURALI SPECIALI (VITAMINE, COENZIME)

Reactivii naturali speciali reprezintă modalitatea prin care organismele vii, utilizând în plus enzimele, realizează diferite reacții chimice. Este cvasiunanim admis astăzi că vitaminele joacă, la nivel molecular, rolul de coenzime, reactivi naturali speciali (D. Metzler, 1977). Alături de acest rol major s-au relevat și alte funcții de nivel molecular pentru „vitaminele” clasice.

#### 3.1. FOSFOCREATINA (CREATIN FOSFATUL)

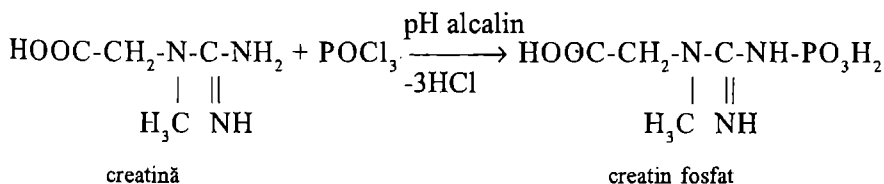
Fosfocreatina posedă o energie liberă standard de hidroliză egală cu  $-10,3$  kcal/mol. Deoarece  $\Delta G^\circ$  de hidroliză a fosfocreatinei este mai negativă decât a ATP-ului (pentru reacția  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ ,  $\Delta G^\circ = -7,3$  kcal/mol) acest compus poate servi ca donator de fosfat pentru ADP:



Reacția este reversibilă, echilibrul fiind puternic deplasat spre dreapta. Fosforilarea ADP de către fosfocreatina este o reacție importantă pentru refacerea ATP consumat în contracția musculară (A. Lehninger, 1970).

Fosfocreatina, numită inițial *fosfagen*, a fost descoperită în musculatură (C. H. Fiske și Y. Subbarow, 1927). Drept „ghid” pentru urmărirea acestui compus, până la elucidarea structurii chimice, l-a constituit labilitatea fosfatului din molecula sa. Concentrația creatin fosfatului în musculatură este 20 mM.

La scurtă vreme după izolare s-a realizat și sinteza chimică a fosfocreatinei (K. Zeile și G. Fawaz, 1938; A. H. Ennor și L. A. Stocken, 1948, 1957). Fosforilarea creatinei (acid N-metil guanidinoacetic) (ca sare de sodiu) are loc cu oxiclorigarea de fosfor la pH alcalin (13,0-13,5) iar creatin fosfatul este izolat ca sare de bariu. Sarea de bariu este convertită la sare de sodiu prin adăugarea unei cantități stoechiometrice de sulfat de sodiu. Purificarea sării disodice are loc prin cristalizare fracționată din etanol apos. Reacția de sinteză este următoarea:



*Proprietăți.* La sinteză unele preparate dau un produs care cristalizează aciform și corespunde unui tetrahidrat. Mai frecvent se obține hexahidratul care cristalizează sub formă de plăcuțe hexagonale. Cantitatea de apă de hidratare este variabilă și depinde de temperatura la care s-a realizat uscarea creatin fosfatului disodic. Tetrahidratul pare a fi forma cea mai stabilă. Prin menținerea prelungită a hexahidratului, la temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  sub presiune redusă pe un agent de uscare rezultă tetrahidratul.

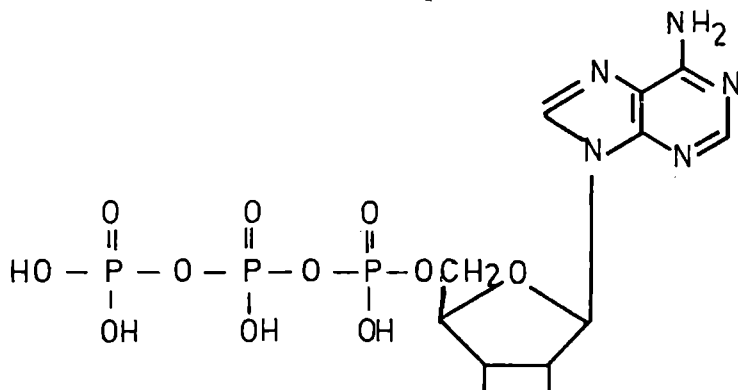
### 3.2. ADENOZIN TRIFOSFATUL (ATP)

Acidul adenozin trifosforic este prezent în musculatura în repaus a scheletului mamiferelor într-o concentrație de 0,3-0,4 g/100 g țesut. ATP-ul a fost izolat din mușchi ca sare de argint,  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_{13}\text{N}_5\text{P}_3\text{Ag}_3$  (C. H. Fiske și Y. Subbarow, 1929) sau ca sare de bariu,  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_{13}\text{N}_5\text{P}_3\text{Ba}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (K. Lohmann, 1931). Concentrația ATP în probe în timpul purificării a fost determinată prin raportul dintre fosfatul ușor hidrolizabil în acid la cald și fosfatul greu hidrolizabil (obținut prin mineralizare). Raportul dintre fosfatul ușor hidrolizabil în acid la cald (încălzire 7 min în HCl N pe baie de apă la fierbere) și cel greu hidrolizabil este de 2:1. Prin hidroliză acidă (15 min la  $100^{\circ}\text{C}$  în acid clorhidric N) dă adenină, D-ribozo-5-fosfat și fosfat anorganic în raport molar 1:1:2. Adenina a fost caracterizată ca picrat, iar D-ribozo-5-fosfatul ca sare de bariu,  $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5\cdot\text{PO}_3\text{Ba}$ .

Prin hidroliza ATP cu hidroxid de bariu rezultă acid adenilic și pirofosfat în timp ce hidroliza cu hidroxid de calciu dă acid adenilic și fosfat; explicația diferenței între cele două hidrolize constă în proprietatea curioasă a hidroxidului de calciu de a cataliza hidroliza pirofosfatului. Acidul adenilic a fost caracterizat ca acid liber.

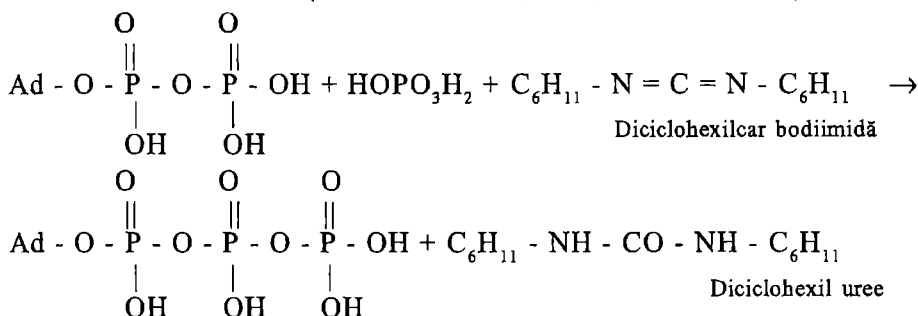
Prin diazotarea ATP cu azotat de sodiu și acid acetic s-a obținut acidul inozin trifosforic (K. Lohmann, 1932).

Din rezultatele de mai sus se atribuie pentru ATP structura următoare:



Raportul spațial dintre planul furanozic al D-ribozei și planul purinic al adenozei este aproximativ de perpendicularitate și acest raport spațial se menține și în structura derivaților ATP.

Una dintre sintezele ATP utilizează drept agent de deshidratare dicitohexilcarbodiimidă (J. M. Lowenstein, 1960; M. Smith, 1961):



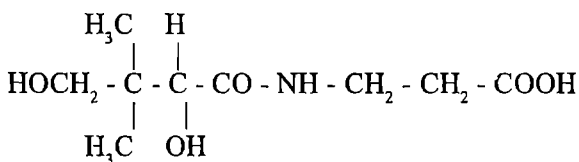
**Proprietăți.** Puritatea ATP implică analiza azotului, ribozei și fosforului. Măsurarea fosfatului anorganic și a raportului dintre fosforul hidrolizabil în acid clorhidric N la 100° timp de 7 min și fosforul organic total servesc drept criterii de puritate; raportul este de 2:3 pentru ATP deoarece numai două grupări fosfat se hidrolizează în aceste condiții.

ATP este stabil în soluții acide (de exemplu în acid tricloracetic 7%) la 0°C câteva ore. La pH 6,8-7,4 este stabil la 0°C timp de o săptămână.

ATP este optic activ:  $[\alpha]_D = -24,58$  ( $c=1,268\%$ ) (K. Barrenschen, 1932).

### 3.3. COENZIMA A ȘI FOSFOPANTETEINA

**Acidul pantotenic.** Recunoașterea acidului pantotenic ca vitamină a rezultat din studii asupra rolului „vitaminelor B complex” în prevenirea dermatitei puilor de găină. Investigarea nutriției drojdiilor și bacteriilor lactice a sugerat existența unor noi factori de creștere. S-a conchis apoi că un compus acid, prezent în majoritatea țesuturilor animale și vegetale, este responsabil pentru toate trei activitățile de mai sus. Compusul a fost numit acid pantotenic și s-a găsit că este un constituent al coenzimei A și al unei grupări active din proteina numită acyl carrier protein (ACP):



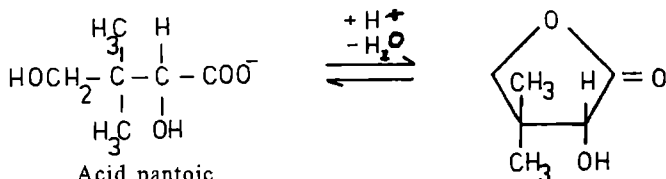
acid pantotenic

Acidul pantotenic a fost izolat inițial din ficat de oaie. Pentru aceasta extractul de autolizat a fost tratat mai întâi cu pământ decolorant, care adsoarbe o serie de impurități dar nu acidul pantotenic. Filtratul a fost agitat cu cărbune

activ (Norit) care reține acidul pantotenic cantitativ. Desorbția de la cărbune s-a realizat cu amoniac după care s-a preparat sarea brucinei; fracționarea acesteia a dus la acidul pantotenic.

Acidul pantotenic se hidrolizează, încet în mediu bazic dar rapid în mediu acid, la  $\beta$ -alanină și acid D-2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutiric (acid pantoic), ultimul fiind izolat sub formă de  $\gamma$ -lactonă levogiră.

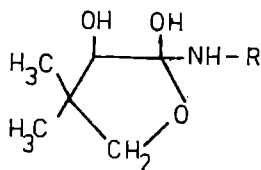
Anionul acidului pantoic preferă în soluție o anumită conformație în care substituenții stau de o parte și de alta a ciclului:



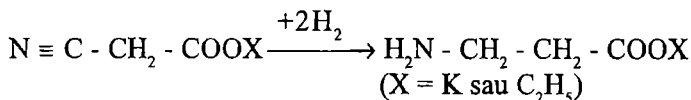
Acid pantoic

(Acid D-2,4-dihidroxi 2,2-dimetil butiric)

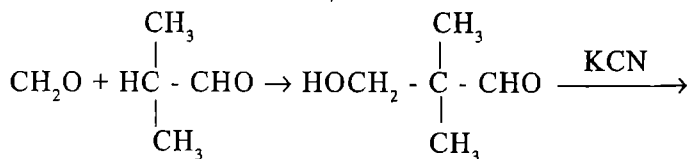
În molecula acidului pantotenic - care este dextrogir - acidul pantoic și  $\beta$ -alanina sunt legați printr-o legătură peptidică. Labilitatea, neobișnuit de pronunțată, a legăturii amidice din acidul pantotenic se explică printr-un efect în care este implicată gruparea hidroxil terminală; aceasta ar da naștere la o structură ortoamidică instabilă:



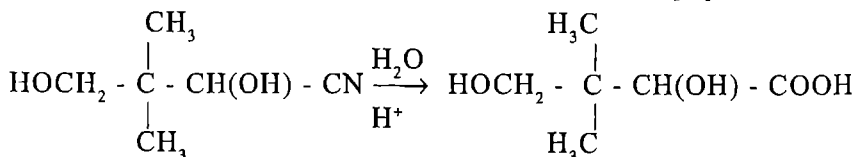
Atât acidul pantotenic cât și componentele sale,  $\beta$ -alanina și acidul pantoic, au fost obținute prin sinteză.  $\beta$ -Alanina a fost sintetizată prin reacția dintre acidul monocloracetic (ca sare de potasiu sau ca ester etilic) cu cianura de potasiu urmată de reducerea nitrilului la amină:



Cea de-a doua componentă a acidului pantotenic - acidul pantoic - a fost preparată pornind de la formaldehidă și aldehydă izobutirică:



Aldehydă 2,2-dimetil-3-hidroxiopropionică



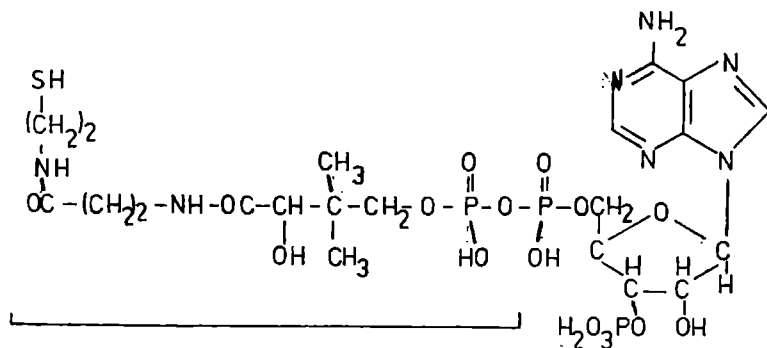
2,4-Dihidroxi 3,3-dimetil-butironitril

Acid pantonic (racemic)

Separarea antipozilor acidului pantoic s-a realizat prin intermediul sărurilor chininei. Lactona a fost purificată în continuare prin distilare în vid: p. f. 125-130°C/12 mm. Lactona are p.t. 91-92°C și  $[\alpha]_D^{25} = -50^\circ$  în timp ce racematul are p. t. 56-58°C. Condensarea lactonei acidului pantoic cu esterul benzilic al  $\beta$ -alaninei duce la esterul benzilic al acidului pantotenic. Îndepărtarea restului benzilic se face prin hidrogenare catalitică.

**Proprietăți.** După cum s-a spus mai sus acidul pantotenic este sensibil în mediu acid. Au fost descrise următoarele săruri ale acidului pantotenic: sarea de sodiu (higroscopică, p. t., 122°C,  $[\alpha]_D$  în apă + 29°), sarea de calciu (cristale, nehigroscopică), sarea de benziltiazoniu (p. t. 145-146°C).

**Structura coenzimei A.** Coenzima A are un rol important în transferul grupărilor acil (vezi acolo). Porțiunea activă din molecula coenzimei A o constituie gruparea tiol a cisteaminei. Concomitent cu elaborarea unor metode de purificare (E. R. Stadtman și A. Kornberg, 1953) și dozare (E. R. Stadtman, 1952) a fost elucidată și structura coenzimei A (T. P. Wang și colab., 1952):



Fospanteteină

S-a realizat și sinteza coenzimei A (J. G. Moffatt și H. G. Khorana, 1961).

Molecula coenzimei A conține trei grupări fosfat: două se găsesc într-o legătură pirofosfat iar a treia în formă monoester, esterificată la riboza porțiunii de acid adenilic a coenzimei. Fosfaza prostatică, o monoesterază, inactivează coenzima A prin îndepărtarea acestei grupări fosfat. S-a găsit că o enzimă din orz care clivează numai nucleotidele „b” (vezi acolo), îndepărtează de asemenea gruparea monoester fosfat și inactivează coenzima.

S-a constatat că nucleotidaza „b” hidrolizează fosfatul coenzimei A cu aceeași viteză cu care hidrolizează fosfatul acidului adenilic „b”, în timp ce enzima prostatică clivează fosfatul coenzimei A mult mai încet decât pe cel al acidului adenilic „b”.

S-a dovedit că gruparea monoester fosfat din NADP este esterificată în poziția „a” a acidului adenilic al coenzimei. Nucleotidaza „b” nu clivează legătura

monoester din NADP. S-a comparat fragmentul difosfoadenozină obținut din coenzima A, prin tratare cu nucleotid pirofosfatază din venin de șarpe, cu fragmentul difosfoadenozină obținut din NADP în condiții identice. S-a găsit în primul rând că cele două fragmente au o comportare cromatografică diferită. În al doilea rând tratarea celor două fragmente cu nucleotidaza „b” dă acid 5'-adenilic numai în cazul fragmentului provenit din coenzima A și nu în cazul derivatului din NADP. Toate acestea dovedesc că legătura fosfat monoester din coenzima A se găsește în poziția 3' a ribozei fragmentului adenilic, iar legătura fosfat monoester din NADP în poziția 2' a fragmentului adenilic.

*Proprietăți.* Coenzima A prezintă absorbție la 260 nm; bazat pe aceasta s-a elaborat o metodă de dozare spectrofotometrică utilizând un coeficient molar de extincție de  $15,9 \times 10^6$  cm<sup>2</sup>/mol. Dozarea coenzimei A prin arsenoliza acetil fosfatului cu transcetilază este de asemenea importantă.

### 3.3.1. Derivați S-acil ai coenzimei A

Separarea S-acetil coenzimei A din drojii și caracterizarea fizico-chimică (F. Lynen și colab., 1951, 1954) este considerată o contribuție importantă la studiul reacțiilor de acetilare și condensare în care acest compus ocupă o poziție cheie fiind intermediar comun (I. B. Wilson, 1952). Acetilarea coenzimei A s-a realizat cu tioacetat de sodiu, anhidridă acetică sau izopropenilacetat.

S-Succinil coenzima A a fost obținută atât pe cale enzimatică, de la 2-cetoglutarat (H. Beinert, 1952; D. R. Sanadi și J. W. Littlefield, 1952), cât și pe cale chimică (E. J. Simon și D. Shemin, 1953); esterificarea coenzimei A cu anhidridă succinică în prezența unei baze slabe, în condiții blânde, decurge exclusiv la gruparea tiol, grupările hidroxil și amino rămânând intacte. Variante ale metodelor de mai sus au dus la obținerea a o serie de derivați acil ai coenzimei A (tabelul 3.1).

Kornberg și Pricer (1953) au preparat S-palmitil CoA printr-o metodă enzimatică. Aceiași autori au sintetizat-o printr-o metodă chimică prin acilare cu acid tiopalmitic; acidul tiopalmitic a fost preparat prin reacția dintre acidul palmitic și pentasulfură de fosfor (P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>) la temperatura de 185°C.

*Proprietăți.* Spre deosebire de tioesterii coenzimei A cu acizii monocarboxilici, care sunt stabili, succinil coenzima A este instabilă la temperatura camerei și pH neutru. În tampon bicarbonat la pH 7,5 hidroliza ajunge la jumătate în 1-2 ore. În tampon fosfat la același pH viteza de hidroliză este considerabil mai mică. Stabilitatea succinil coenzimei A crește mult cu scăderea temperaturii. O soluție apoasă tamponată cu bicarbonat (pH final



7-7,5) păstrată în frigider peste noapte se descompune în proporție de maximum 20%. Coborând pH-ul unei soluții apoase la valoarea unu, succinil coenzima A este stabilizată încât poate fi păstrată câteva zile la temperatura camerei. Puritatea succinil coenzimei A se determină prin testul cu acid hidroxamic (F. Lipmann și L. C. Tuttle, 1945) sau prin măsurarea  $DO_{232}$  (lungimea de undă 232 nm este caracteristică legăturii tioester (E. R. Stadtman, 1952). Prin încălzire pe baie de apă la fierbere timp de 5-10 min succinil coenzima A se hidrolizează.

Tabelul 3.1.

Tioesteri ai coenzimei A

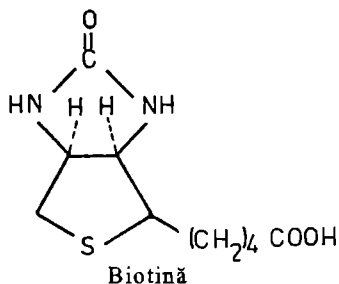
Compusul	Bibliografie
Acetil-CoA	R. Berman et al. 1954
Acetil-CoA (1- <sup>14</sup> C)	W. Stoffel, 1963
Propionil-CoA	F. Lynen și S. Ochoa, 1954
Butiril-CoA	''
Benzoil-CoA	D. Schachter și J. V. Taggart, 1954
n-Valeril-CoA	''
Crotonil-CoA	S. J. Wakil și H. R. Mahler, 1954
Miristil-CoA	A. Kornberg și W. E. Pricer, Jr., 1953
Palmitil-CoA	''
Linoleil ( <sup>3</sup> H)-CoA	W. Stoffel, 1963
γ-Linolenil ( <sup>3</sup> H)-CoA	''
11,14-Elicosadienoil (2- <sup>14</sup> C)-CoA	''
8,11,14-Eicosatrienoil (2- <sup>14</sup> C)-CoA	''

S-Palmitoil coenzima A poate fi păstrată în stare solidă la 0°C într-un exicator timp de un an fără descompunere. Soluțiile neutre sunt stabile câteva luni la -15°C. Puritatea se determină pe baza absorbției la 260 nm și a absorbției la 232 nm ( $\epsilon_{260} = 16,4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ;  $\epsilon_{232} = 9,4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ) (E. R. Stadtman, 1957; W. Seubert, 1960). Absorbția mai intensă la 232 nm indică prezența altor tioesteri (cum ar fi S-palmitoil glutationul care are absorbție puternică la această lungime de undă.

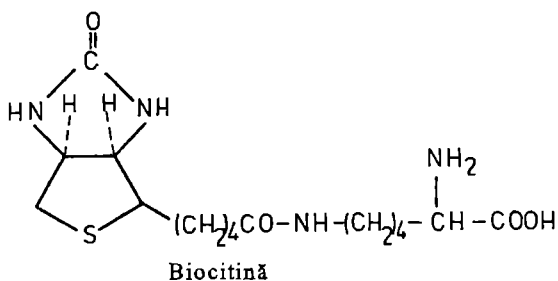
### 3.4. BIOTINA

Importanța biotinei pentru creșterea normală a drojdiilor a fost recunoscută încă din secolul trecut. Mai târziu a fost numită factorul curativ X, vitamina H precum și factorul de protecție împotriva carenței pricinuite de administrarea albușului de ou crud la șobolani. A fost izolată inițial din gălbenuș de ou și din ficat bovin, ca ester metilic în stare cristalizată.

Din punct de vedere chimic biotina este acid (+)-cis-hexahidro-2-ceto-1-H-tieno(3,4)-imidazol-4-valerianic:

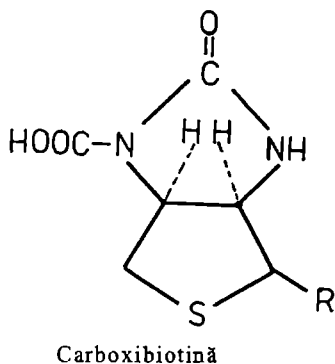


În cadrul țesuturilor biotina se găsește legată printr-o legătură covalentă la proteine. S-a dovedit aceasta prin izolarea, dintr-un autolizat de drojdii, a biocitinei,  $\epsilon$ -N-biotinil-L-lizină:



Se știe acum că acest rest de lizină se găsește în cadrul unei catene proteice în situsul catalitic al enzimelor care conțin biotină.

În organismele vii biotina joacă un rol important în reacții de carboxilare: în condiții adecvate biotina leagă  $\text{CO}_2$  dând carboxibiotina care la rândul ei poate ceda  $\text{CO}_2$  altei molecule formând o grupare carboxil:

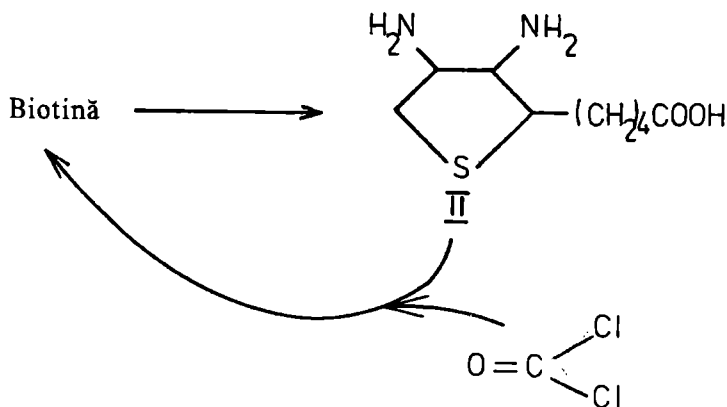


În albușul de ou a fost găsită o glicoproteină, avidina, care prezintă o afinitate extrem de ridicată pentru biotină; constanta de formare a complexului biotină-avidină este  $K = 10^{15}$  (D. Metzler, 1977). Afinitatea între biotină și avidină este atât de ridicată încât simpla administrare a avidinei (sub formă de albuș de ou crud) la șobolani duce la carența în biotină a acestora.

Biotina cuprinde în constituția ei ciclul tetrahidrotiofenului (P. György și F. W. Zillinken, 1974). Biotina a fost purificată îndeosebi din gălbenuș de ou și din ficat bovin. Pentru esterul metilic al biotinei s-a găsit formula moleculară  $C_{11}H_{18}O_3N_2S$ . Esterul metilic al biotinei se hidrolizează ușor dând biotina liberă  $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ , care pe baza titrării electrometrice s-a dovedit a fi un acid monocarboxilic. Prin tratarea acidului liber cu diazometan se obține din nou esterul metilic, identic cu esterul metilic obținut din ficat.

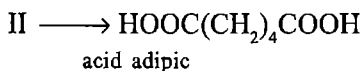
Prin tratare cu ninhidrină biotina nici nu dă reacție (pozitivă) de culoare nici nu este inactivată din punct de vedere biologic. Tratamentul cu acid azotos după Slyke nu dă reacție pozitivă ceea ce dovedește absența grupării amino precum și a atomului de azot bazic integrat într-un ciclu. Absența grupărilor  $-OCH_3$ ,  $-NCH_3$  și  $-SCH_3$  a rezultat din comportarea biotinei libere față de acidul iodhidric.

Hidroliza biotinei cu acid clorhidric sau hidroxid de bariu produce un acid diamino-carboxilic optic activ cu formula  $C_9H_{18}N_2O_2S$  (II). Tratarea acidului diamino-carboxilic cu fosgen duce la reobținerea biotinei:

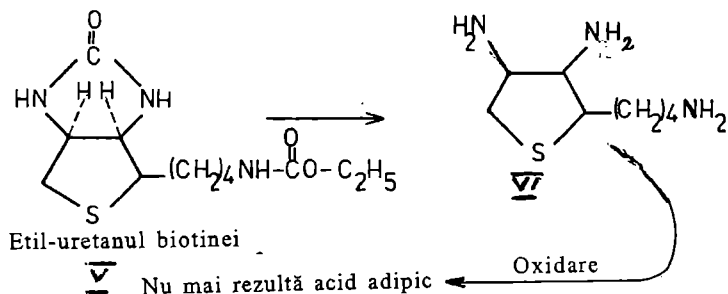


Faptul că din biotină rezultă prin pierderea unei grupări carbonil un acid monocarboxilic dibazic dovedește implicarea ureii într-o structură ciclică.

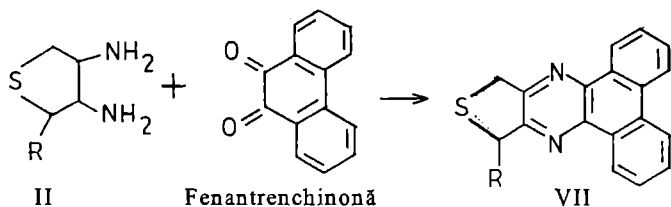
Oxidarea acidului II cu permanganat alcalin sau cu acid azotic concentrat dă acid adipic:



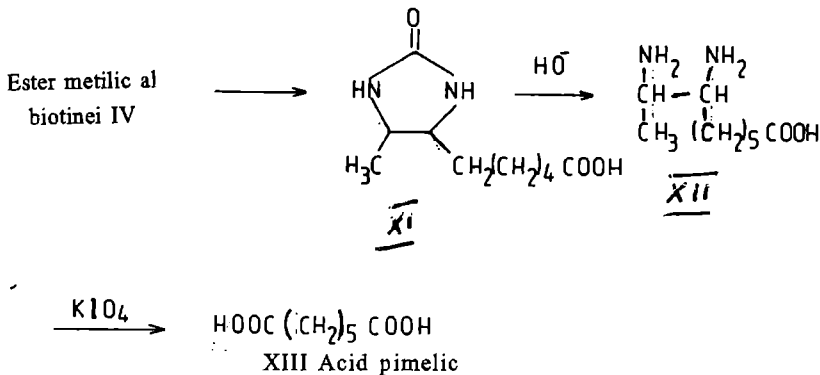
Acidul adipic ar putea lua naștere fie din catena laterală alifatică fie dintr-un ciclu de 6 C. În primul caz ar trebui să existe o grupare COOH în biotina inițială iar în cazul al doilea nu ar fi necesar acest lucru. Pentru a decide între aceste două posibilități esterul metilic al biotinei a fost supus unei degradări Curtius. Etiluretanul (V), rezultat prin fierberea azidei cu etanol, dă prin hidroliză cu hidroxid de bariu triamina (VI). Oxidarea triaminei nu mai produce acid adipic. Astfel s-a dovedit existența unei catene laterale a acidului valerianic în molecula biotinei.



Pierderea unei grupări carbonil prin hidroliză alcalină, precum și resinteza biotinei din II și fosgen indică o structură ciclică pe bază de uree. Se pune însă întrebarea dacă acest ciclu este de 5 sau de 6 atomi. (Prezența a două grupări amino în compusul rezultat prin hidroliza biotinei a fost dovedită prin titrarea Van Slyke (cu acid azotos)). Condensarea acidului diaminomonomocarboxilic II cu fenantrenchinonă a dovedit plasarea celor două grupări amino în poziții vecine precum și existența unui ciclu imidazolone de 5 atomi:

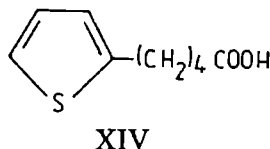


Se știe că tratarea unui tioeter cu nichel Raney duce la desulfurare completă. Esterul metilic IV al biotinei duce prin desulfurare la detiobiotinmetilester (XI),  $C_{11}H_{20}N_2O_3$ . Acesta prin hidroliză cu hidroxid de bariu sau acid clorhidric duce la acidul detiodiamino, mai precis acidul 7,8-diaminopelargonic (XII). Ultimul dă prin oxidare cu periodat acid pimelic (XIII). Această succesiune de reacții a stabilit pe de o parte existența acidului valerianic în molecula biotinei și pe de altă parte faptul că ciclul cu sulf este de 5 atomi:



Faptul că ciclul tiofanului este substituit în poziția  $\alpha$  a rezultat prin metilarea exhaustivă a acidului diaminocarboxilic (II) cu dimetil sulfat în soluție alcalină. Clivarea ulterioară a compusului permetilat cu acid clorhidric concentrat a dus la acidul  $\delta$ -(2-tienil)-valerianic (XIV) cu p.t. 40-41°C:

Pe baza analizei elementare, a spectrului UV și a reacțiilor de culoare s-a dovedit că compusul XIV este identic cu un preparat sintetic.



Se cunosc astăzi mai multe metode de sinteză ale biotinei, atât metode care duc la izomeri cât și metode stereospecifice.

**Proprietăți.** Biotina conține în molecula ei trei atomi de carbon asimetrici, prin urmare sunt posibil  $2^3 = 8$  izomeri; toți acești izomeri sunt cunoscuți.

Esterul metilic al biotinei este solubil în metanol, etanol, acetonă, și cloroform; este puțin solubil în acetat de etil și este practic insolubil în eter și în apă. Rotația specifică este  $[\alpha]^{22}_D +57,0^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c = 1$ ). Esterul metilic se hidrolizează cu alcalii diluate la temperatura camerei. Din soluția acidifiată cristalizează prin concentrare biotina liberă (p.t. 230-232°C cu descompunere). Biotina liberă se dizolvă bine în apă fierbinte și alcalii diluate; în apă rece și acizi diluați se dizolvă greu și este practic insolubilă în solvenți organici. Rotația specifică este  $[\alpha]^{22}_D = +92,0^\circ$  (NaOH 0,1 N;  $c = 0,3$ ).

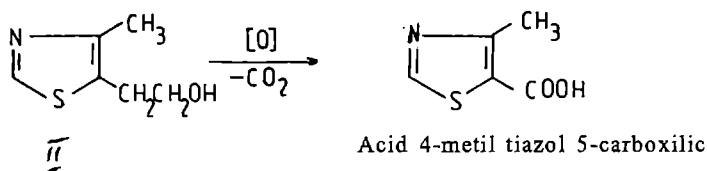
Au fost elaborate câteva metode colorimetrice pentru dozarea biotinei. D-Biotina reacționează cu aldehida 4-dimetilaminocinamică în mediu de acid sulfuric etanolic dând un compus colorat ce poate fi măsurat la 533 nm.

Reacția de culoare se pretează și la cromatografia în strat subțire.

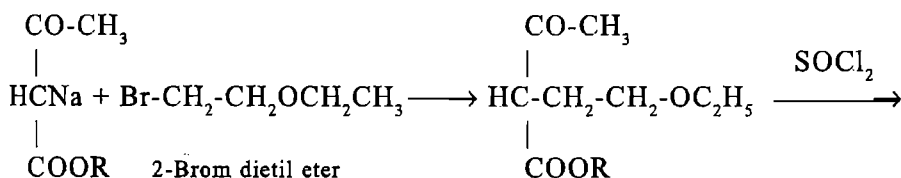
În alte procedee sulful biotinei este oxidat cu iodat de potasiu la sulfonă, când iodatul este redus la iod. Iodul este extras cu ciclohexan și măsurat la 520 nm.



Compusul II, obținut prin clivarea tiaminei cu sulfid, s-a dovedit a conține inelul tiazolic precum și o funcțiune de alcool primar a cărui oxidare duce la acid 4-metil tiazol 5-carboxilic:

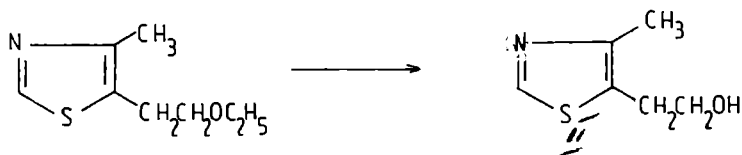
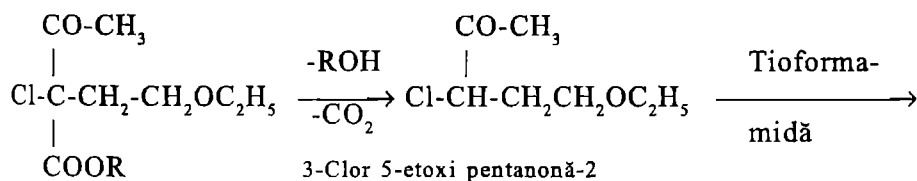


Ultimul compus fusese obținut anterior prin oxidarea moderată a tiaminei cu acid azotic. Structura compusului II a fost confirmată deasemenea prin sinteză:

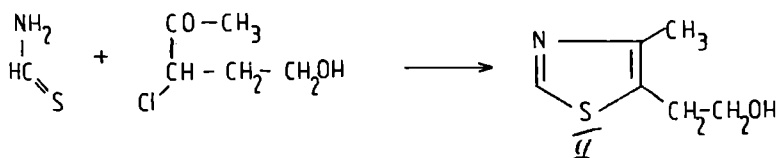


Derivatul monosodic al esterului acetil acetic

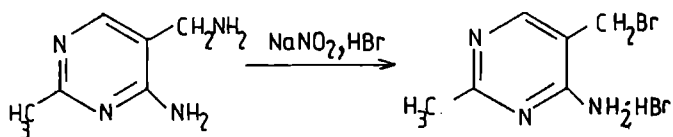
Ester  $\alpha$ -(2-etoxi-etil) acetil acetic



De fapt protecția grupării alcool prin eterificare nu este necesară: astfel prin condensarea tioformamidei cu 3-clor 3-acetopropanol rezultă, cu randament de 50%, compusul II:

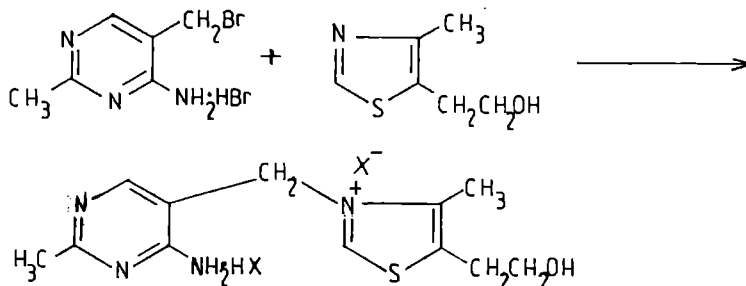


Clarificarea poziției de legare a celor două inele în molecula tiaminei a rezultat, pe de o parte, din poziția grupării sulfonice la metilen, după clivare cu sulfat. Înseamnă că gruparea metilen constituie o punte de legătură între cele două inele, inelul tiazolic găsindu-se ca sare de tiazoliu. Această ipoteză a fost confirmată prin sinteză: compusul bazic  $C_6H_{10}N_4$  a fost convertit prin reacția cu nitrit și HBr, în două etape, la hidrobromura 2-metil 4-amino 5-brom-metil pirimidină:



Hidrobromura 2-metil 4-amino 5-brom-metil pirimidinei

Ultimul compus se condensează cu derivatul tiazolic pentru a da tiamina (ca sare):



Tiamină (sare hidrohalogenată)

(X este inițial Br dar, prin reacție cu AgCl, X devine Cl ca în vitamina naturală).

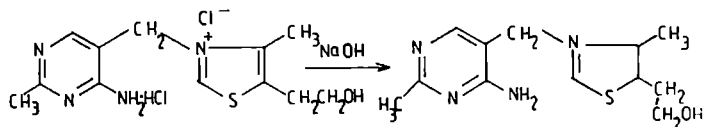
Se cunosc deasemenea numeroase sinteze industriale ale tiaminei.

**Proprietăți.** Hidroclorura tiaminei cristalizează sub formă de foițe incolore cu punct de descompunere 248-250°C. Este foarte solubilă în apă, mai puțin solubilă în alcool și insolubilă în eter, cloroform, etc. Din alcool diluat se obține ca hemihidrat.

Prin alcalinizarea unei soluții apoase de tiamin hidroclorură apare o colorație temporară în galben, care la pH nu prea înalt este stabilă cam o oră. Prin utilizarea alcoolatului de sodiu în etanol anhidru au putut fi distinse cele două trepte ale reacției iar produsul final, sarea de sodiu a tiamintiolului, a fost obținut în stare cristalizată. Acțiunea alcaliilor asupra vitaminei se explică în felul următor: un echivalent de hidroxid transformă mai întâi hidroclorura în tiamină liberă; al doilea echivalent de hidroxid duce la schimbarea celui de-al doilea atom de clor cu o grupare hidroxil. Ia naștere astfel hidroxilul de tiazoliu care este însă instabil

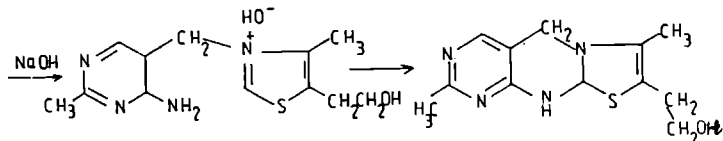


și se ciclizează prin acțiunea grupării amino primare asupra legăturii duble  $\Delta^2$  a ciclului tiazolic. Se formează un intermediar instabil incolor care se disproporționează la tiamină și sarea de sodiu colorată în galben. Ultimul compus se hidrolizează ducând la sarea de sodiu a tiamintiolului:



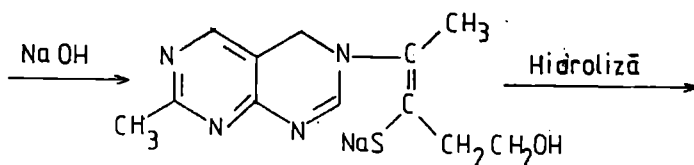
Clorura hidroclorică a tiaminei

Tiamina liberă

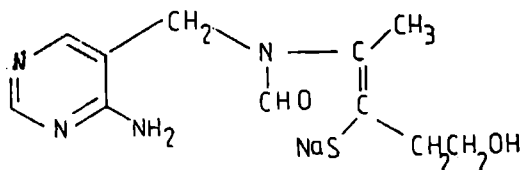


Hidroxid de N-tiazoliu

Intermediar incolor

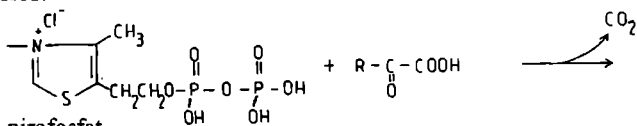


Intermediar de culoare galbenă

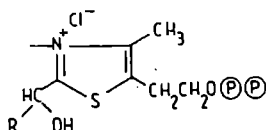


Sarea de sodiu a tiamintiolului

Reacția de ciclizare de mai sus la care participă gruparea amino primară și legătura dublă  $\Delta^2$  a inelului tiazolic, dovedește că atomul de carbon doi a ciclului tiazolic prezintă o reactivitate pronunțată. De altfel acest atom de carbon este implicat în mecanismele de nivel molecular ale tiaminei. De ex. decarboxilarea 2-ceto-acizilor:



Tiamin pirofosfat



Cu oxidul de argint clorura hidroclorică a tiaminei dă aceleași reacții ca și în cazul hidroxidului de sodiu.

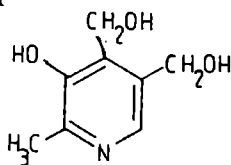
În mediu slab acid, tiamina este termostabilă și este stabilă deasemenea la oxidare. În mediu neutru sau alcalin este descompusă rapid prin încălzire.

Prin pasteurizarea laptelui se distruge cam 10% iar prin sterilizare cam 30% din tiamină. Prin coacerea pâinii se pierde 15-50% din vitamină.

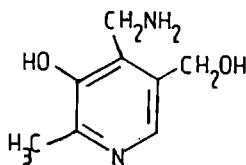
La pH 3-4 tiamina prezintă un maxim de absorbție în UV la 246 nm, care este atribuit inelului pirimidinic; prin alcalinizare la pH 5-8 maximul de la 246 nm este scindat în două maxime; 233 și 266 nm.

### 3.6. PIRIDOXINA ȘI COMPUȘII NATURALI ÎNRUDIȚI (VITAMINA B<sub>6</sub>)

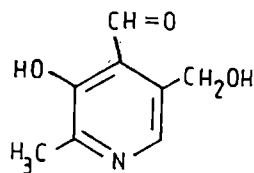
Existența unei noi vitamine a fost recunoscută în anul 1934 când s-a observat că șobolanii hrăniți cu o dietă lipsită de vitamine, dar suplimentată cu tiamină și riboflavină, dobândeau o dermatită facială, „pelagra șobolanilor”. În anul 1938 piridoxina (numită și piridoxol) a fost obținută atât prin izolare dintr-o sursă naturală cât și prin sinteză. S-a constatat apoi existența unor compuși cu activitate vitaminică mai intensă decât piridoxina. Este vorba despre piridoxamină și piridoxal:



Piridoxină



Piridoxamină



Piridoxal

Piridoxalul putea fi obținut din piridoxină prin oxidare blândă iar piridoxamina putea fi obținută din piridoxal prin încălzire cu acid glutamic în soluție; acest experiment a sugerat rolul piridoxalului și piridoxaminei în organismele vii: intertransformarea amino-acizilor și ceto-acizilor.

În țesuturile animale vitamina B<sub>6</sub> se găsește sub formă de piridoxal, piridoxamină și esterii lor fosfat. Labilitatea grupării aldehydice explică ușurința cu care vitamina se distruge prin încălzire sau iluminare excesivă. Pe de altă parte țesuturile vegetale conțin mai ales piridoxină, care este mai stabilă. Formele fosforilate sunt interconvertibile în interiorul celulei: piridoxin 5'-fosfatul poate fi oxidat la piridoxal 5'-fosfat iar acesta poate suferi transaminare la piridoxamin 5'-fosfat.

Din punct de vedere chimic piridoxina este 4,5-di-(hidroximetil)-3-hidroxi-2-metilpiridină.

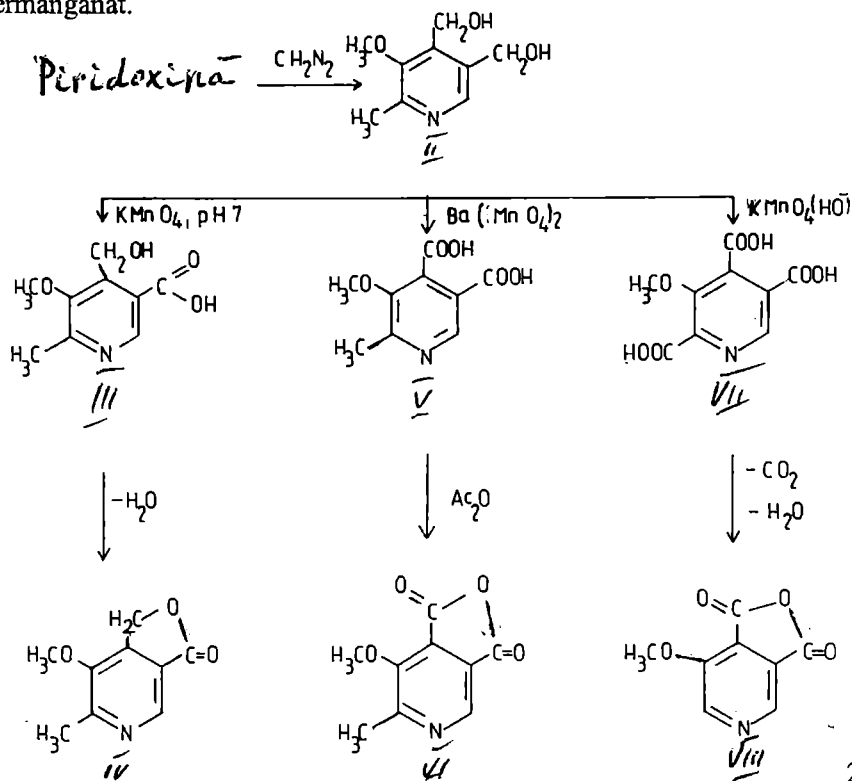
Piridoxina este o bază și are formula brută C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N. Hidroclorura acestei baze dă o colorație roșu-portocaliu cu clorura ferică; totodată dă o reacție de

cuplare cu sărurile de diazoniu. Aceste date susțin prezența unei grupări hidroxil fenolice sau enolic. Formarea unui triacetat distilabil și a unui tribenzoat arată că cei trei atomi de oxigen sunt în forma hidroxil. Tratarea cu diazometan duce la obținerea unui monometil-eter,  $C_9H_{13}O_3N$  care nu mai dă reacție pozitivă cu  $FeCl_3$  și nu mai dă reacție de cuplare cu acidul sulfanilic diazotat.

Tratarea O-metileterului cu anhidridă acetică în piridină duce la diacetil-O-metil-eter. Prin urmare s-a stabilit cu certitudine prezența unei grupări hidroxil fenolice și a două grupări hidroxil alifatic. În timp ce în piridoxină există trei atomi de hidrogen activi, în diacetil-O-metil-eter nu mai există nici unul. Aceasta ne face să presupunem că atomul de azot piridinic este legat terțiar într-un ciclu. Compararea spectrului UV al piridoxinei cu spectrul UV al 2-metil-3-hidroxi-5-etil-piridinei a susținut această presupunere.

Oxidarea Kuhn-Roth cu acid cronic a dovedit absența grupărilor O-metil și N-metil și a dovedit existența unei grupări metil. Cu reactivul Folin-Denis pe bază de fenol piridoxina dă o colorație albastră, a cărui spectru de absorbție este foarte asemănător cu al produsului de culoare dintre  $\beta$ -hidroxipiridină și reactivul Folin-Denis.

Faptul că eterul O-metilic al piridoxinei nu reacționează cu tetraacetatul de plumb arată că cele două grupări hidroxil alifatic nu sunt în poziția  $\alpha$ ,  $\beta$ . Clarificarea deplină a structurii a rezultat în urma oxidării tratate cu permanganat.



Compusul VII dă cu sulfatul feros o culoare roșie, la fel cu acidul piridin  $\alpha$ -carboxilic.

Oxidarea piridoxin-O-metileterului (II) cu permanganat de potasiu în soluție neutră a dus la obținerea unei lactone (IV) ceea ce dovedește poziția vicinală a grupărilor hidroxil alifatică.

Oxidarea piridoxin-O-metileterului (II) cu permanganat de bariu duce la acid 3-metoxi-2-metilpiridin-4,5-dicarboxilic (V) care în prezența anhidridei acetice este convertit la anhidrida corespunzătoare (VI). Aceasta dovedește poziția vicinală a celor două grupări carboxil. Oxidarea cu permanganat de potasiu în soluție alcalină duce la obținerea unui acid tricarboxilic (VII) care, la fel cu acidul piridin  $\alpha$ -carboxilic, dă cu sulfatul feros o colorație roșie. Acidul tricarboxilic (VII) poate fi transformat prin pierderea unei molecule de  $\text{CO}_2$  în anhidrida acidului dicarboxilic (VIII). Compusul VIII precum și VI nu reacționează cu sulfatul feros. S-a stabilit astfel cu certitudine că una dintre grupările carboxil a acidului tricarboxilic se găsește pe ciclu în poziția  $\alpha$  față de atomul de azot și aceasta era inițial gruparea metil. Cu acestea piridoxina este  $\alpha$ -metil-dihidroximetil- $\beta$ -hidroxipiridină.

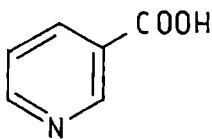
Spectrul de rezonanță magnetică protonică nucleară (RMP) a piridoxal fosfatului în  $^2\text{H}_2\text{O}$  este prezentat în Fig. 1.15.

### 3.7. PIRIDIN NUCLEOTIDELE

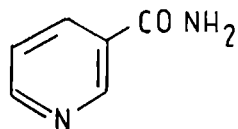
Piridin nucleotidele cuprind niacinamid adenin dinucleotidul (NAD, DPN) și niacinamid adenin dinucleotidfosfatul (NADP, TPN).

#### 3.7.1. Acidul nicotinic (niacina) și nicotinamida (niacinamida)

Acidul nicotinic (= niacina) este un acid piridin 3-carboxilic (I) iar amida acidului nicotinic (= niacinamida) este amida acidului piridin 3-carboxilic (II).

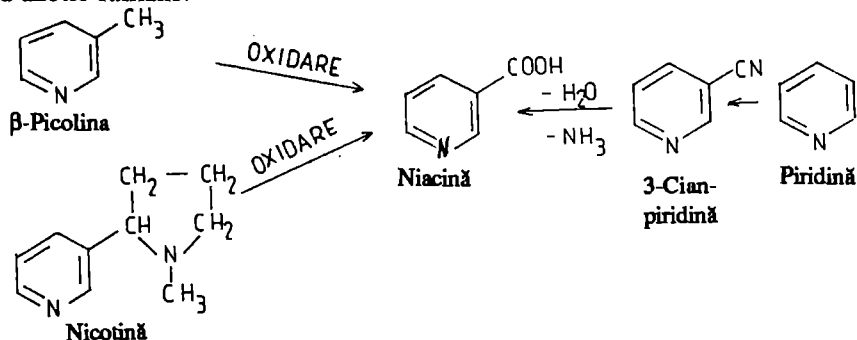


Acid nicotinic  
I (Niacina)



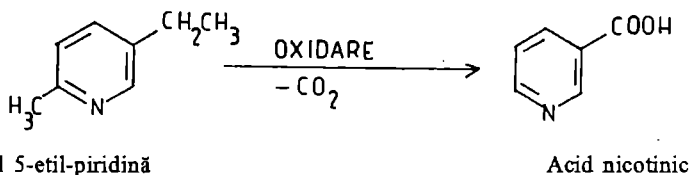
Amida acidului nicotinic  
II (Niacinamida)

Acidul nicotinic a fost preparat în 1867 prin oxidarea nicotinei cu acid cromic. Oxidarea se poate realiza de asemenea cu permanganat de potasiu sau acid azotic fumans:



La scurtă vreme după sinteză acidul nicotinic a fost de asemenea izolat din material biologic și anume din drojdii și din tărâțe de orez.

Prepararea industrială a acidului nicotinic pornește arareori de la materiale vegetale, cum ar fi nicotina. Mai frecvent se utilizează produși din gudronul de huiă, ca de ex.  $\beta$ -picolina și chinolina; se utilizează de asemenea piridina, produsul intermediar fiind 3-cianpiridina. Un procedeu interesant pornește de la 2-metil-5-etil piridină. Acest compus se obține din acetaldehidă și amoniac sub presiune la  $360^\circ\text{C}$  în prezența anumitor catalizatori. Oxidarea 2-metil-5-etil piridinei cu acid sulfuric în prezența dioxidului de seleniu drept catalizator dă acid nicotinic:

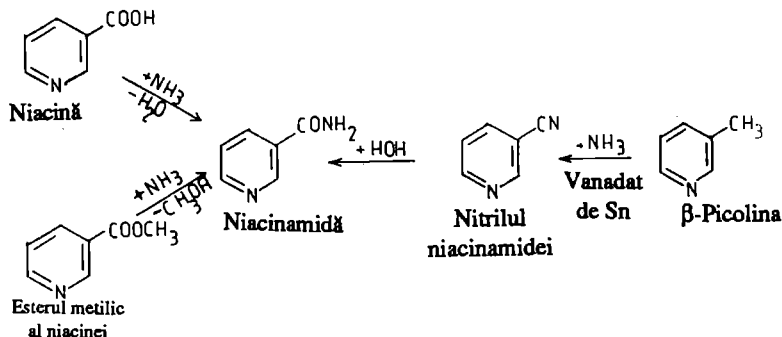


**Proprietăți.** Acidul nicotinic se prezintă sub formă de cristale aciforme, incolore, cu gust acru; p. t.  $234\text{-}237^\circ\text{C}$ . Este solubil în apă fierbinte și alcool fierbinte; este greu solubil în acetonă, cloroform și metanol, practic insolubil în eter. Substanța este stabilă față de încălzire și oxidare; soluțiile acidului nicotinic pot fi sterilizate în autoclav la  $120^\circ\text{C}$  la pH acid sau alcalin fără pierderea activității biologice. Spectrul de absorbție prezintă un maxim la  $261,5\text{ nm}$ ; în etanol substanța se găsește sub formă neutră, nedisociată. Soluția apoasă, saturată a acidului nicotinic prezintă un pH de 3,3 iar constanta de disociere acidă  $K_a = 10^{-4,9}$ .

Constanta de disociere bazică are valoarea  $K_b = 10^{-10,5}$ . Caracterul amfoter al acidului nicotinic este dovedit prin formarea sărurilor cu acizii și bazele tari.

Nicotinatul de cupru, precum și sărurile cu ionii altor metale grele, este practic insolubil în apă și poate servi la separarea acidului nicotinic.

*Nicotinamida* se prepară prin introducerea amoniacului într-o soluție de acid nicotinic sau prin reacția dintre amoniac și esterul metilic sau etilic al acidului nicotinic. Poate fi obținută deasemenea prin hidroliza parțială a nitrilului corespunzător acidului nicotinic.



**Proprietăți.** Nicotinamida se prezintă sub formă de cristale aciforme incolore sau pulbere cristalină albă. P. t.  $129^\circ\text{C}$ ; ușor solubilă în apă, metanol și etanol; solubilă până la 10% în glicerină, puțin solubilă în eter și benzen. Nicotinamida este una dintre cele mai stabile vitamine. O soluție 10% poate fi încălzită timp de 20 min la  $120^\circ\text{C}$  în autoclavă fără ca să aibă loc hidroliza. Nicotinamida prezintă un maxim de absorbție la 261,5 nm.

**Rol biologic.** În mod surprinzător rolul biochimic al nicotinamidei - acela de componentă al  $\text{NAD}^+$  și  $\text{NADP}^+$  - a fost cunoscut înaintea rolului de vitamină și anume de a putea vindeca două tipuri de afecțiuni: așa-zisa „limbă neagră” la câine și pe de altă parte pelagra umană.

### 3.7.2. Niacinamid adenin dinucleotid (NAD, DPN, Co-zimază, Co-enzima I)

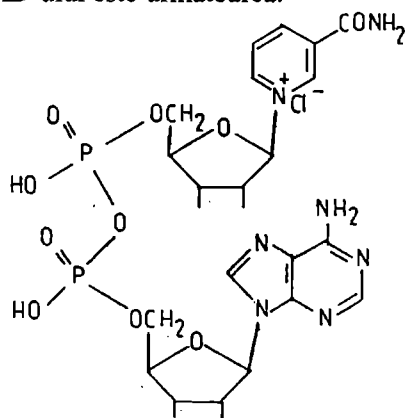
Sunt numeroase sistemele redox în care participă NAD-ul preluând moleculă de hidrogen (coenzima oxidată,  $\text{NAD}^+$ ) sau cedând o moleculă de hidrogen (coenzima redusă,  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ). De exemplu în ciclul Krebs malat dehidrogenaza catalizează reacția:



Enzima NAD kinaza catalizează fosforilarea NAD în poziția 2' obținându-se astfel NADP. Pentru unele ligaze NAD este donor de grupare adenilic sau chiar adenozin difosforibozil. O nucleotid pirofosfatază scindează NAD la NMN și AMP (vezi acolo).

NAD-ul a fost izolat din eritrocite (O. Warburg și W. Christian, 1936), din musculatură de iepure (S. Ochoa, 1937), din drojzii (H. von Euler și F. Schlenk, 1937; P. Ohlmeyer, 1938; G. A. Le Page, 1947). În majoritatea procedeele se efectuează o separare preliminară prin precipitarea sării de argint a NAD-ului. O purificare mai avansată se realizează prin precipitarea cu acid fosfotungstic (S. Ochoa, 1937) și clorură cuproasă (B. J. Jandorf, 1941), prin folosirea coloanelor de alumină, prin adsorbția NAD-ului pe cărbune urmată de eluție cu alcool amilic sau piridină apoasă (J. B. Neillands și A. Akeson, 1951). Un amestec de alcool, eter și acid sulfuric a fost utilizat pentru extracția, cu randamente foarte bune a NAD-ului din drojzii (J. B. Sumner și colab., 1947). Cromatografia de schimb ionic a fost utilizată deasemenea la purificarea NAD-ului (J. B. Neillands și A. Akeson, 1951; A. Kornberg și W. E. Pricer Jr., 1953). S-a găsit că Polenul conține 700-1.000  $\mu\text{g}$  NAD per gram de material proaspăt (H. v. Euler și colab., 1944).

Structura NAD-ului este următoarea:



A fost pusă la punct o metodă de obținerea NAD-ului care combină sinteza chimică cu cea enzimatică (D. R. Walt și colab., 1984) (Fig. 3.1.).

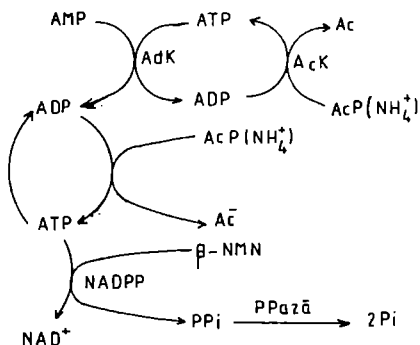


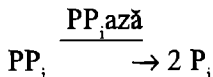
Fig. 3.1. Sistem de producere a NAD<sup>+</sup>.

Se pare că NADPP posedă activitate ATPazică.

Schema din Fig. 3.1. prezintă modul de obținere al NAD<sup>+</sup>. S-au utilizat următoarele enzime: AdK, adenilat kinază; NADPP, NAD pirofosforilază; AcK, acetat kinază; PP<sub>i</sub>ază, pirofosfatază anorganică. Toate aceste enzime au fost co-imbilizate pe suport solid. Deoarece reacția de pirofosforoliză:



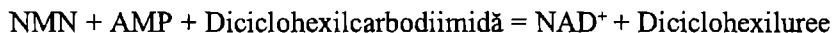
este reversibilă și are o constantă de echilibru egală cu 0,6, în mediu se introduce o pirofosfatază anorganică pentru a deplasa echilibrul spre dreapta prin hidroliza pirofosfatului:



S-a mai utilizat un sistem de regenerare a ATP cu ajutorul acetil fosfatului (AcP) și acetat kinazei (AcK).

Gelului cu enzimele co-imbilizate i s-au adăugat soluția de NMN, AMP, o cantitate catalitică de ATP, acetil fosfat și ditiotreit (ca antioxidant). Când reacția a fost completă (după cum a rezultat din dozarea enzimatică a β-NMN și NAD<sup>+</sup>), gelul a fost lăsat să sedimenteze și soluția a fost decantată. A rezultat NAD<sup>+</sup> cu un randament de 90% bazat pe β-NMN inițial.

A fost realizată deasemenea o sinteză chimică a NAD-ului din NMN și AMP în prezența dicitlohexil carbodiimidei ca deshidratant (N. A. Hughes și colab., 1957):



*Proprietăți.* La titrare NAD-ul se comportă ca un acid monobazic. Ca acid liber este stabil în soluție cel puțin o săptămână la 0°C; neutralizat este stabil cel puțin două săptămâni la 0°C. Fierberea soluțiilor neutre determină o descompunere treptată. Fierberea soluțiilor acide (pH 2) duce la distrugerea completă în 20-30 min. Acidul liber este foarte solubil. NAD-ul de înaltă puritate are o solubilitate de 0,5 mg/ml în soluție diluată de azotat de argint la 0°C. În amestecuri complexe cum ar fi extractul de drojdii solubilitatea sării de argint este mai mică. Sarea de plumb a NAD-ului are o solubilitate (la pH 5) care depășește 1 mg/ml (G. A. LePage, 1949).

În excicator pe clorură de calciu la temperatura camerei NAD-ul este stabil. Este foarte labil față de alcalii.

NAD-ul formează un complex cu cianurile alcaline, datorită prezenței niacinamidei N-substituite (S. P. Colowick și colab., 1951); acest complex a fost utilizat la dozarea sa. Formează deasemenea un produs de condensare fluorescent cu acetona (J. W. Huff și W. A. Perlzweig, 1947).



Spectrul de absorbție în UV al  $\text{NAD}^+$  și  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (Fig. 3.2.) arată că ambele specii moleculare prezintă un maxim de absorbție la 260 nm (datorită prezenței adeninei) dar numai  $\text{NADH}$  prezintă absorbție la 340 nm. Bazat pe această proprietate s-a elaborat o metodă de dozare a  $\text{NAD}$  utilizând alcool dehidrogenaza (E. Racker, 1950) sau malat dehidrogenaza (V. R. Potter, 1946). Coenzima oxidată poate fi de asemenea ușor redusă cu hidrosulfit (J. B. Neilands și A. Akeson, 1951). Coeficientul de extincție al  $\text{NAD}$ -ului redus la 340 nm este  $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  (0,1 micromoli de  $\text{NADH}$  într-un volum de 3 ml la un drum optic de 1 cm dă o  $\text{DO}_{340} = 0,207$ ) (B. L. Horecker și A. Kornberg, 1948). Coeficientul de extincție al  $\text{NAD}$ -ului oxidat la 260 nm este de  $18,0 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

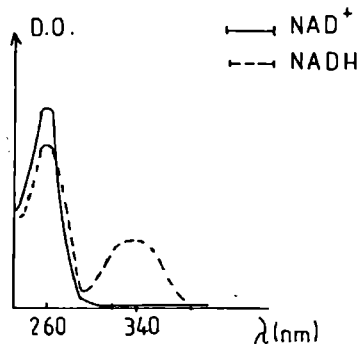
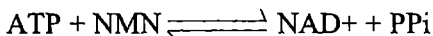


Fig. 3.2. Spectrul de absorbție în UV al  $\text{NAD}^+$  și  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .

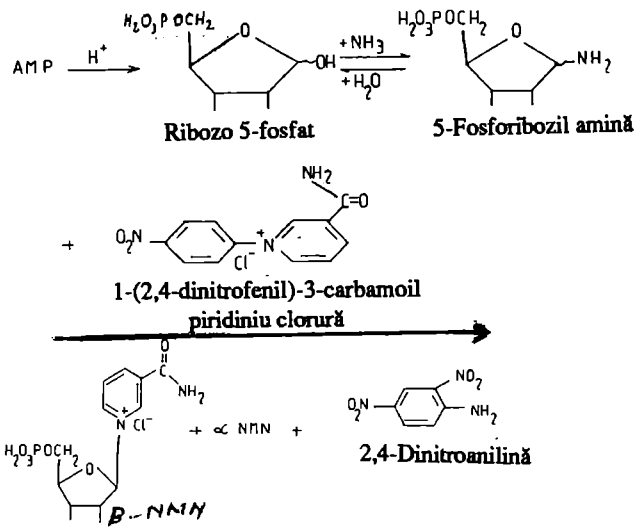
### 3.7.3. Niacinamid adenin mononucleotid (NMN)

În autolizate de drojdie și în extracte din pudră acetonică de ficat de porc a fost găsită o enzimă care catalizează reacția:



(A. Kornberg, 1950). Constanta de echilibru a fost evaluată la 0,45 (date mai recente dau 0,6; D. R. Walt și colab., 1984) astfel că pentru început această reacție a putut constitui o metodă de obținere a NMN. S-a constatat totodată că enzima respectivă acționează și pe  $\text{NADPH}$  în loc de  $\text{NADH}$ . S-a găsit concomitent o nucleotid pirofosfatază în cartofi: enzima a fost purificată de 800 de ori și s-a constatat că scindează legătura pirofosfat din  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ ,  $\text{ADP}$ ,  $\text{ATP}$  și tiamin pirofosfat (A. Kornberg și W. E. Pricer Jr., 1950).

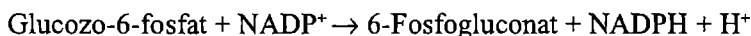
Actualmente NMN se obține prin sinteză chimică (D. R. Walt și colab., 1984). Se pornește de la AMP care se obține prin hidroliza ARN din drojzii. AMP este clivat prin hidroliză acidă la adenină și ribozo 5-fosfat iar acesta este convertit la 5-fosforibozil 1-amină pentru a „îngheța” molecula de riboză în forma  $\beta$ -ribofuranozică. Prin reacția fosforibozil aminei cu 1-(2,4-dinitrofenil)-3-carbamoilpiridiniu clorură rezultă NMN:



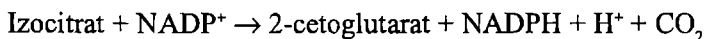
**Proprietăți.** Raportul molar niacinamidă-riboză-fosfor constituie un criteriu de puritate al NMN. Reducerea cu hidrosulfid urmată de măsurarea  $\text{DO}_{340}$  este deasemenea util. Testarea printr-o metodă enzimatică (vezi mai sus) este însă cea mai lipsită de echivoc.

### 3.7.4. NIACINAMID ADENIN DINUCLEOTID FOSFAT (NADP, Co-ferment, coenzima II, TPN)

În cadrul unității metabolice numită șuntul pentozofosfaților glucozo 6-fosfat dehidrogenaza catalizează reacția:



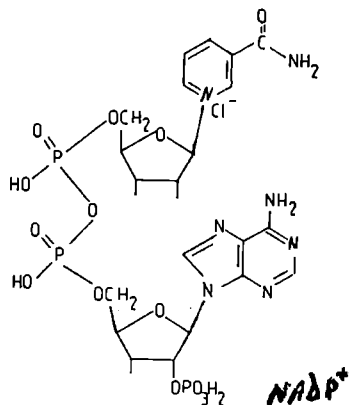
Izocitrat dehidrogenaza catalizează reacția:



Reacțiile de mai sus constituie doar două dintre multiplele implicații biochimice ale NADP.

Warburg și Christian (1932) au purificat NADP-ul din eritrocite de cal. Warburg și colab., (1935) au găsit NADP-ul în drojzii. Cu această ocazie autorii respectivi au stabilit o serie de date fizico-chimice privitoare la compoziția NADP-ului, care au rămas definitive: un mol NADP conține trei moli de acid ortofosforic, doi moli de D-riboză, un mol de niacinamidă și un mol de adenină.

De o importanță deosebită pentru producerea NADP-ului în cantități mari și într-o stare de puritate avansată a fost constatarea că în ficatul de porumbel



există o enzimă (NAD kinaza) care convertește  $\text{NAD}^+$  la  $\text{NADP}^+$ , în prezența ATP (T. P. Wang și colab., 1954). A fost deasemenea elaborat un sistem enzimatic de reducere a  $\text{NADP}^+$  la  $\text{NADPH}$  precum și purificarea coenzimei reduse (E. J. Pastore și M. Friedkin, 1961). Au fost deasemenea elaborate metode spectrofotometrice de dozare a  $\text{NADP}^+$ : în sistemul izocitrat dehidrogenază (S. Ochoa, 1948; T. P. Wang și colab., 1954) sau fosfogluconat dehidrogenază (B. L. Horecker și P. Z. Smirniotis, 1951).

D. R. Walt și colab., (1984) au îmbunătățit metoda de producere a  $\text{NADP}^+$  din  $\text{NAD}^+$  prin fosforilare enzimatică (Fig. 3.3.) (vezi și NAD).

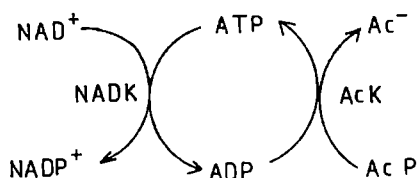


Fig. 3.3. Sistem de producere a  $\text{NADP}^+$ . Ac<sup>-</sup> este acetat; AcP, acetilfosfat; NADK, NAD kinază.

**Proprietăți.** Compusul purificat este ușor solubil în apă și este stabil săptămâni de-a rândul când este păstrat în frigider ca soluție a acidului liber. Este mai puțin stabil în acizi tari sau alcalii.

Puritatea se determină prin măsurarea densității optice la 340 nm a produsului redus pe cale enzimatică (spectrul de absorbție în UV este identic cu al NAD, vezi acolo). Coeficientul de extincție al NADP-ului redus, la această lungime de undă, este  $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  (B. L. Horecker și A. Kornberg, 1948). Glucozo-6-fosfatul și așa-zisul Zwischenferment (glucozo-6-fosfat dehidrogenaza) (O. Warburg și colab. 1935), 6-fosfogluconatul și fosfogluconat dehidrogenaza sau izocitratul cu izocitrat dehidrogenaza (S. Ochoa, 1948) sunt sisteme redox adecvate și specifice pentru NADP. Coeficientul de extincție al NADP-ului oxidat, la 260 nm, este  $18,0 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

### 3.8. FLAVIN COENZIME

Flavin coenzimele cuprind flavin adenin dinucleotidul (FAD) și flavin mononucleotidul (FMN).

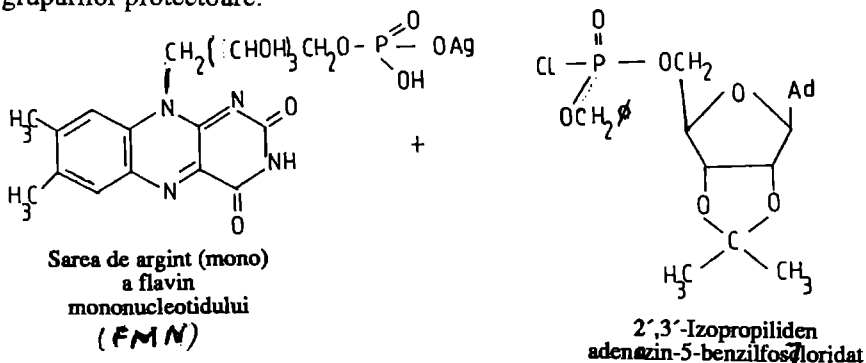
#### 3.8.1. Flavin adenin dinucleotid (FAD)

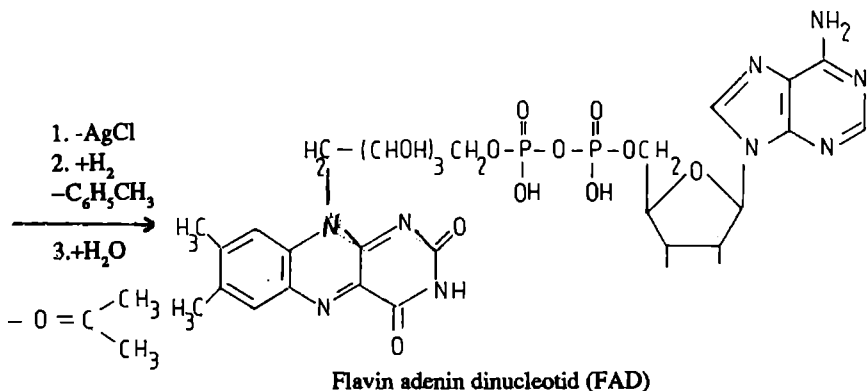
FAD-ul constituie una dintre formele de existență a riboflavinei (vitamina B<sub>2</sub>) în natură. Totodată există o serie de enzime, acoperind un spectru metabolic larg, care conține drept grupare prostetică FAD-ul: succinat dehidrogenaza, dihidrolipoil dehidrogenaza, acil-CoA dehidrogenaza, glicerol 3-fosfat dihidrogenaza, D-aminoacid oxidaza, glucozo-oxidaza, xantin oxidaza etc.

FAD-ul a fost preparat prima oară de către Warburg și Christian (1938) din ficat, rinichi sau drojdii. Ei purificau FAD-ul ca sare de bariu, argint sau mercur urmată de extracție cu fenol sau p-cresol. Acest procedeu a fost îmbunătățit de alți autori care utilizau în plus cromatografia de partiție sau adsorbție (E. Dimant și colab., 1952), cromatografie pe pudră de celuloză (L. G. Whitby, 1953), rășini schimbătoare de ioni (K. Yagi și colab., 1955) sau electroforeză pe o coloană de pudră celulozică (N. Siliprandi și P. Bianchi, 1955). În toate aceste cazuri materia primă o constituie un țesut animal sau drojdiile, care dă randamente mici.

S-a relatat producerea FAD-ului de către miceliul de *Eremothecium ashbyii* (T. Masuda și colab., 1955) care este aplicabilă la prepararea de cantități mari de FAD; utilizarea florisilului ca suport cromatografic a favorizat deasemenea obținerea FAD-ului pur în cantități apreciabile (K. Yagi și M. Tada, 1960).

FAD-ul poate fi obținut și prin sinteză chimică. S. M. H. Christie și colab., (1954) au condensat sarea de argint (mono) a FMN cu 2', 3'-izopropiliden adenozin-5-benzilfosfocloridat, urmată de îndepărtarea grupărilor protectoare:





Ulterior s-a realizat o sinteză directă de la FMN și AMP utilizând drept catalizator di-p-tolil carbodiimida (M. Huennekens și G. L. Kilgour, 1959).

Structura chimică a FAD-ului este legată de structura FMN și a 5'-AMP (vezi acolo). Asta întrucât a fost găsită o pirofosfatază care scindează legătura pirofosfat din  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ ,  $\text{ADP}$ ,  $\text{ATP}$  și tiamin pirofosfat (A. Kornberg și W. E. Pricer, Jr., 1950). Prin urmare, în prezența acestei enzime FAD-ul este clivat la FMN și 5'-AMP. Sinteza chimică mai sus menționată a confirmat deasemenea structura chimică prezentată. Și nu în ultimul rând constatarea că expunerea FAD-ului la oxidarea cu metaperiodat sau tetraacetat de plumb duce la distrugerea atât a restului ribitol cât și a D-ribozei a eliminat o serie de formule echivoce ale FAD-ului.

**Proprietăți.** Într-o stare de puritate relativ avansată concentrația FAD-ului se determină măsurând DO la 450 și 260 nm. Coeficientul molar de extincție al FAD-ului la 450 nm este  $11,3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Raportul  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{450}$  este utilizat ca un criteriu de puritate. Într-o stare de puritate avansată (peste 85%) acest raport are valoarea 3,24. Spectrul de absorbție al FAD-ului la pH 7 prezintă maxime de absorbție la: 447, 372, 265 și 220 nm.

Compusul este enzimatic activ în sistemul de reacție al D-oxidazei iar constanta de disociere a complexului dintre FAD și proteina oxidazei este  $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ .

Fluorescența soluției apoase este galbenă, spectrul de fluorescență având un maxim la 535 nm. Această fluorescență se intensifică prin hidroliză cu acid clorhidric când FAD-ul este hidrolizat la flavin mononucleotid.

FAD-ul dizolvat în apă la pH neutru este descompus de către lumină dar este mai stabil decât riboflavina sau FMN. În mediu alcalin FAD-ul este

fotodescompus cu aceeași viteză ca alte flavine. În întuneric soluțiile apoase de FAD sunt stabile timp îndelungat la 0°C dar la 80°C (sau mai sus) se hidrolizează la FMN. La temperatura camerei produsul trebuie protejat și contra atacului microbian.

### 3.8.2. RIBOFLAVIN 5'-FOSFAT (Flavin mononucleotid, FMN)

*Riboflavina.* Riboflavina este larg răspândită în lumea vie. Riboflavina se găsește ca atare în lapte, rețină (alături de FMN), urină, spermă. În multe țesuturi animale și vegetale riboflavina se găsește ca ester fosfat (FMN, vezi mai departe) sau ca flavinadeninucleotid (FAD).

Riboflavina pură a fost izolată din zer în cursul unei lucrări care avea ca scop purificarea vitaminei B<sub>2</sub>; s-a observat că preparatele care stimulau creșterea șobolanilor hrăniți cu o dietă lipsită de vitamina B<sub>2</sub> erau puternic colorate în galben și prezentau o fluorescență verde. Noul compus a fost numit lactoflavină. Alți compuși - ovoflavina, hepatoflavina, uroflavina, al cărui nume indică materialul de pornire, sunt identice chimic cu lactoflavina. Deoarece vitamina B<sub>2</sub> este un derivat al D-ribozei i s-a dat denumirea de riboflavină.

Concomitent și independent de lucrările de mai sus a fost descoperit „fermentul galben” din drojdii, care are în constituția grupării prostetice riboflavina; a fost astfel înțeleasă funcția biochimică a vitaminei B<sub>2</sub>.

Din 5400 l zer, care conține cam 1 l g riboflavină, a fost preparat 1 g vitamină pură și i s-a elucidat structura prin reacții de descompunere. Riboflavina este 7,8-dimetil-izoaioxazină substituită în poziția 10 cu un rest ribitol. Cele patru grupări hidroxil ale catenei laterale pot fi acilate. Acestea constituie două perechi vecine după cum arată formarea unui compus diizopropilidenic.

Oxidarea riboflavinei cu tetraacetat de plumb dă 0,8 moli formaldehidă, ceea ce dovedește prezența unei grupări hidroxil primare în vecinătatea unei grupări hidroxil secundare. Catena laterală conține trei atomi de carbon asimetrici. Distribuția spațială a grupărilor hidroxil a fost confirmată prin sinteză.

Prin expunere la lumină catena laterală se rupe și rezultă diferiți produși conform cu schema din Fig. 3.4.

Lumiflavina solubilă în cloroform a fost obținută din fermentul galben al drojdiei prin iradiere în soluție alcalină. Riboflavina este un derivat al izoaioxazinei în timp ce lumicromul constituie un derivat aloxazinic. Catena laterală a fost probabil scindată ca fragmente HOCH<sub>2</sub>CHO și HOCH<sub>2</sub>CH(OH)CHO. Riboflavina posedă structura următoare:

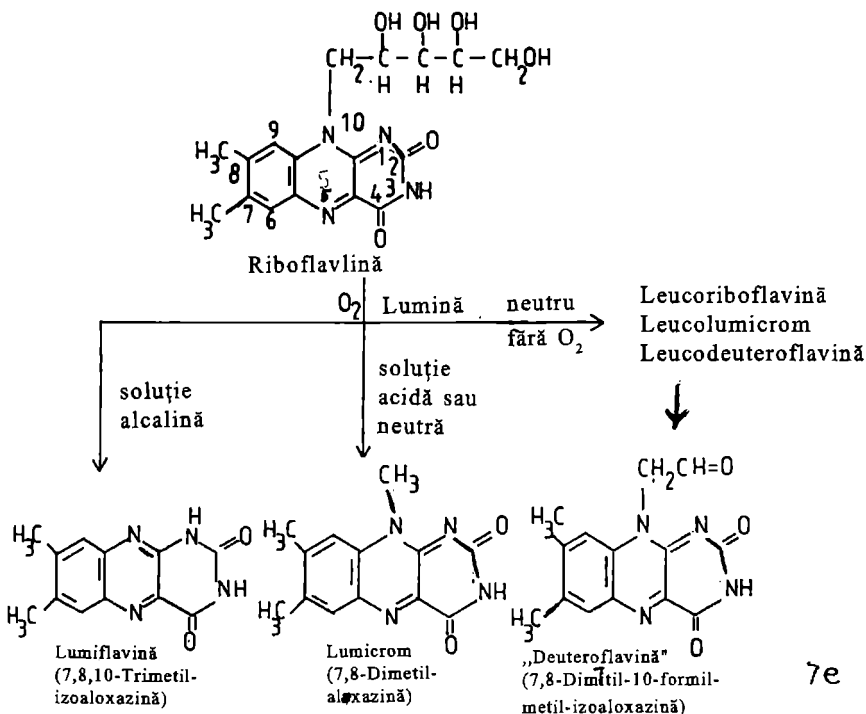
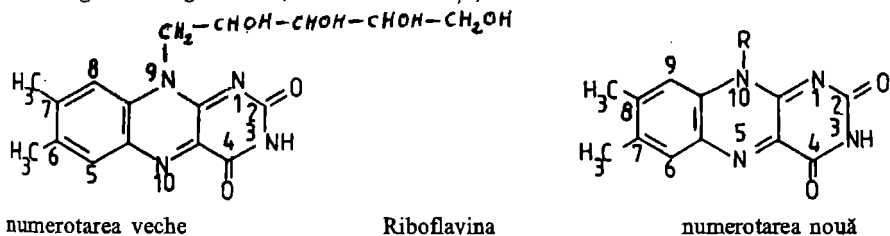
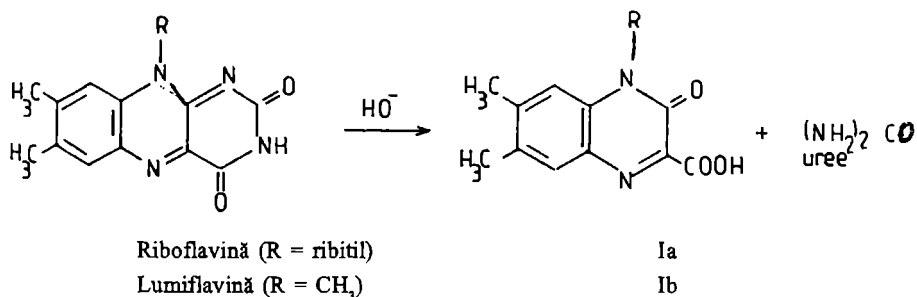


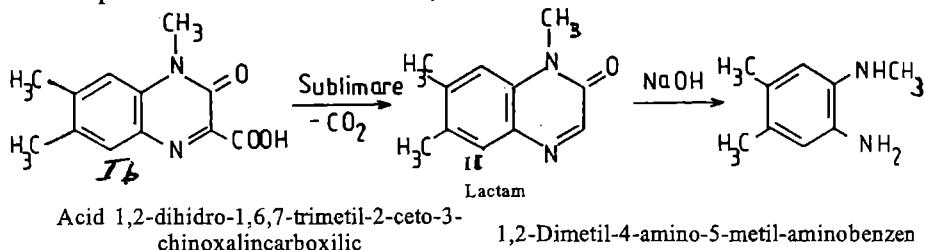
Fig. 3.4. Fragmentarea, în diferite condiții, a moleculei de riboflavină



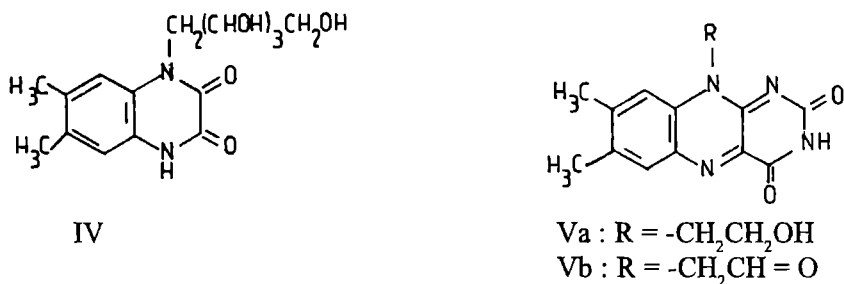
Riboflavina este 7,8-dimetil-10-(1'-ribitol)-izooxazină. Descompunerea ribo- și lumiflavinei în mediu alcalin are loc după cum urmează:



Descompunerea în continuare a compusului Ib are loc astfel:

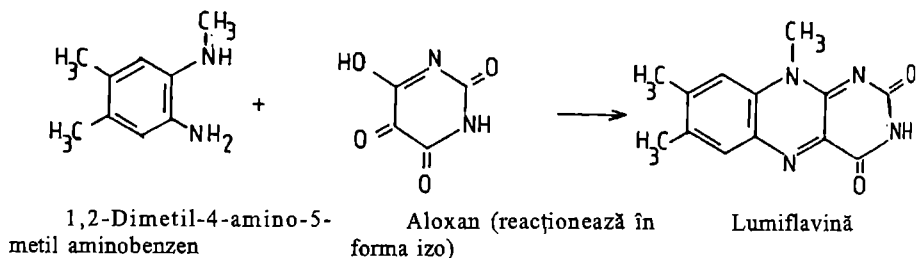


Descompunerea bacteriană a riboflavinei de către *Pseudomonas riboflavina* sau de către enzimele izolate din acesta duce, în prezența oxigenului și a NADPH, la 1-ribitol-2,3-diceto-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetilchinoxalină (IV):



În condiții anaerobe sau în cazul altor bacterii se formează din riboflavină, 7,8-dimetil-10(2'-hidroxi-etil)-izoaloxazină (Va); a fost izolat de asemenea un compus înrudit: 7,8-dimetil-10-formil-metil-izoaloxazină (Vb) („Deuteroflavină”):

*Sinteza flavinelor.* Structura lumiflavinei rezultată prin degradare a fost confirmată prin sinteză:



Sinteza riboflavinei a decurs în felul următor: prin condensarea 3,4-xilidinei cu D-riboză a rezultat 3,4-xilidin-N-ribotid. Acesta a fost redus la N-(D-ribitol)-3,4-dimetilanilină. Cel de-al doilea atom de azot a fost introdus în moleculă ca



grupare diazo a cărei hidrogenoliză a dus la 1,2-dimetil-4-amino-5-(D-1'-ribitol)-aminobenzen. Condensarea ultimului compus cu aloxanul a dus la riboflavină (Fig. 3.5).

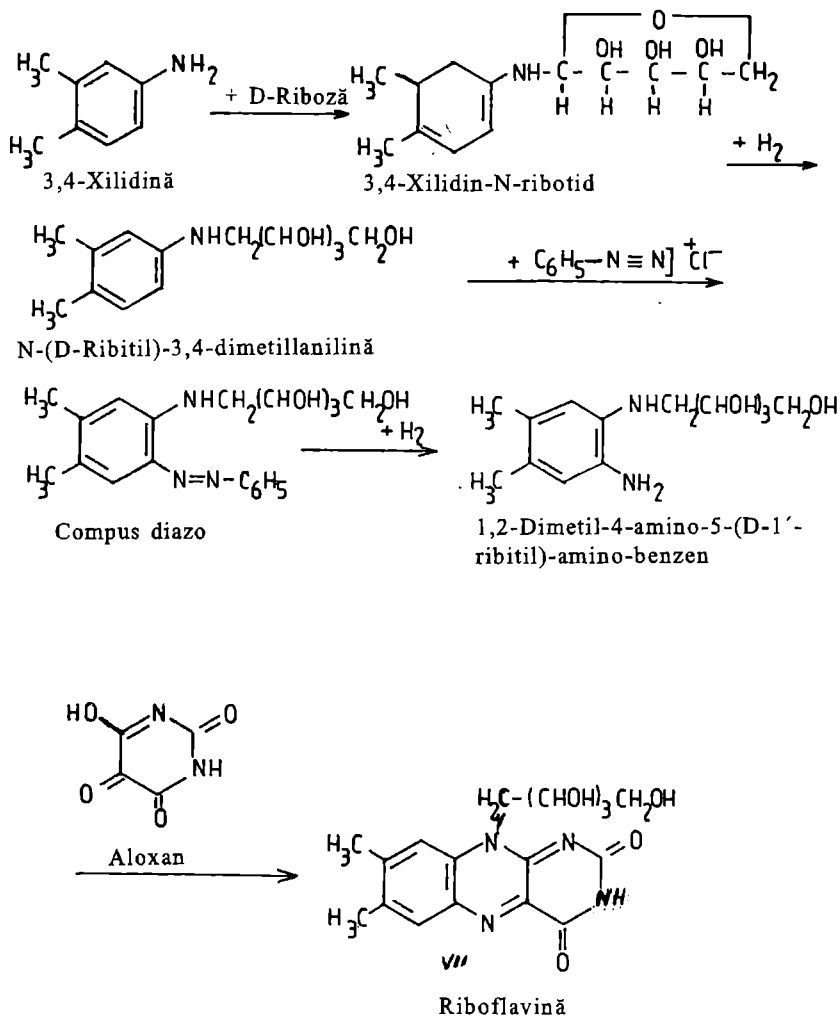


Fig. 3.5. Sinteza riboflavinei

**Proprietăți.** Formula moleculară a riboflavinei este C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> • P.t. 278-282°C (desc.). Riboflavina cristalizează din acid acetic diluat, alcool, apă sau piridină, sub formă de ace fine de culoare galben-portocaliu. Este insolubilă în eter, acetonă, cloroform și benzen; este puțin solubilă în fenol, acetat de amil

și alcoolii (în etanol până la 4,5 mg %). Solubilitatea în apă la temperatura camerei depinde de gradul de puritate și starea de cristalizare, situându-se între valorile 6,6-33 mg %. Pentru scopuri medicale s-au realizat concentrații mai ridicate pe diferite căi cum ar fi cu ajutorul mediatorilor de solubilitate sau prin utilizarea derivaților cu solubilitate mai ridicată. Solubilitate bună prezintă sărurile alcaline și unele amino-săruri (de ex. cu dietanolamina) ale acidului riboflavin-5'-fosforic (flavinmononucleotid = FMN).

Soluțiile apoase neutre ale riboflavinei sunt puternic colorate în galben (maxime de absorbție la 447, 372, 265 și 220 nm); totodată prezintă fluorescență verde (maxim la 530-565 nm). Bazat pe aceasta s-au elaborat metode de dozare colorimetrice și fluorimetrice. Numai formele neîncărcate electric ale flavinei prezintă fluorescență, dar nu și cationii sau anionii ei. Diferite substanțe ca: electroliții (de ex. iodura de potasiu), ionii metalici, compuși aromatici (îndeosebi fenolii), purinele, pirimidinele și tiolii îi sting parțial fluorescența. Majoritatea flavoproteidelor nu prezintă fluorescență măsurabilă.

pH-ul unei soluții apoase saturate de riboflavină se situează la valoarea 6, care se acordă cu punctul izoelectric. Vitamina are caracter amfoter; constantele ei de disociere sunt:  $K_a = 6,3 \cdot 10^{-12}$  și  $K_b = 0,5 \cdot 10^{-5}$ , iar potențialul redox  $E_o = -0,185$  V (pH 7). Activitatea optică are valori mici în domeniul neutru și acid iar în domeniul alcalin depinde de concentrație: în NaOH 0,1 N  $[\alpha]_D^{21} = -70^\circ$  (c = 0,06%) și  $-117^\circ$  (c = 0,5%). Esterul cu acidul boric este dextrogir.

În soluții apoase neutre sau acide riboflavina este destul de stabilă la căldură. În alcalii la cald se descompune repede, îndeosebi sub influența luminii. La iluminare cu o lungime de undă sub 600 nm riboflavina se descompune și în soluții neutre. Iradierea cu radiații Roentgen în soluție etanolică acidifiată cu acid sulfuric transformă vitamina într-un monohidroradical de culoare roșie.

În numeroase cazuri riboflavina a fost utilizată ca fotosensibilizator. Așa au fost oxidați prin iluminare în prezența riboflavinei următorii compuși: tirozina, DOPA, triptofanul, histidina, metionina, acidul indolilactic, acidul folic, vitamina B<sub>1</sub>, adrenalina și ergosterolul. Pe aceasta se bazează o metodă tehnică de preparare a piridoxal-5-fosfatului din compuși cu trepte de oxidare mai joase. Este posibilă și calea inversă: fotoreducerea flavinei cu amine și aminoacizi.

Deasemenea acizii nucleici și enzimele ( $\alpha$ -amilaza, ureaza, tripsina) pot fi inactivate de către lumina vizibilă în prezența riboflavinei. Inactivarea ADN are loc prin descompunerea guaninei.

Conversia, catalizată de către riboflavină, a metioninei la 3-metiltilio-propionaldehidă este răspunzătoare pentru alterarea gustului laptelui de către lumină; de aceea laptele nu se expune la lumina solară.

Față de oxidanți riboflavina este destul de stabilă astfel că impuritățile pot fi înlăturate cu ajutorul Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, HC10<sub>3</sub>; vitamina este descompusă însă de către hidroperoxid în prezență de săruri fero- sau cuprice. Pe lângă aceasta

se produce lumină cu o lungime de undă asemănătoare luminii fluorescente; această chemoluminescență este optimă la pH 7-8. Compușii aromatici adăugați în mediu sunt hidroxilați. Substratul luminescenței bacteriene pare a fi identic cu riboflavinofosfatul redus. În afară de aceasta luciferaza preparată din bacterii necesită, pentru producerea luminescenței, și o aldehydă cu catenă lungă (de ex. dodecilaldehydă) și oxigen.

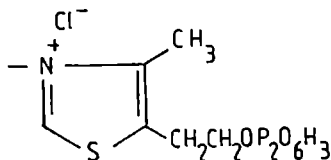
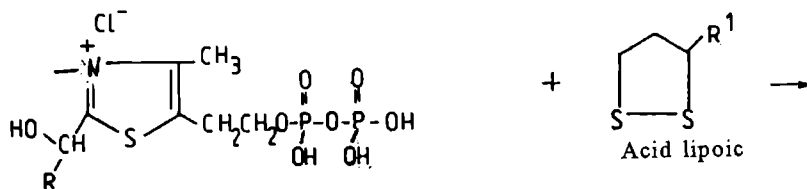
Riboflavina este eliberată din esterul riboflavin 5'-fosfat prin încălzire cu acizi diluați sau enzimatic.

Formele reduse ale riboflavinei sunt relativ greu solubile și această proprietate este utilizată pentru precipitarea riboflavinei prin reducere cu: metoda electrolitică, ditionit de sodiu, hidrogen sulfurat (sau sulfură de sodiu), săruri de  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ .

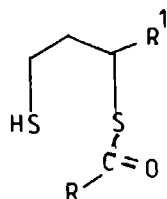
Metodele de dozare sunt colorimetrice sau fluorometrice, direct sau după iradiere adică prin transformare în lumiflavină care este solubilă în cloroform. La determinarea riboflavinei se mai utilizează proprietăți ca: dispariția fluorescenței riboflavinei prin reducere cu hidrosulfid (se măsoară fluorescența înainte de reducere și se scade fluorescența reziduală după reducere), dependența fluorescenței riboflavinei de pH (este maximă la pH 6,8-7,0 și minimă la pH 11,0). Maximul fluorescenței unei soluții de riboflavină la pH 7,0 este la 530 nm. O metodă extrem de specifică pentru dozarea riboflavinei s-a dovedit a fi metoda polarografică, potențialul de semiundă la pH 7 fiind -0,48 V.

### 3.9. ACIDUL LIPOIC (ACIDUL THIOCTIC)

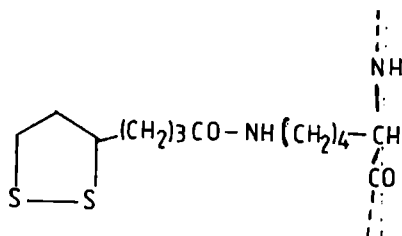
Descoperirea acidului  $\alpha$ -lipoic este de dată relativ recentă: compusul a fost descoperit în anul 1945 ca factor de creștere al organismului protozoar *Tetrahymena geleii*. În organismele vii acidul lipoic participă la decarboxilarea oxidativă a  $\alpha$ -ceto-acizilor; mai precis la preluarea unei grupări acil (aldehydice) de la tiamin-difosfat:



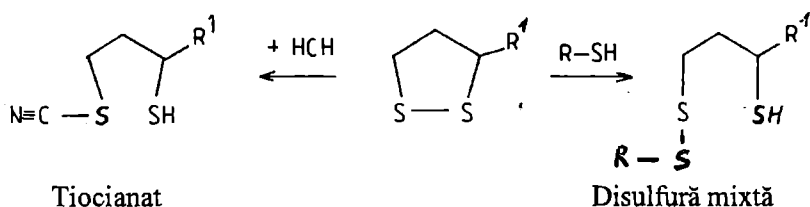
Tiamin pirofosfat



În organismele vii acidul lipoic se găsește, ca și biotina, combinat cu enzimele printr-o legătură covalentă a grupării amidice a catenei laterale a lizinei:



O proprietate chimică stranie a acidului lipoic este existența în ciclu a unei tensiuni de 17-25 kJ/mol. Din această cauză grupările tiol și acidul cianhidric reacționează ușor cu acidul lipoic oxidat pentru a da disulfuri mixte și respectiv tiocianați:



Pe de altă parte potențialul de reducere  $E^\circ$  (pH 7 și 25°C) este de -0,30 V, aproape același cu al NAD-ului redus (-0,32 V). Astfel că reoxidarea acidului lipoic redus de către  $\text{NAD}^+$  este termodinamic fezabilă.

Pe baza comportării chimice și polarografice s-a conchis că acidul lipoic este o disulfură ciclică. Pe baza cercetărilor structurale cu raze Roentgen, precum și spectroscopia în infraroșu s-a găsit că forma ciclică a acidului lipoic conține o legătură disulfurică a acidului 6,8-dimercaptooctanoic. Dovada a rezultat și prin sinteză (Fig. 3.6). Acidul lipoic a mai fost denumit acid 1,2-ditiaciclo-pentan-3-valerianic. Acidul lipoic a mai fost numit acid 6,8-tiooctanic sau, mai pe scurt, acid tioctic. Are formula  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$ .

Există mai multe metode de sinteză a acidului lipoic. Una dintre acestea pornește de la clorura esterului etilic al acidului adipic (I). Aceasta prin reacție cu etilena, în prezență de  $\text{AlCl}_3$  duce la esterul etilic al acidului 8-cloro-6-oxo-octanoic care prin eliminare de HCl trece în esterul etilic al acidului 6-oxo-7-octenoic (II). Acesta prin reacție cu acidul tioacetic a dus la 8-acetiltioderivat (III), iar prin reducere ulterioară cu borohidură de sodiu la esterul etilic al acidului 8-acetiltio-6-hidroxiocetanoic (IV), din care prin hidroliză ia naștere acidul liber (V). Prin tratarea acestui acid cu tiouree și acid iodhidric se obține acidul 6,8-dimercaptooctanoic (VI), care prin reacția cu oxigenul în prezență de clorură ferică se ciclizează (VII) (Fig. 3.6).

*Proprietăți.* Racematul acidului  $\alpha$ -lipoic obținut prin sinteză cristalizează aciform (de culoare galbenă) cu p.t.  $61^{\circ}\text{C}$ . În solvenții organici obișnuiți acidul  $\alpha$ -lipoic este ușor solubil; este puțin solubil în apă. Soluția metanolică a compusului prezintă în spectrul UV un maximum de extincție la 332 nm (datorat tensiunii din ciclu) și un minim la 280 nm.

Acidul lipoic se transformă, prin desulfurare cu nichel Raney, în acid n-caprilic.

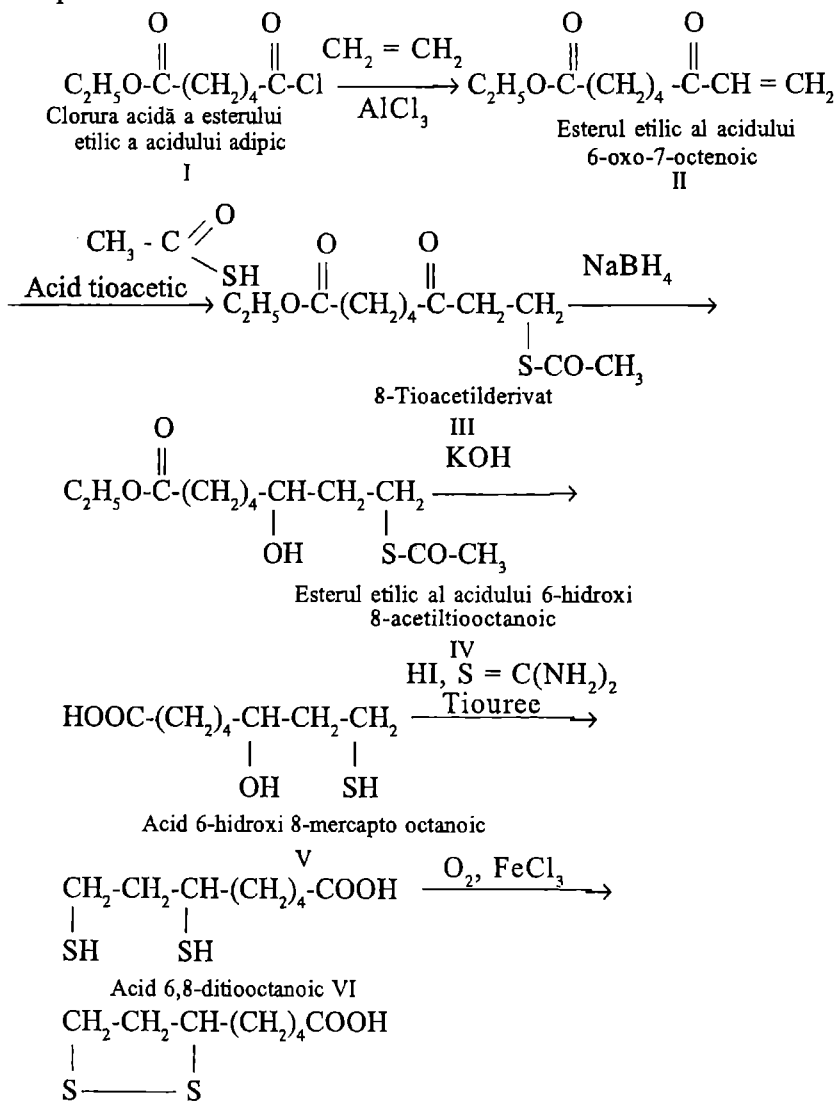
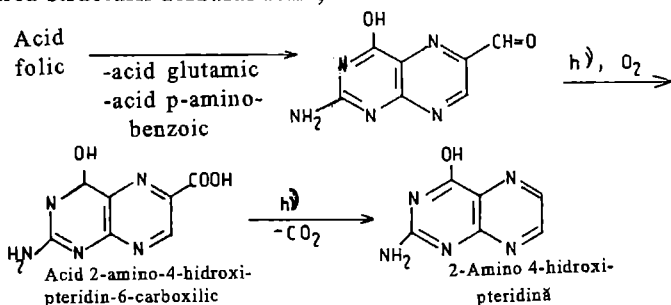


Fig. 3.6. Sinteza acidului lipoic.

### 3. 10. GRUPA ACIDULUI FOLIC

S-a observat că pacienții cu anemie macrocitică tropicală - o anemie în care eritrocitele sunt mărite, dar reduse ca număr - se vindecă prin administrare de extracte de drojdii sau ficat. Boala putea fi, de asemenea, observată la maimuțele hrănite cu o dietă corespunzătoare. O anemie similară putea fi indusă la puii de găină; boala putea fi vindecată cu ajutorul unui compus existent în drojdii, lucernă și alte materiale biologice. Recunoașterea, pe de altă parte, a existenței unor substanțe de creștere ale bacteriilor (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis* etc.) a dus la descoperirea structurii compusului legat de activitățile de mai sus - acidul folic (acid pteroil glutamic). Una dintre funcțiile biologice ale acidului folic este interconversia serinei și glicinei. Mai precis, un derivat al acidului folic, acidul tetrahidrofolinic, este răspunzător pentru transportul grupărilor formate dintr-un singur atom de carbon aflat în grade de oxidare variabile. Acidul folic a fost numit și vitamina B<sub>9</sub>.

Experimentele de fotoliză corelate cu analiza fragmentelor formate au contribuit la elucidarea structurii acidului folic; fotoliza acidului folic are loc astfel:

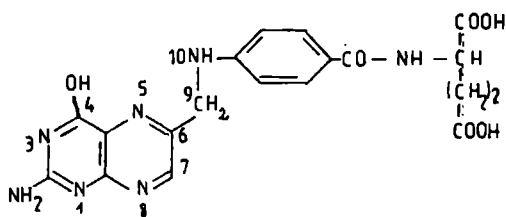
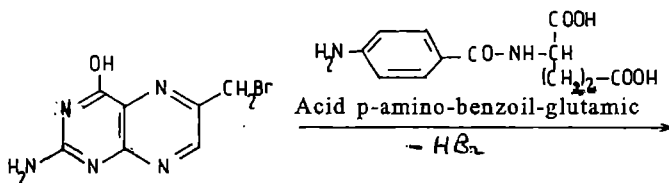
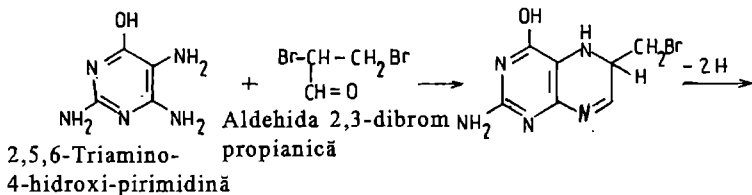


Clarificarea structurii acidului folic s-a bazat în esență pe descompunerea acestuia la acid 2-amino-4-hidroxi-pteridin-6-carboxilic. Acest acid a putut fi obținut prin oxidarea 2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridinei sintetice, ceea ce a dus la cunoașterea structurii sale.

Sinteza acidului folic (acid p (2-amino-4-hidroxi-6-pteridil)-metil-amino-benzoilglutamic) cunoaște o diversitate de căi. Una dintre ele este prezentă mai jos.

**Proprietăți.** În apă fierbinte acidul folic este solubil în proporția de 1:5000, din care se obține sub formă de cristale de culoare galben-portocaliu ( $2\text{H}_2\text{O}$ ). Se descompune ușor în mediu acid sau alcalin, precum și sub influența luminii (mai ales UV).

Prin hidroliza acidului folic cu NaOH la  $100^\circ\text{C}$  în prezența oxigenului se formează acid 2-amino-4-hidroxi-pteridin-6-carboxilic.



Acid folic  
(Acid pteroil glutamic)

Dacă materialul de testat conține cel puțin 50% acid folic, acesta poate fi determinat spectrofotometric în UV. Acidul pteroil-glutamic ( $2H_2O$ ) pur posedă la pH 13 în mediu apos următorii coeficienți de extincție:  $\lambda_{max} = 256 \text{ nm}$ ,  $\log \epsilon = 4,43$ ;  $\lambda_{max} = 283 \text{ nm}$ ,  $\log \epsilon = 4,40$ ;  $\lambda_{max} = 368 \text{ nm}$ ,  $\log \epsilon = 3,96$ .

Se recomandă două procedee chimice pentru dozarea acidului folic: acidul folic în mediu acid este redus la 2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridină și acid p-amino-benzoic, respectiv, acid p-amino-benzoil-glutamic; ultimii doi sunt dozați printr-o reacție de cuplare urmat de colorimetrare (A. C. Bratton și E. K. Marshall, Jr., 1939; J. Komendh, 1954). Pe de altă parte, oxidarea acidului folic la acid 2-amino-4-hidroxi-pteridin-6-carboxilic și măsurarea fluorescenței produsului de oxidare, constituie o altă metodă de dozare.

*Derivați.* 1. Acidul 7,8-dihidrofolic a fost preparat din acid folic fie prin hidrogenare catalitică pe  $PtO_2$  (Fig. 3.7), fie prin reducere enzimatică, cu NADPH (B. L. O'Dell și colab., 1947; B. E. Wright și colab., 1958). Reducerea acidului folic cu hidrosulfid de sodiu ( $Na_2S_2O_4$ ) în prezență de ascorbat, a dus de asemenea la acid 7,8-dihidrofolic (S. Futterman, 1957). Acidul dihidrofolic apare de asemenea prin expunerea acidului tetrahidrofolic la aer (vezi acolo). Acidul

7,8-dihidrofolic are un maxim de absorbție la 283 nm la pH 7,5 cât și la pH 12. La pH 7,5  $\epsilon = 19 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ , iar la pH 12 raportul  $\text{DO}_{283}/\text{DO}_{340} = 2,9$ .

2. Acidul 5,6,7,8-tetrahidrofolic a fost preparat din reducerea acidului folic fie catalitic ( $\text{PtO}_2$ ; Y. Hatefi și colab., 1960), fie enzimatic cu NADPH, via acid 7,8-dihidrofolic (M. J. Osborn și F. M. Huennekens, 1958; S. Futterman, 1957) (Fig. 3.7).

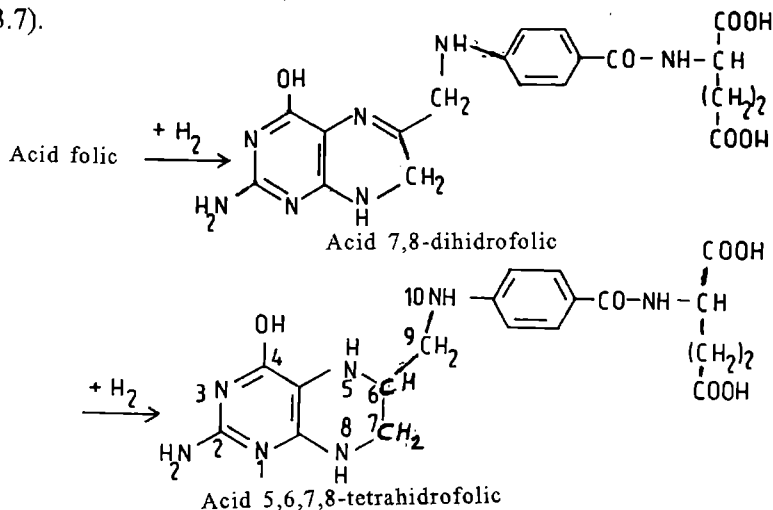
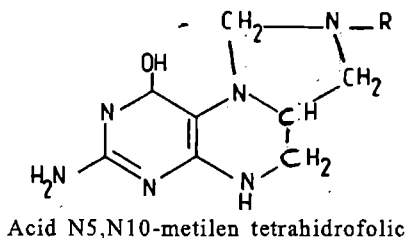


Fig. 3.7. Reducerea, în trepte, a acidului folic.

În NaOH 0,1 N acidul tetrahidrofolic are un maxim larg de absorbție la 286 nm. Coeficientul molar de extincție este  $18,5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ . Acidul tetrahidrofolic este extrem de sensibil la oxidare, mai ales în stare umedă: proaspăt dizolvat în tampon la pH 7,0 prezintă maxim de absorbție la 297 nm. În timp de 10 min la temperatura camerei maximul de absorbție se strămută la 282 nm; această schimbare este mult întârziată în prezența mercaptoetanolului. Compusul cu maxim de absorbție la 282 nm este cu certitudine acidul dihidrofolic, fapt dovedit atât de spectrul său, precum și prin reducerea sa la acid tetrahidrofolic de către o enzimă dependentă de NADPH.

3. Acidul N5, N10-metilen tetrahidrofolic, obținut prin condensarea formaldehidei (rezultată din serină) cu atomii de azot menționați ai acidului tetrahidrofolic, este un intermediar important în transferul fragmentelor conținând un atom de carbon:

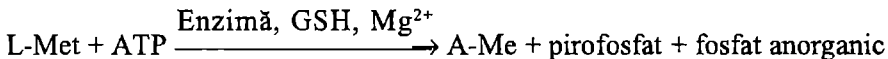




### 3.11. S-ADENOZIL-L-METIONINA (A-Me) S-(5'-Deoadenozin-5')-L-metionina

Atât sub aspect cantitativ, cât și ca diversitate S-adenozil-metionina constituie unul dintre principalii donori de grupări metil din organismele vii.

S-Adenozil metionina este produsul unei reacții enzimactice (G. L. Cantoni, 1953):



(Enzima a fost inițial izolată din ficat de iepure). Structura compusului a rezultat din cercetări întreprinse asupra S-adenozil-L-metioninei marcate cu  $^{14}\text{C}$  sau  $^{35}\text{S}$ , cercetări rezumate în Fig. 3.8 (J. Baddiley și G. L. Catoni, 1953). La cele de mai sus se adaugă următoarele rezultate: la pH 7,8 S-adenozil-L-metionina migrează ca un cation; pe rășini schimbătoare de ioni se comportă ca o bază tare. Prin tratare cu acid nitros baza purinică devine hipoxantină. S-Adenozil-metionina dă reacție pozitivă cu periodatul, ceea ce dovedește existența a două grupări hidroxil libere situate de aceeași parte (grupările hidroxil 2' și 3' din restul D-ribozei).

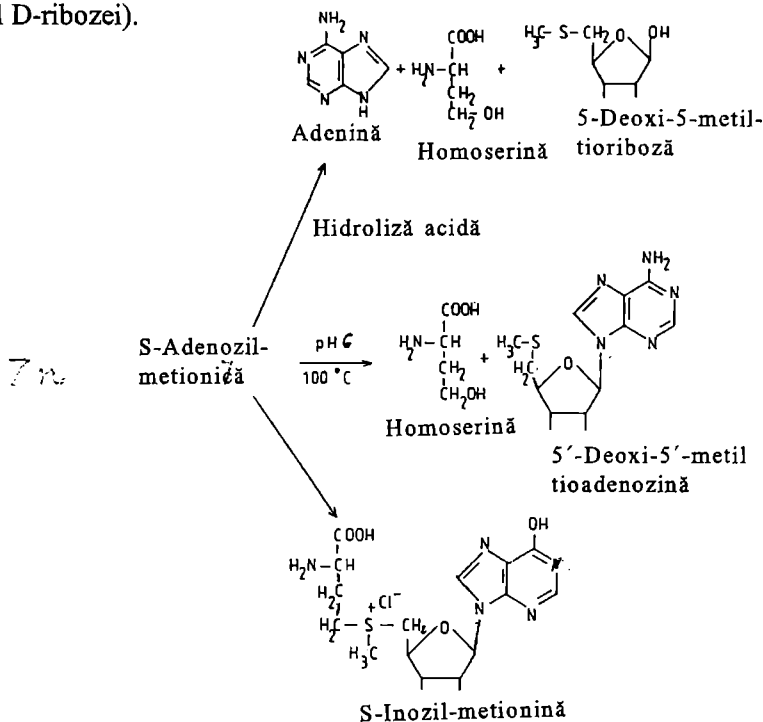
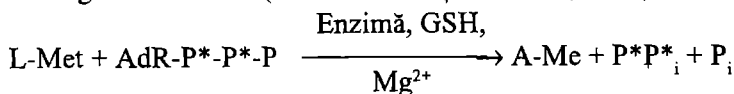


Fig. 3.8. Reacții care au dus la elucidarea structurii chimice a S-adenozil-L-metioninei.

Destinația grupărilor fosfat din ATP a fost găsită lucrând cu ATP marcat cu  $^{32}\text{P}$  în pozițiile  $\alpha$  și  $\beta$ . Rezultă, prin formarea A-Me, pirofosfat radioactiv și fosfat anorganic nemarcat (G. L. Cantoni și J. Durell, 1957):



S-Adenozil-DL metionina a fost sintetizată prin reacția dintre 5'-deoxi-5'-metiltioadenozină și hidrobromura acidului DL-2-amino-4-bromobutiric (J. Baddiley și G. A. Jamieson, 1954) (Fig. 3.9).

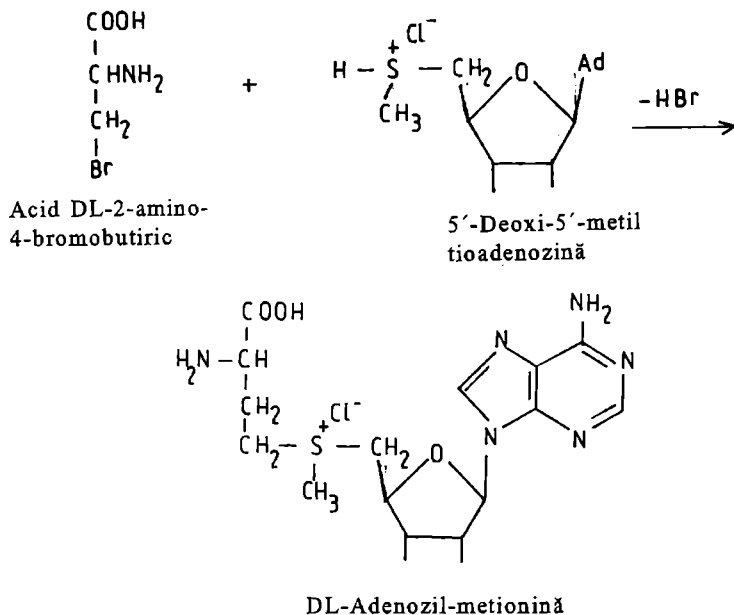
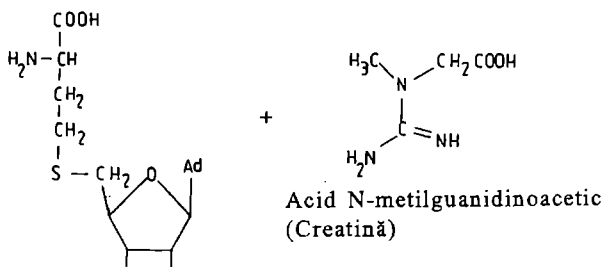
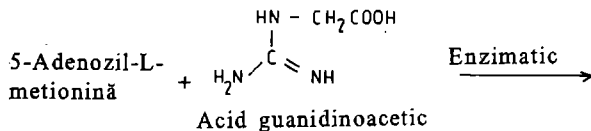


Fig. 3.9. Sinteza DL-Adenozil-metioninei.

**Proprietăți.** Spectrul UV al A-Me este identic cu al acidului adenilic. Testarea activității biologice a A-Me se realizează în prezența unui acceptor de grupări metil (G. L. Cantoni și P. J. Vignos, Jr., 1954) (de ex. acidul guanidinoacetic, v. mai jos).

Păstrată la rece și pH 4-6, adenozil-metionina este stabilă. La pH mai acid stabilitatea sa este limitată datorită labilității legăturii glicozidice între tiometilriboză și adenină. În mediu alcalin se descompune rapid la tiometiladenozină. Puritatea adenozil-metioninei poate fi evaluată cromatografic sau enzymatic cu guanidinoacetat metil transferază. (Produsul de reacție este acidul N-metil guanidinoacetic (creatina)).



### 3.12. 3'-FOSFO-ADENOZIN-5'-FOSFOSULFAT (PAPS, „sulfat activ”)

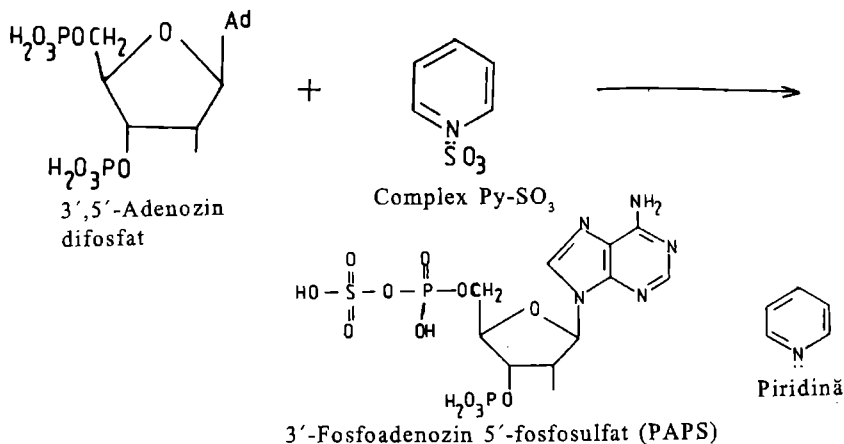
PAPS este principalul donator de grup\u0103ri sulfat \u00een celulele organismelor vii. Astfel, monogalactozil-digliceridul, digalactozil-digliceridul, galactozil-ceramidul sunt sulfatate \u00een prezen\u021ba PAPS \u015fi a enzimelor respective la galactoz\u0103 \u00een pozi\u021bia 3' (A. Knapp \u015fi colab., 1973).

PAPS a fost g\u0103sit ca produs al dou\u0103 enzime din drojdia care, printr-o ac\u021biune succesiv\u0103, sintetizeaz\u0103 acest compus. Prima este adenzin trifosfat-sulfurilaza care d\u0103 adenzin-5'-fosfosulfat \u015fi pirofosfat (din ATP \u015fi sulfat anorganic), iar a doua este adenzin-5'-fosfosulfat-3'-fosfokinaza care, utiliz\u00e2nd \u00eenc\u0103 o molecul\u0103 de ATP, d\u0103 adenzin-3'-fosfat-5'-fosfosulfat \u015fi ADP (P. W. Robbins \u015fi F. Lipmann, 1958). Aceea\u015fi autori, studiind ATP-sulfurilaza, au determinat constanta de echilibru:

$$K = \frac{[\text{APS}] \cdot [\text{PP}_i]}{[\text{ATP}] \cdot [\text{SO}_4^{2-}]} = 10^{-8}$$

ceea ce corespunde la o varia\u021bie a energiei libere standard la pH 8 de aproximativ 11 kcal/mol. Fosforilarea adenzin-5'-fosfosulfatului la PAPS are o energie liber\u0103 standard la pH 8,0 \u015fi 37\u00b0C  $\Delta F^\circ = -6$  kcal/mol. Aceast\u0103 fosforilare, \u00eempreun\u0103 cu hidroliza pirofosfatului de c\u0103tre pirofosfataz\u0103 ( $\Delta F^\circ = -5$  kcal/mol) echilibreaz\u0103 etapa endergonic\u0103 ini\u021bial\u0103. Tot atunci s-a dovedit existen\u021ba ATP sulfurilazei \u00een extracte de ficat.

S-a realizat, de asemenea, sinteza chimică a PAPS-ului prin reacția dintre 3',5'-ADP și complexul SO<sub>3</sub>-piridină (J. Baddiley și A. R. Sanderson, 1963):

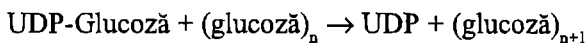


Complexul Py-SO<sub>3</sub> a fost preparat prin metoda lui Baumgarten (1926). *Proprietăți.* Dozarea PAPS s-a realizat prin măsurarea scăderii DO<sub>405</sub> datorită transferului grupării sulfat a PAPS către p-nitrofenol (P. W. Robbins și F. Lipmann, 1957).

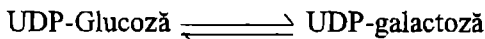
PAPS e hidrolizat ușor în mediu acid. Are un  $t_{1/2}$  în HCl 0,1 N la 37°C de 6 min. Legătura fosfosulfat este rezistentă la alcalii la temperatura camerei. Incubarea la 37°C în KOH 0,1 N timp de 1 h nu arată vreo pierdere detectabilă de sulfat transferabil, iar încălzirea la 100°C timp de 2 min nu duce la hidroliza PAPS în soluții tamponate la pH între 7 și 9.

### 3.13. URIDIN 5'-DIFOSFAT GLUCOZA (UDP-Glucoza, UDPG)

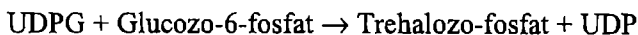
UDP-Glucoza are următoarele implicații biochimice: glicogen sintetaza catalizează reacția:



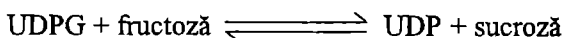
Glucozo epimeraza (galactowaldenaza) catalizează reacția:



S-a dovedit apoi că UDPG acționează ca donor glucozil în sinteza trehalozo-fosfatului la drojzii conform reacției (L. F. Leloir și E. Cabib, 1953):



Enzimele din plante catalizează reacția de formare a sucrozei:

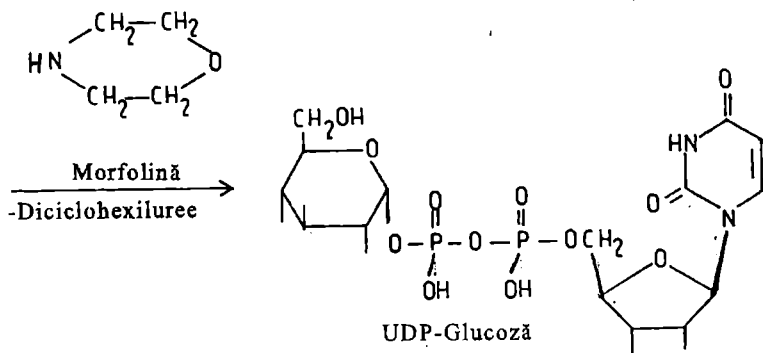


(L. F. Leloir și C. E. Cardini, 1953).

Legat de obținerea UDP-glucozei prin metode biologice s-a observat că tratarea drojdiei de bere cu toluen crește randamentul în UDPG. Astfel, amestecarea drojdiei cu o cantitate de toluen egală cu 10% din greutatea sa, urmată de incubare la 37°C timp de 40 min, duce la o creștere a cantității de UDPG cu 50-400%, dar nedepășind 2,5 micromoli de UDPG per gram de celule (L. F. Leloir și A. C. Paladini, 1957).

UDP-Glucoza a fost obținută și prin sinteză din UMP și  $\alpha$ -D-glucozo-1-fosfat (J. G. Moffat, 1961). Prin aceeași metodă au fost obținuți următorii compuși: acidul UDP-glucuronic, UDP-N-acetil glucozamina, UDP-galactoza, GDP-manoza, CDP-glicerol (S. Roseman și colab., 1961).

Principiul metodei de sinteză este următorul: reacția între uridin 5'-fosfat, morfolină și N,N'-diclohexilcarbodiimidă conduce cantitativ la uridin 5'-fosfomorfolidat, compus izolat ca sare 4-morfolin N,N'-diciclohexilcarboxamidină. Acest compus reacționează în piridină anhidră cu un exces de  $\alpha$ -glucozo-1-fosfat de trioctilamoniu dând, cu un randament de 80%, UDPG care a fost purificat prin cromatografie de schimb ionic:



**Proprietăți.** UDP-Glucoza se obține ca sare de litiu UDPG.  $\text{Li}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Eliberarea glucozei din UDPG prin hidroliză acidă este practic completă în 5-10 min la 100°C în acid 0,01 N. Viteza de hidroliză este aproximativ de șase ori mai mare decât a glucozo-1-fosfatului și de 40 de ori mai mare decât a fosfatului labil din UDPG (vezi mai jos).

Gruparea fosfat care face legătura între glucoză și UMP, în cadrul UDPG, este acido-labilă și poate fi hidrolizată în 15 min în acid 1 N la 100°C. Viteza de hidroliză este mai mică decât a fosfatului labil din ATP și cam de același ordin de mărime cu viteza de hidroliză din 3'-AMP.

UDPG își pierde activitatea catalitică după un tratament blând cu alcalii, de ex., încălzire timp de 2 min la 100°C la pH 8,5 sau timp de 30 min la 0°C

dacă este dizolvat în amoniac concentrat. Tratatamentul alcalin al UDPG conduce la formarea UMP și glucozo-1,2-monofosfatului (A. C. Paladini și L. F. Leloir, 1952).

### 3.14. URIDIN DIFOSFO-N-ACETILGALACTOZAMIN 4-SULFAT (UDP-GalNAc-4-S)

UDP-GalNAc 4-sulfatul este un substrat al arilsulfatazei B (M. Tsuji și colab., 1980); enzima se găsește în oviduct de găină, rinichi de iepure etc. În oviduct de prepeliță a fost găsită o enzimă care clivează UDP-GalNAc 6-sulfatul (Y. Nakanishi și colab., 1979); substratul a fost izolat din albuș de ou de prepeliță.

UDP-GalNAc 4-S a fost izolat mai întâi din oviduct de găină (J. L. Strominger, 1955, 1962). Compusul a fost găsit, de asemenea, în albușul de ou de găină, provenit atât din ouă fertile, cât și nefertile (J. W. Donovan și colab., 1967; Y. Nakanishi și colab., 1978), precum și din albușul de ou al altor specii de păsări. Biosinteza ( $^{35}\text{S}$ )UDP-GalNAc-4-S a fost realizată de către Suzuki și Strominger (1960) utilizând țesutul din istm de găină și sulfat radioactiv; metoda a fost confirmată de către alți autori (A. L. Fluharty și colab., 1975; M. Tsuji și colab., 1974).

Metoda de separare a celor doi izomeri de mai sus din albuș de ou constă în denaturarea termică a albușului urmat de extracție cu o soluție apoasă de etanol și cromatografie de schimb ionic.

*Proprietăți.* Atât UDP-GalNAc-4-S, cât și UDP-GalNAc-6-S au un spectru UV identic cu uracilul. Determinarea acetil amino glucidelor, a fosfatului, sulfatului, precum și spectrul UV sunt date utile pentru caracterizarea fizico-chimică a compușilor. O metodă simplă de a distinge cei doi izomeri este oxidarea lor cu metaperiodat: în cazul UDP-GalNAc-4-S se distruge numai riboza uridinei, iar în cazul UDP-GalNAc-6-S se distruge atât riboza uridinei, cât și N-acetilgalactozamina.

Prin sulfatarea UDP-GalNAc-4-S cu ( $^{35}\text{S}$ )ClSO<sub>3</sub>H rezultă UDP-GalNAc-4,6-bis-sulfat; prin expunerea ultimului la sulfataza ce acționează în poziția 4 rezultă UDP-GalNAc-6-( $^{35}\text{S}$ )-sulfat (Fig. 3.10).

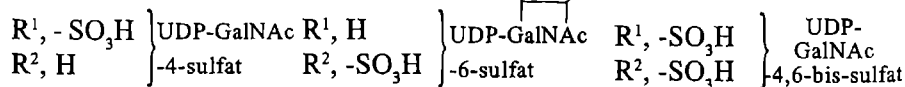
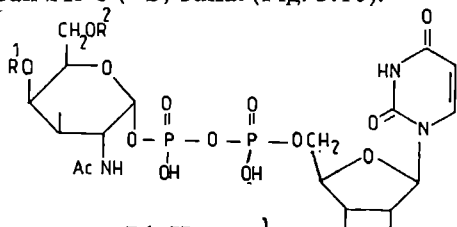
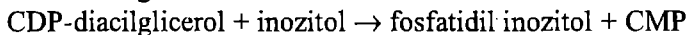
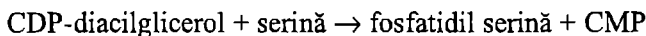


Fig. 3.10. Esteri sulfat ai UDP-GalNAc

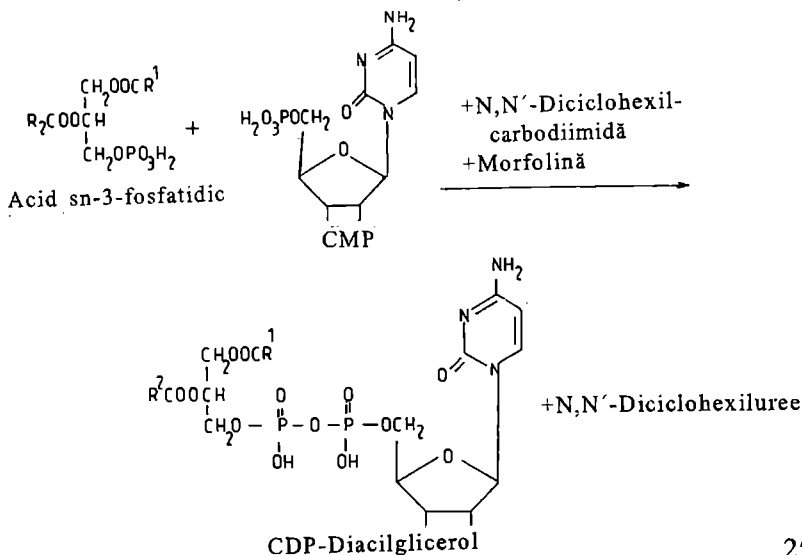
### 3.15. CITIDIN DIFOSFAT DIACIL GLICEROL (CDP-DIACIL GLICEROL)

Pe cale biochimică CDP-diacil glicerolul rezultă prin reacția dintre acidul fosfatidic și CTP. Practic, în cadrul moleculei de CDP-diacilglicerol fragmentul CMP poate fi considerat ca transportor de acid fosfatidic:



CDP-Diacil glicerolul a fost preparat cu randamente scăzute printr-o metodă enzimatică: incubând  $\text{CMP-}^3\text{H}$  cu omogenat de rinichi a fost găsit un citidin nucleotid care la hidroliză alcalină dădea CDP-glicerol (B. W. Agranoff și colab., 1958). A fost deasemenea sintetizat din acid diacil glicerol fosforic și citidin 5'-monofosfat prin reacție directă în prezența dicitlohexilcarbodiimidei (M. Paulus și E. P. Kennedy, 1960). A fost descris și un procedeu implicând fosfomorfolidatul citidinei, în absența piridinei, condensarea având loc la  $80^\circ\text{C}$  sub presiune redusă (B. W. Agranoff, 1961). Moffat și Khorana (1961) au preparat derivații 5'-fosfomorfolidat ai: adenzinei, uridinei, citidinei, guanozinei, deoxicitidinei și timidinei. Roseman și colab., (1961) au valorificat aceste rezultate sintetizând o serie de derivați nucleotidici între care și CDP-glicerol.

O variantă a ultimei metode constă în reacția dintre citidin 5'-monofosfomorfolidat și acidul diacil-glicerofosforic (acidul fosfatidic), la temperatura camerei în piridină anhidră, formând CDP-diglicerid. (Citidin 5'-monofosfomorfolidatul se prepară din acidul citidin monofosforic, ca acid liber, și morfolină în prezență de dicitlohexilcarbodiimidă; se obține citidin monofosfomorfolidatul ca sare 4-morfolidin-N, N'-dicitlohexilcarboxamidiu:

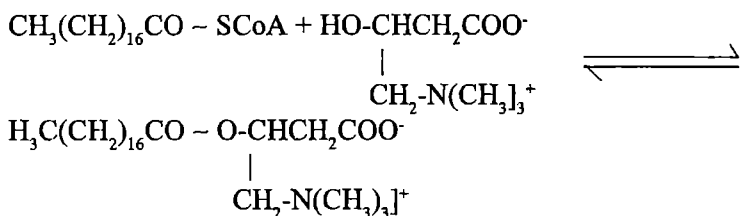


*Proprietăți.* Puritatea se evaluează prin cromatografie în strat subțire și prin măsurarea DO la 280 și 310 nm față de un standard de CMP. Grupările ester ale acizilor carboxilici se pot determina prin măsurarea acidului hidroxamic eliberat în urma hidroxilaminolizei (M. M. Rapport și N. Alonzo, 1955).

În general CDP-diacil glicerolul este solubil în solvenți lipidici la pH acid și în solvenți apoși la pH ușor alcalin. Solubilitatea depinde însă și de natura grupărilor acil: CDP-digliceridul obținut din acidul fosfatidic al lecitinei din ou este mult mai solubil în apă decât produsul similar dipalmitoil; probabil datorită prezenței acizilor nesaturați în primul.

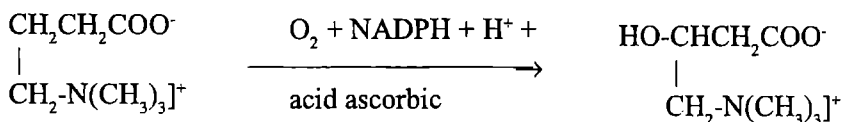
### 3.16. (-)-CARNITINA

Carnitina formează, printr-o reacție reversibilă cu acizii grași activați, un ester bogat în energie:



Acest ester, spre deosebire de compușii de tip acil-SCoA, traversează ușor membrana mitocondrială. În interiorul mitocondriei se formează din nou imediat acil-SCoA. Prin urmare carnitina este indispensabilă pentru metabolismul lipidelor și catabolismul acizilor grași în interiorul mitocondriei.

În organismele vii (-)-carnitina se formează printr-o importantă reacție de hidroxilare alifatică, la care participă oxigenul, acidul ascorbic (vitamina C) și NADPH + H<sup>+</sup>. Substratul acestei transformări este γ-butirotetaina (G. Mohn, 1974):



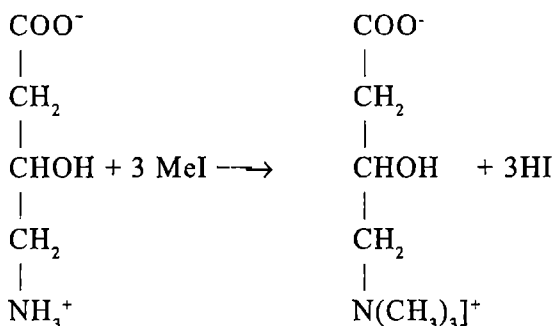
γ-Butirotetaina ia naștere din acid glutamic via acid γ-aminobutiric prin metilare.

Carnitina este prezentă în aproape toate organismele și țesuturile animale. Cea mai mare concentrație se găsește în mușchi unde constituie cam 0,1% din materialul uscat. A fost izolată în 1905 din extracte de carne; acțiunea sa biologică a început să se dezvăluie abia în 1948 când G. Fraenkel și colab., au descris un factor de creștere al viermelui făinii, *Tenebrio molitor*. Desemnat inițial ca vitamina B<sub>1</sub>, compusul activ a fost identificat în 1952 cu carnitina.



Având un atom de carbon asimetric carnitina este optic activă. S-a găsit că (-)-carnitina este forma naturală biologic activă (K. Brendel și R. Bressler, 1969).

Prima sinteză a carnitinei a fost realizată de către Tomita (1923) din acid (±)-3-hidroxi-4-aminobutiric:



S-a reușit apoi scindarea acidului (±)-3-hidroxi-4-aminobutiric în componentele optice active (M. Tomita și Y. Sendju, 1927). Un progres în separarea amestecului (±)-carnitină s-a realizat pe un precursor al acesteia, clorura (±)-carnitin nitrilului (K. Brendel și R. Bressler, 1969).

Surse naturale de carnitină l-au constituit zerul, extractul de ficat sau de mușchi bovin. Izolarea (-)-carnitinei din aceste surse presupune extracție cu alcool, partiție între fenol și apă (carnitina se distribuie în faza fenolică) și cromatografie de schimb ionic.

**Proprietăți.** (-)-Carnitin clorura este identică cu derivatul vitaminei B<sub>12</sub>, un factor de creștere a lui *Tenebrio molitor* (H. E. Carter și colab., 1952). Din produsul pur este suficientă o cantitate de 0,37 micrograme per gram de hrană. Carnitin clorura pură se prezintă ca un solid cristalin, de culoare albă, puțin higroscopic. Se sinterizează la 140°C și se topește la 142°C (E. Strack și colab., 1936); are o rotație specifică  $[\alpha]_D^{22} = -20,9^\circ$ . Au fost preparați și alți derivați ai carnitinei: cloroauratul (p.t. 153-155°C), cloroplatinatul (p.t. 214-218°C), hidroclorura esterului etilic (p.t. 146°C).

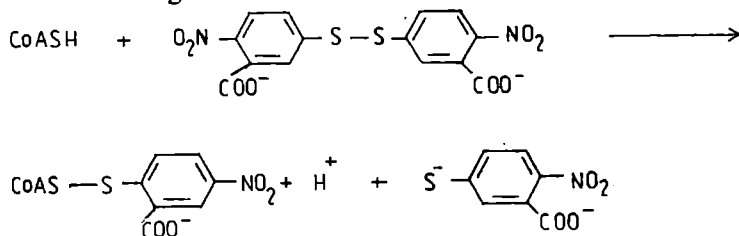
Carnitina în stare liberă este extrem de higroscopică și are p. t. 196-198°C. Rotația specifică este  $[\alpha]_D^{22} = -23,5^\circ$  (0,5% în apă).

În prepararea carnitinei din surse naturale o problemă majoră este separarea de colină și betaină. Separarea de acești compuși s-a realizat pe baza solubilității diferite a reinecților sau prin cromatografie de schimb ionic pe Amberlite sau pe Dowex. Puritatea se determină prin teste biologice sau cromatografic (S. Friedman și colab., 1960).

Prin tratare cu alcalii concentrate carnitina se descompune dând aproape cantitativ trimetilamină. În prezență de acid sulfuric concentrat carnitina dă naștere la cronobetaină.

*Derivați.* Compuși adecvați pentru prepararea acilcarnitinelor sunt percloratul și esterul benzilic. (Nu se utilizează clorura din cauza insolubilității ei în solvenții folosiți ca mediu de acilare). În cazul acilării esterului benzilic restul benzil se îndepărtează în final prin hidrogenoliză. În acest fel au fost preparate palmitoil-carnitina, pornind de la carnitin perclorat, și acetil-carnitina, pornind de la esterul benzilic.

Dozarea enzimatică a acilcarnitinelor se realizează în felul următor: după hidroliză cu KOH se neutralizează și se dozează carnitina în prezență de acetyl-CoA și acetyl-CoA: carnitin acetyl-transferază. CoA eliberată este determinată prin reacție cu acidul 5,5'-ditio-bis-(2-nitro) benzoic urmat de măsurarea fotometrică a culorii galbene rezultate:



Produsul reacției de mai sus, 5-tio-2-nitrobenzoatul, prezintă o absorbție puternică la 412 nm.

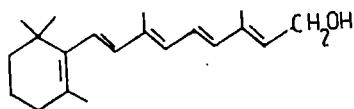
## CAPITOLUL 4

### VITAMINE LIPOSOLUBILE

Încă de la primele lucrări privitoare la vitamine s-a constatat că acestea sunt, conform solubilității lor, de două tipuri: acvosolubile și liposolubile. Vitaminelor liposolubile, A, D, E, K, F - nu li se pot atribui roluri de constituenți ai unor coenzime și nici de a media ele însele reacții biochimice. Rolul lor predominant, în fiecare caz în parte, se poate totuși corela cu o funcție biochimică. Aceste funcții biochimice sunt însă de o diversitate extrem de pronunțată ceea ce va atrage după sine probabil o nouă clasificare a vitaminelor corespunzătoare. Un exemplu în acest sens îl constituie rolul de hormon (moleculă-semnal) a vitaminelor D și a unor derivați hidroxilați ai acestora.

#### 4.1. VITAMINA A (retinol, axeroftol)

Cu mult timp înainte de a se ști ce sunt vitaminele s-au semnalat numeroase boli care erau urmarea aprovizionării insuficiente cu vitamine. Aceste deficiențe, numite și avitaminoze, au fost descrise încă din antichitate. Unul dintre simptomele cele mai cunoscute, datorat deficienței în vitamina A, este nictalopia („orbirea de noapte”). Vechii egipteni foloseau ca mijloc de vindecare al acestei boli ficat crud de bou sau de găină.



Vitamina A1 (Retinol) (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O)

O formă mai accentuată a bolii datorate deficienței în vitamina A este xeroftalmia, cunoscută deasemenea ca boală de ochi. Xeroftalmia se caracterizează în esență prin apariția de tulburări de vedere și uscarea corneii. S-a exprimat presupunerea - dovedită corectă - că nictalopia și xeroftalmia pot fi considerate ca simptome diferite ale aceleiași boli. Ambele forme se întâlnesc în cazul hranei incomplete și pot fi vindecate prin aceeași terapie și anume prin administrare de ficat de batog.

Lipsa de vitamină A poate conduce la o formă mai avansată de avitaminoză; în aceste cazuri are loc oprirea creșterii și dezvoltării. Aceste tulburări, ca de altfel și xeroftalmia, au fost reproduse experimental. Dacă se hrănesc animale tinere (de ex. șobolani) cu o hrană bogată, dar care înainte de administrare a fost supusă extracției cu alcool și eter, se observă în scurtă vreme oprirea creșterii. Hrana, având inițial valoare nutritivă completă, a fost depozitată prin extracție de cel puțin un factor indispensabil pentru dezvoltarea normală a animalelor. Că această componentă a hranei este conținută în extract neschimbată se poate dovedi ușor: adăugând din nou hranei, devenită incompletă, extractul respectiv se ajunge la o dezvoltare normală a animalelor. S-au tras în această etapă două concluzii: 1. Că factorul activ aparține, pe baza solubilității sale în alcool și eter, lipidelor. 2. Factorul activ nu poate fi preparat de către organismul respectiv și deci trebuie procurat dinafată.

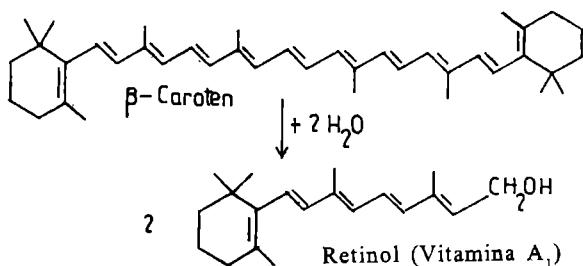
Lucrările experimentale ale altor cercetători au dovedit apoi că lipsa de vitamină A duce la o decolorare a purperei vizuale a retinei; prin aport de vitamina A purpura vizuală reappare.

S-a găsit apoi că șobolani au nevoie pentru dezvoltarea lor de doi factori accesorii diferiți. Unul dintre ei este liposolubil și a fost numit „factorul liposolubil A”. Celălalt factor este conținut în partea acvosolubilă a hranei, fiind numit „factorul acvosolubil B”. Ambii acești factori esențiali, numiți de către C. Funk vitamine, acționează în concentrații neobișnuit de mici, de aceea ei nu sunt importanți pentru aprovizionarea cu energie a organismului.

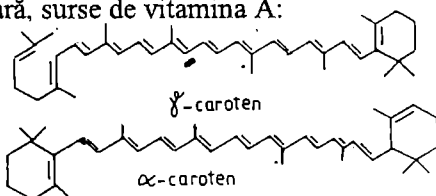
Așa-zisul factor liposolubil A s-a dovedit a fi alcătuit, după cum s-a arătat mai sus, dintr-o categorie de compuși relativ eterogeni din punct de vedere structural: vitaminele A, D, E, K, F.

Chimia vitaminei A este strâns legată de cea a lycopinei și carotenilor și de altfel elucidarea structurii vitaminei A a fost precedată scurtă vreme de elucidarea structurii carotenilor. De fapt structura celor trei tipuri de compuși este strâns legată de studiile asupra difenilpolienelor (vezi acolo).

*Carotenii - precursori ai vitaminei A.* În organismele vii  $\beta$ -carotenul se scindează enzimatic în două molecule de vitamina A:

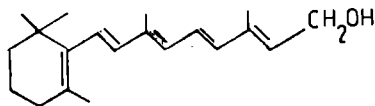


Și alți caroteni care conțin în molecula lor ciclul  $\beta$ -iononic neoxigenat constituie, într-o manieră similară, surse de vitamina A:



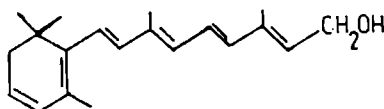
*Proprietăți.* Din șirul compușilor cu activitate de vitamină A mai importanți sunt vitamina  $A_1$  și vitamina  $A_2$ .

Vitamina  $A_1$  (retinol) are formula  $C_{20}H_{30}O$  și se numește, conform nomenclurii internaționale, 9,13-dimetil-7-(1,1,5-trimetil-5-ciclohexen-6-il)-7,9,11,13-nonatetraen-15-ol. Retinolul posedă următoarea formulă structurală:



Vitamina A1 (Retinol)

Vitamina  $A_2$  este numită 3-dehidroretinol sau pe scurt dehidroretinol, se deosebește de retinol printr-o legătură dublă suplimentară:



Vitamina A2 (3-Dehidroretinol)

Din retinol derivă aldehida corespunzătoare, retinal, care anterior a fost numită aldehida vitaminei A sau retinină. Retinalul este un izomer al dehidroretinolului.

3-Dehidroretinalul sau dehidroretinalul ia naștere prin dehidrogenarea dehidroretinolului.

Activitate biologică, dar de un spectru mai îngust, prezintă și acizii retinoici corespunzători. Câteva proprietăți ale celor trei tipuri de compuși sunt prezentate în tabelul 4.1.

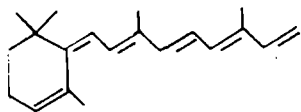
Tabelul 4.1.

Unele proprietăți fizice ale vitaminei A

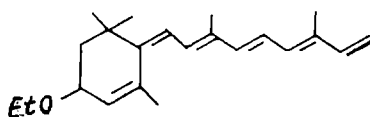
Compușul	P. t.	Absorbția în UV, în etanol	
		max(nm)	E 1% <sub>1cm</sub>
Vitamina $A_1$ (Retinol)	62-64	352	1832
Aldehida vitaminei $A_1$ , (Retinal)	61-62	381	1530
Acidul vitaminei $A_1$ , (Acid retinoic)	179-180	350	1510
Vitamina $A_2$ , (3-Dehidroretinol)	63-65	350	1455
Aldehida vitaminei $A_2$ , (3-Dehidroretinal)	78-79	401	1470
Acidul vitaminei $A_2$ (Acid 3-dehidroretinoic)	183-184	370	1395

Vitamina A<sub>1</sub> este foarte sensibilă la oxigen. În absența antioxidanților ea este instabilă. Legătura dublă suplimentară în vitamina A<sub>2</sub> îi mărește sensibilitatea la oxigen. Un preparat cristalizat de vitamina A, expus timp de o oră la oxigenul din aer și la 0°C, este distrus complet.

Vitaminele A<sub>1</sub> și A<sub>2</sub> sunt foarte sensibile față de acizi. Din retinol ia naștere prin tratare cu acid clorhidric etanolic anhidrovitamina A:



Anhidrovitamina A1



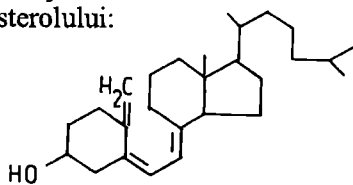
Anhidrovitamina A2

Izometria cis-trans, după cum este cunoscută la compușii etilenici, va fi deasemenea întâlnită la carotenoizi și vitamina A. Stabilitate maximă are forma total-trans. În vitamina A cele 4 legături duble conjugate din catena laterală determină izometria cis-trans, fiind posibile teoretic 16 forme izomere diferite.

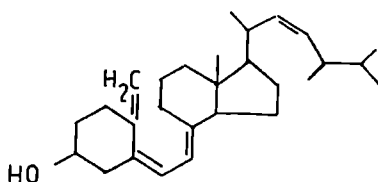
#### 4.2. VITAMINA D (Calciferoli)

Lipsa vitaminei D din hrana organismelor tinere produce o boală, rahitismul, caracterizată printr-o calcifiere insuficientă a oaselor și ca urmare acestea sunt moi și deformatate. S-a observat că prevenirea sau chiar vindecarea rahitismului este eficace prin completarea hranei cu ulei din ficat de pește (ulei din ficat de cod etc.).

Rahitismul a fost asociat deasemenea cu lipsa de expunere a bolnavilor la lumina solară; vindecarea prin iradierea bolnavilor cu lumină solară sau cu radiații UV a fost urmată în scurtă vreme de constatarea că iradierea hranei modifică valoarea nutritivă a acesteia în sensul prevenirii sau vindecării rahitismului. Pornind de la aceasta au fost supuse iradierii, separat, diferite componente ale hranei, urmată de testarea biologică a acestora. S-au găsit astfel precursorii, 7-dehidrocolesterolul și ergosterolul, precum și componentele active, vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) și vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol). De fapt vitamina D<sub>3</sub> este un izomer al 7-dehidrocolesterolului iar vitamina D<sub>2</sub> un izomer al ergosterolului:

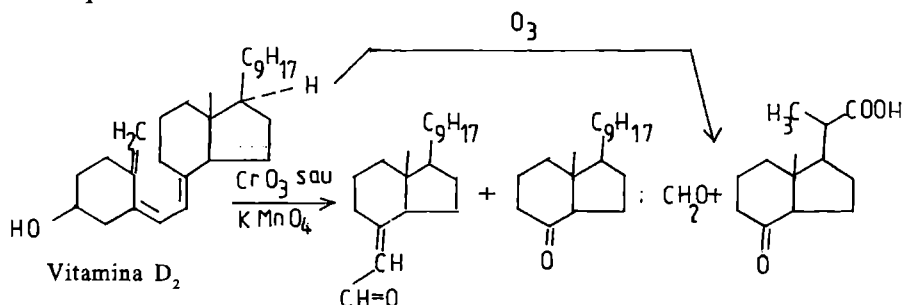


Vitamina D<sub>3</sub> (Colecalfiferol)



Vitamina D<sub>2</sub> (Ergocalciferol)

Windaus și colab., au izolat pentru prima dată vitamina D<sub>2</sub> în stare cristalizată și i-au precizat structura. Numărul de legături duble s-a determinat prin hidrogenare catalitică cantitativă. Poziția legăturilor duble s-a stabilit prin degradarea oxidativă urmată de identificarea fragmentelor rezultate în fiecare caz în parte:



Prin deschiderea ciclului B, urmată implicit de formarea unei legături duble suplimentare, maximum de absorbție se deplasează de la 282 nm la 265 nm.

Diferite vitamine D iau naștere prin fotoizomerizarea cauzată de iradierea UV a provitaminelor existente în plante sau animale sau a provitaminelor sintetice. Ca produs de iradiere primar se formează, după Velluz și colab., precalciferol și nu, după cum s-a presupus multă vreme, lumisterol. Totodată tahisterolul nu este, după cum s-a presupus anterior, o etapă intermediară pentru formarea vitaminei D; acesta se formează de asemenea abia din precalciferol. Lumisterolul și tahisterolul nu sunt prin urmare produși intermediari ci produși secundari pe calea spre vitamina D. Raportul cantitativ în care se găsesc cei patru izomeri este dependent de distribuția spectrală a luminii UV aplicate. Transformarea precalciferolului în vitamină se realizează nu pe cale fotochimică ci prin transformare termică. Schema de iradiere a lui Velluz ilustrează relațiile și prezintă clar ansamblul de reacții care sunt reversibile până la vitamina D (Fig. 4.1.).

Deosebit de aceasta se acceptă o stare de excitație colectivă în care precalciferolul, lumisterolul, tahisterolul și provitamina D pot trece una într-alta reversibil; formarea vitaminei D are loc deasemenea într-o reacție de echilibru termic din precalciferol.

Precalciferolul în soluție la 60°C este convertit în câteva ore în proporție de aproximativ 85% în vitamina D. Restul rămâne precalciferol. Dimpotrivă vitamina D în aceleași condiții se transformă 15% în precalciferol, restul rămâne vitamină D. La temperatura camerei acest echilibru se instalează în câteva zile.

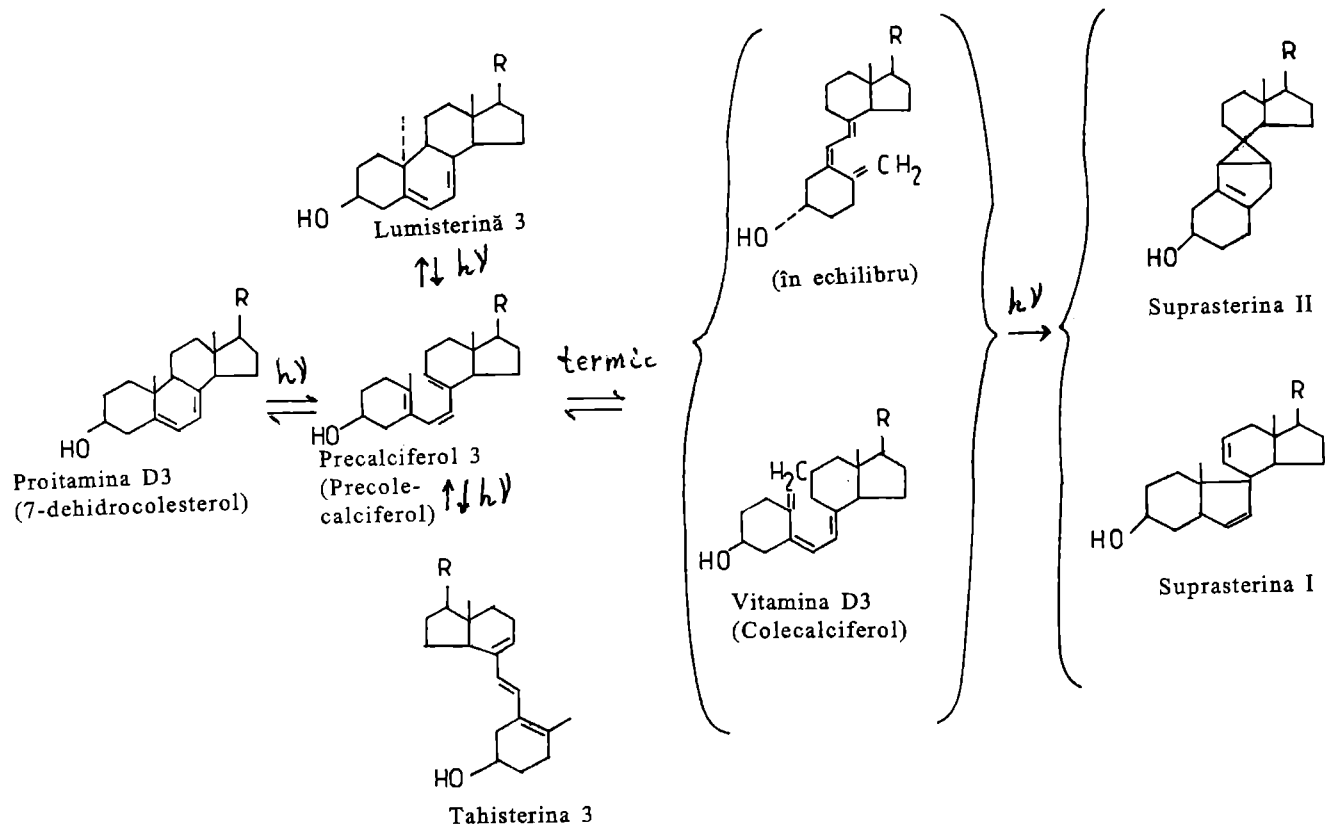


Fig. 4.1. Schema de izomerizare a vitaminei și provitaminei D.



În funcție de durata iradierii iau naștere din vitamină în proporții crescătoare suprasteroli antirahitici dar și unii biologic inactivi. Pe lângă suprasteroli au putut fi izolați toxisteroli toxici (toxisterolii A și B) și lumicalciferol, care, la fel cu suprasterolii prezintă o activitate biologică neînsemnată.

Conținutul în vitamină a unei soluții de provitamină sau dintr-un material biologic, de ex. piele, atinge rapid un maximum prin radieră UV. Apoi scade încet cu formarea concomitentă a suprasterolului - proces ireversibil. Maximul atins de vitamină D din provitamine se situează la 30-40%. Din amestecul de izomeri ergosterolul poate fi precipitat ca digitonidă iar tahisterolul poate fi separat sub formă de compus de adiție cu anhidrida acidului citraconic. Vitamina D a fost cristalizată ca ester al acidului 3,5-dinitrobenzoic și obținută în formă pură după saponificare.

Randamente maxime în vitamina D se obțin prin iradiere cu lungimi de undă în domeniul de maximă absorbție al ambelor provitamine - ergosterolul și 7-dehidrocolesterolul, adică la 282 nm; lungimi de undă inferioare, cum ar fi 265 nm dau randamente mai mici, deoarece aici prezintă absorbție maximă vitamina D și devine posibilă izomerizarea în continuare.

Provitaminele au fost obținute fie din produse naturale, în cazul ergosterolului din drojdii, sau prin sinteză, cum este cazul 7-dehidrocolesterolului sau altor provitamine.

În comparație cu obținerea vitaminei D prin activarea provitaminei, izolarea ei din surse naturale nu joacă nici un rol. La nevoie s-a obținut, din ficat de pește, un concentrat de vitamina D<sub>3</sub> care conținea și un procent ridicat de vitamina A.

*Structura chimică și activitatea biologică.* Toate vitaminele D sunt constituite dintr-un sistem trans-hidrindan metilat, la care gruparea metil de la C<sub>12</sub> stă deasupra planului, cu o catenă laterală alifatică. Acest sistem este legat de ciclul A, care posedă și o grupare hidroxil în poziția 3, printr-un sistem de legături duble conjugate cu gruparea metilen. Catenă laterală este importantă pentru intensitatea activității biologice; de exemplu Δ<sup>5,7</sup>-androstadien-3-ol și Δ<sup>5,7</sup>-androstadien-3,17-diol dau produși de iradiere inactivi. Hidrogenarea legăturilor duble din catena laterală a vitaminei D<sub>2</sub>, o altă configurație sterică (vitaminele D<sub>4</sub> și D<sub>7</sub>) sau introducerea unei grupări etil (ca în vitaminele D<sub>5</sub> și D<sub>6</sub>) scade activitatea biologică.

Decisivă pentru activitatea biologică este poziția sistemului celor două legături duble conjugate cu gruparea metilen, care se realizează prin deschiderea ciclului B. Dacă acestea sunt deplasate spre înainte în precalciferol, astfel încât în loc de gruparea metilen să rezulte o grupare metil acțiunea antirahitică este nulă. Dacă sistemul de legături duble este modificat steric, precum în tahisterol, activitatea antirahitică scade puternic. În loc de aceasta se întâlnește acțiunea

factorului de calcinoză care prin hidrogenare la dihidrotahisterol (dispariția unei legături duble) accentuează acțiunea antirahitică. Importantă este de asemenea poziția grupării OH la C-3; produsul de iradiere a epi-7-dehidrocolesterolului este de 10 ori mai puțin activ decât vitamina D<sub>3</sub>.

În organismele vii gruparea hidroxil este esterificată cu acizi grași, acid sulfuric și, probabil, fosforic; toți acești compuși sunt biologic activi.

Introducerea grupării hidroxil la C-25 și/sau C-1 mărește activitatea biologică. Astfel 25-hidroxivitamină D<sub>3</sub> este de 1,4 ori mai activă decât vitamina D<sub>3</sub> însăși iar 1,25-dihidroxivitamină D<sub>3</sub> este de 4-13 ori mai activă decât vitamina D<sub>3</sub>.

*Proprietăți.* Vitamina D<sub>2</sub> se prezintă sub formă de ace sau prisme incolore cu p. t. 121°C,  $[\alpha]_{546,1}^{20} = +62^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>),  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 490$  la  $\lambda = 265$  nm; în prezența ergosterolului nu este precipitabilă cu digitonină. Vitamina D<sub>2</sub> este sensibilă la oxigen și la acizi dar este relativ stabilă la alcalii. În vid înalt la 125°C sublimă. Este ușor solubilă în eter, benzen, cloroform, solubilă în etanol (95%), acetonă și uleiuri grase, dar insolubilă în apă.

Vitamina D<sub>3</sub> cristalizează sub formă de ace incolore, p. t. 84-85°C  $[\alpha]_{546,1}^{20} = +51,9^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>); în privința altor proprietăți vitamina D<sub>3</sub> se aseamănă cu vitamina D<sub>2</sub>.

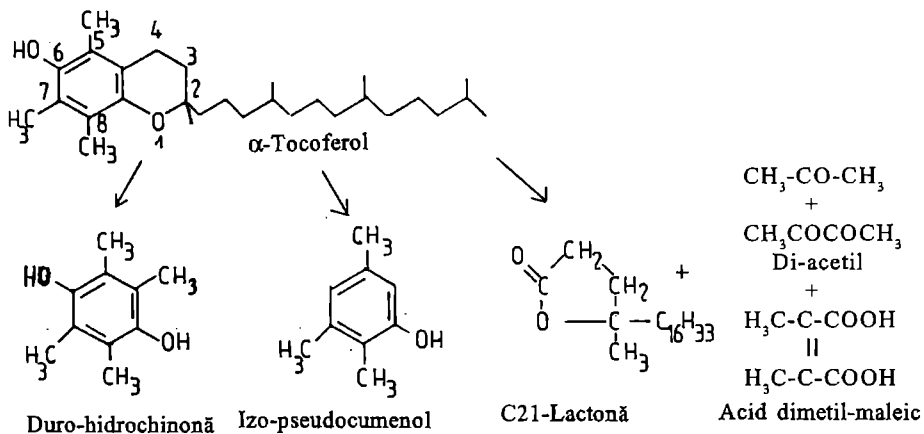
### 4.3. VITAMINA E (TOCOFEROL)

S-a constatat că în hrană există un factor a cărui lipsă provoacă perturbări ale reproducerii la animalele de laborator. Administrarea de frunze verzi sau germeni de grâu corecta deficiența respectivă. Anterior se relatase că șobolanii hrăniți cu lapte cresc încet și devin sterili; prin hrănire ulterioară cu germeni de grâu șobolanii se vindecau complet. Aceiași autori au găsit că principiul activ putea fi extras din germenii de grâu cu eter; existența acestui principiu activ a mai fost dovedită în lucernă, lăptucă, ovăz, carne proaspătă, unt etc. Noul compus liposolubil a fost numit vitamina E și recunoscut ca distinct de ceilalți doi cunoscuți anterior - vitaminele A și D. S-a stabilit apoi că mai mulți compuși hidroxilați posedă activitate de vitamină E și au fost numiți în consecință tocoferoli (gr. tokos = naștere, pherein = a purta).

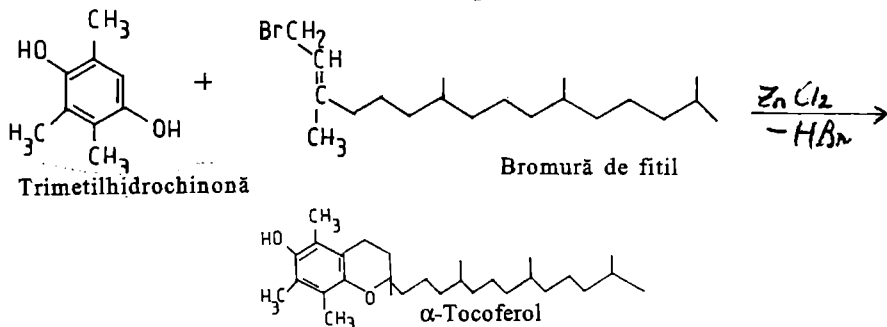
Germenii de grâu constituie o sursă extrem de bogată pentru vitamina E și de aici s-a obținut primul preparat cu activitate biologică extrem de ridicată. Pentru aceasta germenii de grâu au fost supuși extracției cu eter sau cu alt solvent organic. Uleiul respectiv a fost saponificat în atmosferă inertă cu KOH-metanolic; cam 10% din ulei rămâne nesaponificat. Partea nesaponificată a fost extrasă cu eter deperoxidat iar sterolii din acest extract au fost precipitați cu pentan. Restul de steroli au fost îndepărtați ca digitonidă. Distilarea în vid înalt,

cromatografia de adsorbție etc., au dus la obținerea de compuși cristalizabili ca esteri și îndeosebi ca esteri ai acidului alofanic,  $H_2N-CO-NH-COOH$ . (Astfel de esteri fuseseră recomandați ca ușor cristalizabili de către Windaus pentru steroli). Doi astfel de alofanați, caracterizați prin aspect și p. t., au dat după hidroliză doi compuși uleiși denumiți  $\alpha$ - și respectiv  $\beta$ -tocoferol. La testarea pe șobolani  $\alpha$ -tocoferolul prezenta o activitate mai ridicată decât  $\beta$ -tocoferolul. Ulterior a fost izolat  $\gamma$ -tocoferolul din ulei de semințe de bumbac și  $\delta$ -tocoferolul din ulei de soia.

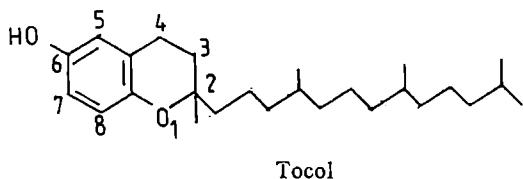
Structura tocoferolului a rezultat din următoarea schemă degradativă:



Structura de mai sus a fost confirmată prin sinteză:



Nomenclatura tocoferolilor se face pe baza structurii numite tocol:



Au fost izolați următorii tocoferoli:

$\alpha$  - Tocoferol: 5, 7, 8-Trimetiltocol

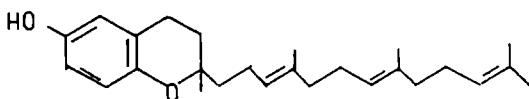
$\beta$  - Tocoferol: 5,8-Dimetiltocol

$\gamma$  - Tocoferol: 7,8-Dimetiltocol

$\delta$  - Tocoferol: 8-Metiltocol

Toți patru tocoferolii naturali, precum și unii care nu există în natură, au fost sintetizați.

Din diferite surse vegetale au mai fost izolați următorii tocoferoli, a căror nomenclatură se bazează pe tocotrienol:



Tocotrienol

$\alpha$  - Tocotrienol sau 5,7,8-Trimetiltocotrienol, denumit anterior  $\xi$ 1- și  $\xi$ 2-tocoferol

$\beta$  - Tocotrienol sau 5,8-Dimetiltocotrienol, denumit anterior  $\epsilon$  -Tocoferol

$\gamma$  - Tocotrienol sau 7,8-Dimetiltocotrienol, denumit anterior  $\eta$  - Tocoferol

$\delta$  - Tocotrienol sau 8-Metiltocotrienol

Tocoferolii cu catena laterală saturată posedă trei atomi de carbon asimetrici, prin urmare pot exista opt enantiomeri.  $\alpha$ -Tocoferolul natural este slab dextrogir și este de fapt D- $\alpha$ -tocoferol;  $[\alpha]_D^{25} = +0,75^\circ$  (în etanol). Prin utilizarea nomenclaturii Cahn-Ingold-Prelog  $\alpha$ -tocoferolul natural a fost desemnat ca (2R, 4'R, 8'R)- $\alpha$ -tocoferol.

Din fitolul natural (sau din halogenură de fitil) se obține, nu D, L- $\alpha$ -tocoferol (adică nu un recemat) ci un amestec de epimeri: (2RS, 4'R, 8'R)- $\alpha$ -tocoferol,  $[\alpha]_D^{25} = +0,38^\circ$ .

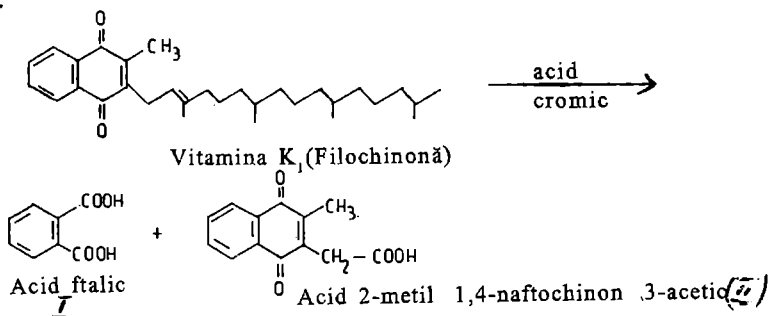
**Proprietăți.** La temperatura camerei tocoferolii se găsesc sub formă de uleiuri incolore sau de culoare galben pal, care la presiune foarte scăzută distilă fără descompunere. Sunt insolubili în apă dar se dizolvă bine în eter de petrol, cloroform, eter, benzen și grăsimi. Față de acizi la cald tocoferolii sunt stabili dar prin încălzire cu alcalii se descompun repede.

#### 4. 4. Vitamina K (Filochinone și Menachinone)

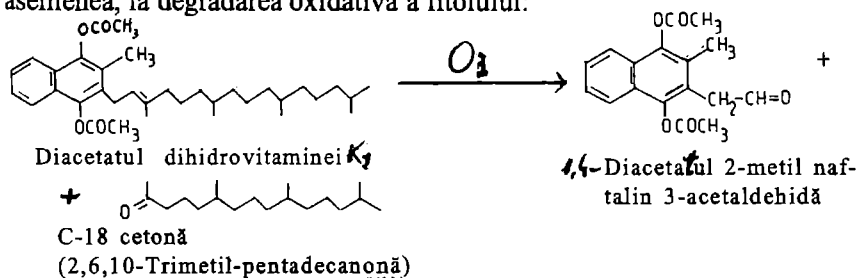
S-a izolat din fân de alfalfa, respectiv, lucernă, un concentrat cu activitate înaltă a vitaminei K liposolubile. Dar, în privința proprietăților chimice și constituției vitaminei s-a putut constata numai că activitatea este distrusă de către agenții de saponificare, de către brom și de către lumina solară. Ulterior s-a obținut și un preparat chimic pur de vitamina K. Vitamina a fost obținută dintr-un extract eteric (eter de petrol) de alfalfa și separată, sub protecție de

lumină, de clorofilă, steroli și lipide prin fracționare pe coloane de carbonat de zinc și carbonat de magneziu și apoi prin distilare moleculară. Se prezintă ca un ulei vâscos de culoare galben-deschis  $n_D^{20} = 1,5263$ ;  $[\alpha]_D^{21} = -0,71^\circ$ , care prezintă un spectru de absorbție caracteristic. În schimb, s-a reușit, prin cromatografie de adsorbție și prin cromatografie de schimb ionic să se obțină un preparat de vitamina K cristalizabil la  $-70^\circ\text{C}$ . În procesul de purificare s-a utilizat, pe lângă activitatea biologică, o reacție de culoare, precum și coeficienții de extincție din spectrul de absorbție. Spectrul de absorbție caracteristic are maxime la 243, 248, 161, 170 și 328 nm, asemănător cu fticolul ce fusese extras din bacilul tuberculozei umane și care este 2-hidroxi 3-metil 1,4-naftochinonă și care arată o slabă acțiune de vitamina K. Principiul activ din alfalfa a fost numit vitamina  $K_1$  sau filochinonă. Drept criteriu de omogenitate chimică a vitaminei  $K_1$  a servit acetilarea reductivă într-un dihidrodiacetat incolor (p. t.  $59^\circ\text{C}$ ). Structura chinoidică a vitaminei, care de altfel este sensibilă la lumină și alcalii, a fost recunoscută prin reducere cu zinc și acid acetic la hidrochinona incoloră, biologic activă. Prin expunere la aer se reobține chinona.

Dovada că noul compus este de tip 1,4-naftochinonic a apărut odată cu clarificarea constituției filochinonei. Prin degradarea oxidativă a vitaminei  $K_1$  cu acid cromic rezultă acid ftalic (I) și acid 2-metil 1,4-naftochinon 3-acetic (II):



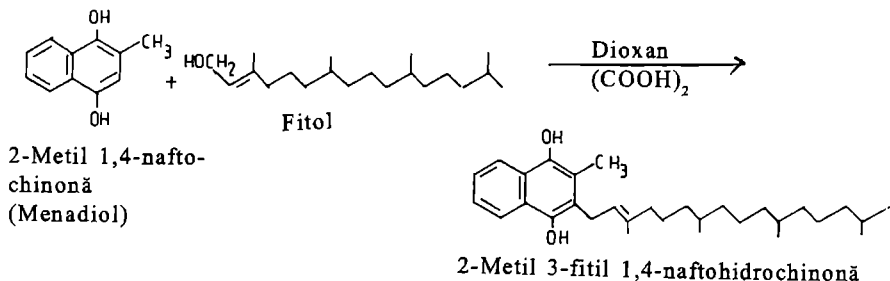
Prin ozonizarea diacetatului dihidrovitaminei  $K_1$  rezultă, pe lângă compusul ciclic III, C-18 cetona (2,6,10-trimetil-pentadecanonă)(IV), ce rezultă, de asemenea, la degradarea oxidativă a fitolului:



Prin urmare, vitamina  $K_1$  este 2-metil 3-fital 1,4-naftochinonă.

Există mai multe metode de sinteză a vitaminei  $K_1$ . Una dintre ele (Fieser) se bazează pe condensarea 2-metil 1,4-naftochinonei (menadiol) cu fitolul în dioxan în prezența acidului oxalic anhidru. 2-Metil 3-fitol 1,4-naftohidrochinona rezultată se separă datorită insolubilității sale în soluție alcalină și eter și este oxidată cu oxid de argint la chinonă.

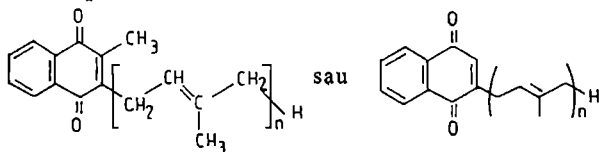
Sinteza lui Fieser a fost îmbunătățită: menadiol 1-monoacetatul (sau -benzoatul) se condensează cu un derivat fitil, prin întrebuințarea trifluorurii de bor eterate drept catalizator, la dihidro-monoesterul vitaminei  $K_1$  care este hidrolizat pentru îndepărtarea grupării ester.



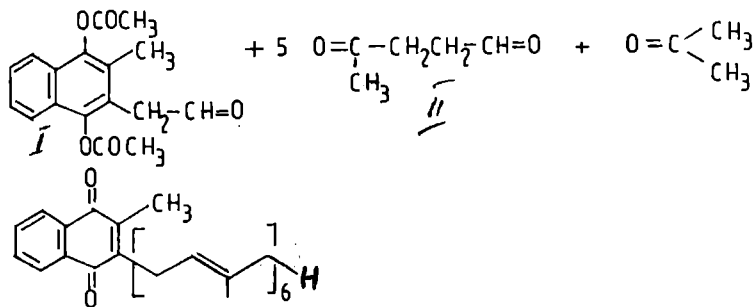
O caracteristică a vitaminei  $K_1$  este sensibilitatea la lumină. Prin iradierea cu lumină UV a unei soluții alcoolice de vitamina  $K_1$  s-au identificat apoi prin cromatografie în strat subțire o serie de produși de fotoliză.

#### 4.4.1. Vitamina $K_2$ (Menachinone)

Vitamina  $K_2$  sau menachinonele au fost denumite 2-metil 3-multiprenil 1,4-naftochinonă sau prescurtat  $MK_n$ , unde  $n$  este numărul unităților prenil. Se numește prenil compusul 3-metil 2-en 1-il:



Vitamina  $K_2$  a fost obținută din făină de pește, sub formă de cristale de culoare galben deschis cu p. t.  $54^\circ\text{C}$ . Izolarea a constat în extracție cu eter de petrol, cromatografie pe Decalso și Permutit și cristalizare la  $-50^\circ\text{C}$ . Substanța a fost denumită vitamina  $K_2$ . Clarificarea structurii s-a realizat în același mod ca la vitamina  $K_1$ . Ozonizarea hidrochinon diacetatului vitaminei  $K_2$  dă cinci moli de aldehydă levulinică (II) pentru fiecare mol de 1,4-diacetoxi 2-metil naftalin 3-acetaldehydă (I) și acetonă (III); s-a dovedit astfel că vitamina  $K_2$  are o catenă laterală nesaturată constând din șase resturi prenil cu 30 atomi de carbon, deci este 2-metil 3-difarnesil 1,4-naftochinonă.

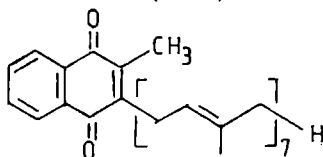


2-Metil 3-difarnesil 1,4-naftochinonă

Vitamina K2 de mai sus se numește 2-metil 3-farnesilfarnesil 1,4-naftochinonă (Vitamina K2(30)) sau după o nomenclatură mai nouă 2-metil 3-hexaprenil 1,4-naftochinonă sau pe scurt MK6.

Deoarece MK6 conține sistemul ciclic tip naftochinonă, acest compus prezintă în spectrul UV aceleași maxime și minime ca vitamina K1, dar extincția este mai mare datorită masei moleculare mai mari.

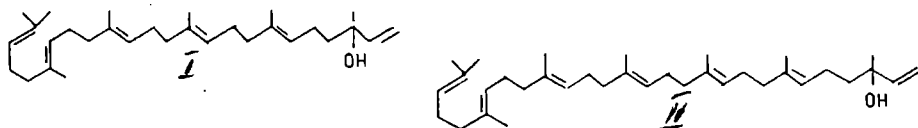
S-a izolat tot din făină de pește un compus cu p. t. 50°C care are în poziția 3 o catenă laterală nesaturată cu șapte resturi prenil (35 atomi de carbon) care are deci structura 2-metil 3-farnesil-digeranil 1,4-naftochinonă sau 2-metil 3-heptaprenil 1,4-naftochinonă (MK7):



2-Metil 3-heptaprenil 1,4-naftochinonă

Vitaminele K2, MK6 și MK7 se deosebesc foarte puțin în spectrul IR, dar se deosebesc mult în diagrama Roentgen pe pulbere.

Prin sinteza compușilor din farnesil-nerolidol (alcool nesaturat C30, I) respectiv, din farnesil-geranil-linalool (alcool nesaturat C35, II) și menadiol, cu oxidare ulterioară, structura lor ca MK6 și MK7 a fost stabilită fără echivoc.



S-au descoperit și MK9 (nouă resturi prenil cu 45 atomi de carbon) în catena laterală și MK8 (cu 40 atomi de carbon în catena laterală).

# CAPITOLUL 5

## UNITĂȚI METABOLICE

Unitățile metabolice, sau unitățile enzimatică (A. Lehninger, 1975), implică transformări bine direcționate ale compușilor chimici în celulele organismelor vii. După cum este de așteptat, natura chimică a compușilor ce parcurg o unitate metabolică, variază enorm.

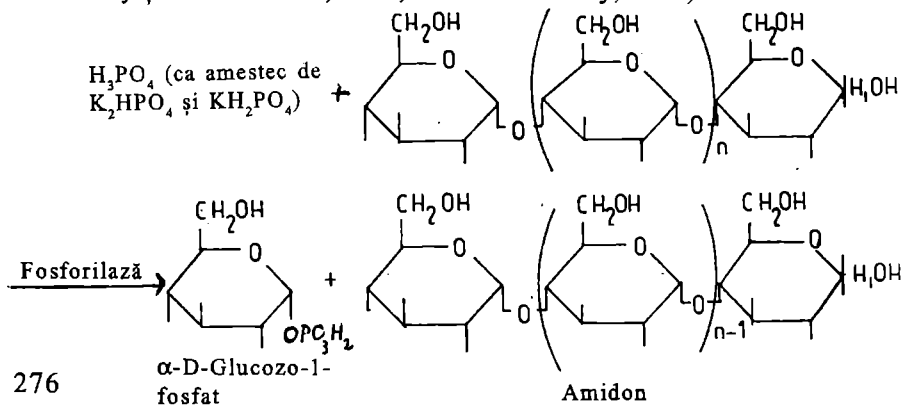
În cele ce urmează, exemplificăm compușii participanți la trei unități metabolice: glicoliza, ciclul acizilor tricarboxilici (sau ciclul Krebs) și metabolismul aminoacizilor.

### 5.1. ESTERI FOSFAT AI GLUCIDELOR ȘI METABOLIȚILOR LOR (Intermediari ai glicolizei)

O bună parte dintre intermediarii glicolizei sunt esteri fosfat ai glucidelor sau ai unor metaboliți ai acestora.

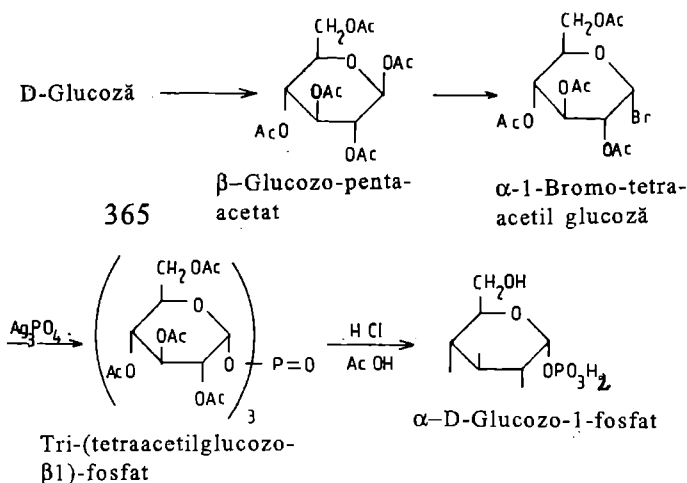
#### 5.1.1. $\alpha$ -D-Glucozo-1-fosfatul

Prin metode enzimatică  $\alpha$ -D-glucozo-1-fosfatul a fost obținut prin acțiunea fosforilazei din mușchi de iepure asupra glicogenului (C. F. Cori și colab., 1937) sau amidonului (B. Fantl și M. N. Rome, 1942), precum și prin acțiunea fosforilazei din cartofi asupra amidonului (P. Bernfeld și colab., 1944; R. M. McCready și W. Z. Hassid, 1944; R. M. McCready, 1955):





La sinteza  $\alpha$ -D-glucozo-1-fosfatului s-au utilizat rezultatele anterioare privind prepararea  $\beta$ -pentaacetilglucozei, prin reacția glucozei cu un amestec de anhidridă acetică și acetat de sodiu, și a  $\alpha$ -1-bromo-tetraacetilglucozei, prin reacția dintre  $\beta$ -pentaacetilglucoză și acid bromhidric în mediu de acid acetic (E. Fischer, 1916); secvența de reacții este următoarea (C. F. Cori și colab., 1937; M. E. Krahl și M. E. Cori, 1949):



$\alpha$ -D-Glucozo-1-fosfatul se purifică sub formă de sare de bariu, după care se reconvertește la sare de potasiu.

Prin metode similare au fost preparate maltozo-1-fosfatul și xilozo-1-fosfatul (W. R. Meagher și W. Z. Hassid, 1946), precum și  $\beta$ -glucozo-1-fosfatul (M. L. Wolfrom și colab., 1942).

**Proprietăți.** Analiza elementară indică formula  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{PO}_4\text{K}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Esterul este complet hidrolizat la D-glucoză și ortofosfat prin încălzire la  $100^\circ\text{C}$  timp de 10 min cu acid sulfuric 1 N. Produsul de hidroliză dă o osazonă care se dovedește a fi glucosazonă; glucoza poate fi identificată, de asemenea, cromatografic. Conținutul de fosfor al  $\alpha$ -D-glucozo-1-fosfatului se acordă cu valoarea teoretică, 8,33%.

În prezența fosforilazei din cartofi produsul formează un polizaharid de tip amidon care se colorează în albastru cu iodul.

Rotația specifică a sării dipotasice dihidratate a  $\alpha$ -D-glucozo-1-fosfatului este  $[\alpha]_D^{20} = +78^\circ$  (soluție 4% în apă). Acidul liber are  $[\alpha]_D^{20} = +120^\circ$  (soluție 1% în apă).  $\alpha$ -D-Glucozo-1-fosfatul este labil în mediu acid.

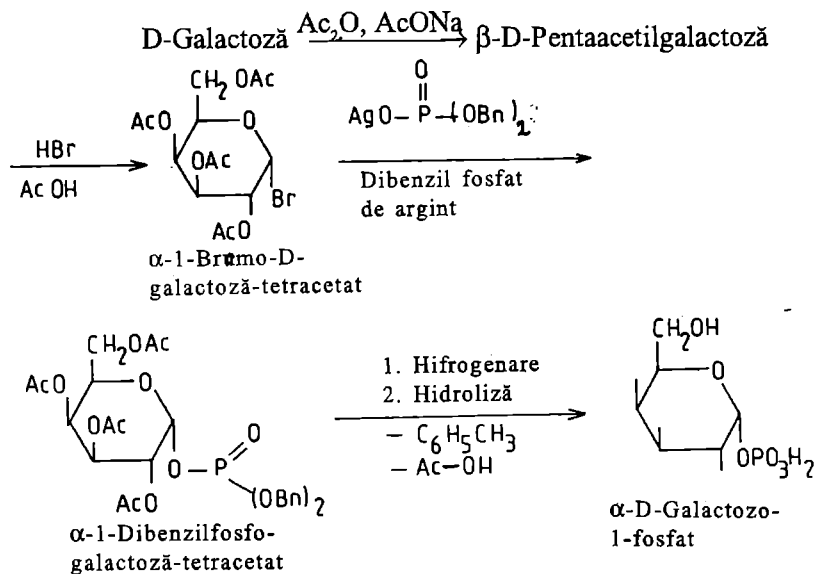
### 5.1.2. $\alpha$ -D- Galactozo-1-fosfatul

$\alpha$ -D-Galactozo-1-fosfatul a fost izolat inițial din ficatul animalelor hrănite cu galactoză (H. W. Kosterlitz, 1943). Etape esențiale în prepararea  $\alpha$ -D-galactozo-1-fosfatului prin sinteză chimică constituie obținerea derivatului

pentaacetalat al galactozei (E. Erwig și W. Koenigs, 1889), precum și a  $\alpha$ -1-bromo-tetraacetalgalactozei (H. Ohle și colab., 1929).  $\alpha$ -D-Galactozo-1-fosfatul a fost sintetizat prin utilizarea, ca agent de fosforilare, a fosfatului triplu de argint (S. P. Colowick, 1938; H. W. Kosterlitz, 1939). Ulterior  $\alpha$ -D-galactozo-1-fosfatul a fost sintetizat utilizând ca agent de fosforilare difenil-fosfat de argint (T. Posternak, 1950).

$\beta$ -D-Galactozo-1-fosfatul a fost preparat din  $\alpha$ -bromo-derivatul corespunzător, printr-o inversie Walden, prin fosforilare cu dibenzil-fosfat de argint sau fosfat de argint (mono) (F. J. Reithel, 1945).

Sinteza  $\alpha$ -D-galactozo-1-fosfatului decurge în următoarele etape (R. G. Hansen și colab., 1955):



**Proprietăți.** Purificarea  $\alpha$ -D-galactozo-1-fosfatului obținut prin sinteză se realizează prin intermediul sării de brucină, obținându-se în final ca sare dipotasică cristalizată. Esterul este nereducător cu reactivul Somogy și este ușor hidrolizat de către acidul clorhidric 1 N. Creșterea puterii reducătoare, precum și fosfatul anorganic au fost utilizate în determinarea purității. Preparate enzimatice de drojdie (R. E. Trucco și colab., 1948; R. Caputto și colab., 1949) sau bacteriene (W. J. Rutter și R. G. Hansen, 1953) transformă  $\alpha$ -D-galactozo-1-fosfatul în glucozo-6-fosfat via  $\alpha$ -glucozo-1-fosfat. Primul echilibru este 70% în favoarea glucozo-1-fosfatului, iar al doilea 94% în favoarea glucozo-6-fosfatului. Aceste echilibre favorizează conversia aproape completă a galactozo-

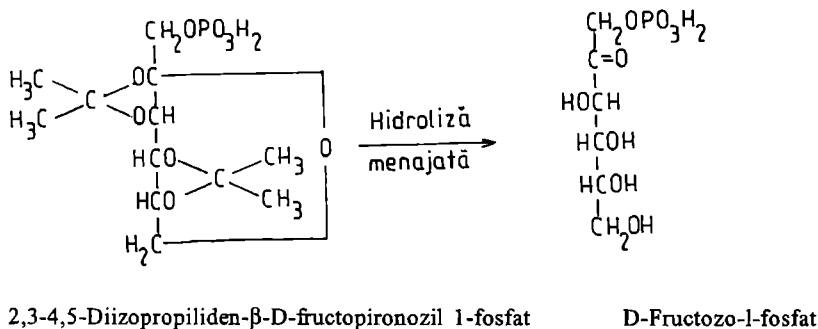
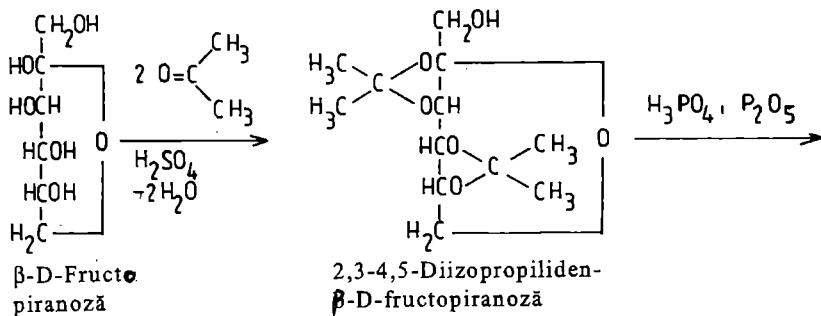
1-fosfatului la derivați ai glucozei când sunt prezente enzimele respective. Există, astfel, posibilitatea determinării purității galactozo-1-fosfatului. Rotația optică a sării de bariu este  $[\alpha]_{D}^{25} = +96^{\circ}$  (soluție 0,5% în apă), calculată pe baza fosfatului labil. Pentru sarea de potasiu a  $\alpha$ -D-galactozo-1-fosfatului s-a găsit o rotație optică  $[\alpha]_{D}^{32} = +100^{\circ}$  ( $c = 1,57$  în apă).

Rotația optică a  $\beta$ -D-galactozo-1-fosfatului (sare de bariu) are valoarea  $[\alpha]_{D}^{30} = +34^{\circ}$ .

### 5.1.3. D-FRUCTOZO-1-FOSFATUL

Fosfatiza din măduvă osoasă hidrolizează fructozo-1,6-difosfatul la fructozo-1-fosfat (B. Tanko și R. Robison, 1935). Pe de altă parte, s-a dovedit că o fracție proteică din ficat fosforilează fructoza, în prezența ATP și  $Mg^{2+}$ , la fructozo-1-fosfat (F. Leuthardt și E. Testa, 1951).

Prin metode chimice fructozo-1-fosfatul a fost preparat prin fosforilarea 2,3-4,5-diizopropiliden-D-fructopiranozei cu oxiclorigă de fosfor (A. L. Raymond și P. A. Levene, 1929) sau prin hidrogenarea catalitică a derivatului difenil fosforil al 2,3-4,5-diizopropiliden-D-fructopiranozei (F. Leuthardt și E. Testa, 1951; W. Byrne și H. A. Lardy, 1957):

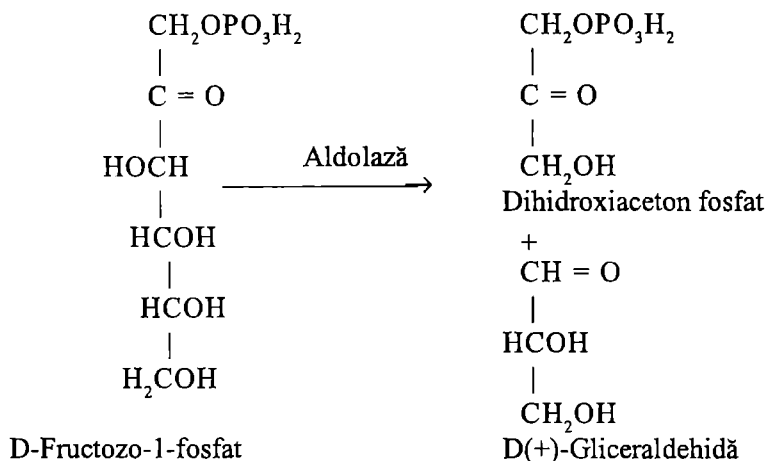


În ambele cazuri derivatul diizopropiliden al fructozei a fost preparat prin reacția dintre fructoză și acetonă în prezență de acid sulfuric (E. Pacsu și colab., 1939).

*Proprietăți.* Sarea de bariu corespunde, la analiza elementară, formulei  $C_6H_{11}O_9PBa$ . Rotația optică specifică este  $[\alpha]_D^{26} = -30,4^\circ$  ( $c = 4,3\%$ ). Hidroliza în acid clorhidric N la  $99^\circ C$  urmează o cinetică de ordinul I cu o constantă  $k = 2,58 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ . Aceasta corespunde la o legătură fosfat relativ labilă: în 5 min hidroliza este în proporție de 53%, în 15 min 91% și 100% în 30 min.

Fructozo-1,6-difosfataza hidrolizează fructozo-1-fosfatul cu o viteză de 0,9% din aceea a fructozo-1,6-difosfatului.

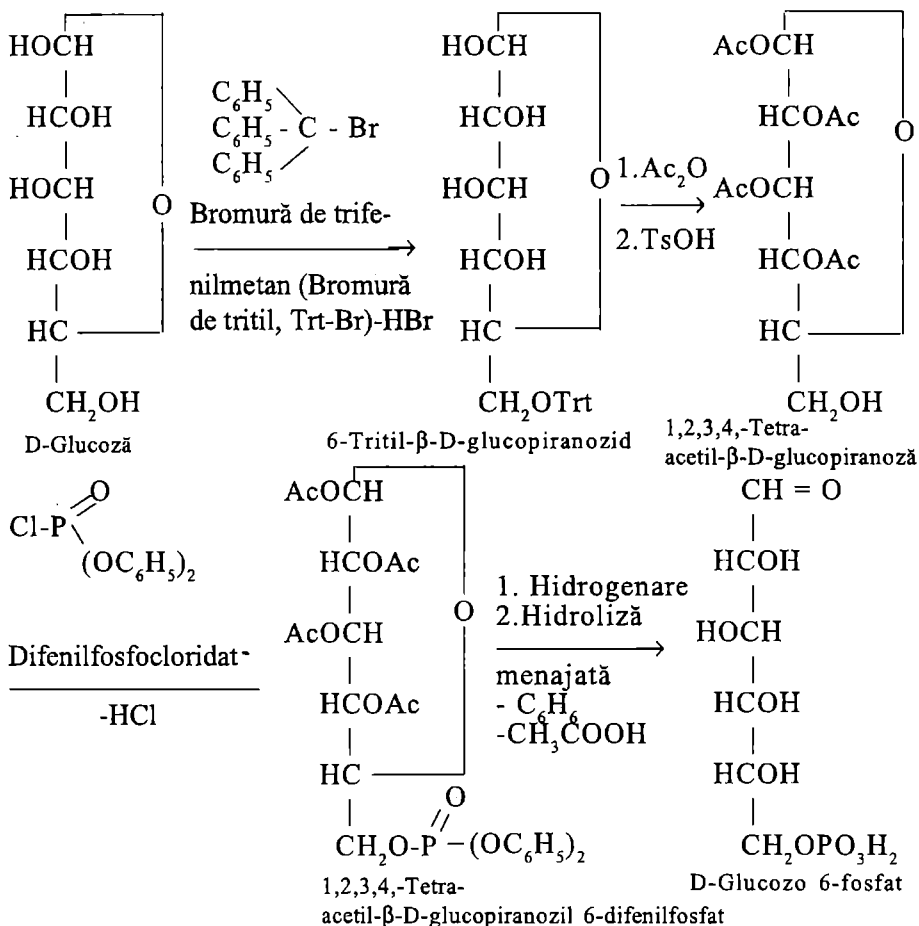
Fructozo 1-fosfatul este clivat de către aldolazele din ficat sau mușchi la dihidroxiaceton fosfat și D-gliceraldehidă:



#### 5.1.4. D-GLUCOZO 6-FOSFATUL

Fermentarea glucozei de către drojdii produce un amestec de hexozomonofosfați (ai glucozei, fructozei, manozei) din care acești esteri au putut fi separați ca săruri de bariu sau calciu. Glucozo 6-fosfatul pur a fost obținut din acest amestec ca sare a brucinei (R. Robison și W. T. J. Morgan, 1930; R. Robison și E. J. King, 1931; R. Robison, 1932). A fost preparat deasemenea prin acțiunea fosfoglucomutazei asupra D-glucozo-1-fosfatului (S. P. Colowick și E. W. Sutherland, 1942). Concomitent au fost elaborate două metode de sinteză chimică a D-glucozo 6-fosfatului. Prima a constat în tratarea monoaceton glucozei în piridină cu oxiclurură de fosfor la temperaturi joase: rezultă o sare de bariu a hexozomonofosfatului care, în vederea purificării, a fost convertită la sare de brucină și recristalizată din metanol. Sarea pură a

brucinei a fost reconvertită la sare de bariu, o formă stabilă a D-glucozo 6-fosfatului (P. A. Levene și A. L. Raymond, 1931). A doua metodă de sinteză a D-glucozo 6-fosfatului a pornit de la 1,2,3,4-tetraacetil- $\beta$ -D-glucopiranoză (p.t. 128-129°C,  $[\alpha]_D^{20} = +12,1^\circ$ ) (P. A. Levene și A. L. Raymond, 1931; H. A. Hardy și H. O. L. Fischer, 1946); fosforilarea s-a realizat cu difenilfosfocloridat:



În ambele cazuri derivatul tetraacetil a fost preparat din 6-trifenilmetil-tetraacetil- $\beta$ -D-glucoză (B. Helferich și colab., 1925; B. Helferich și W. Klein, 1926). (Radicalul trifenilmetil se mai numește tritol).

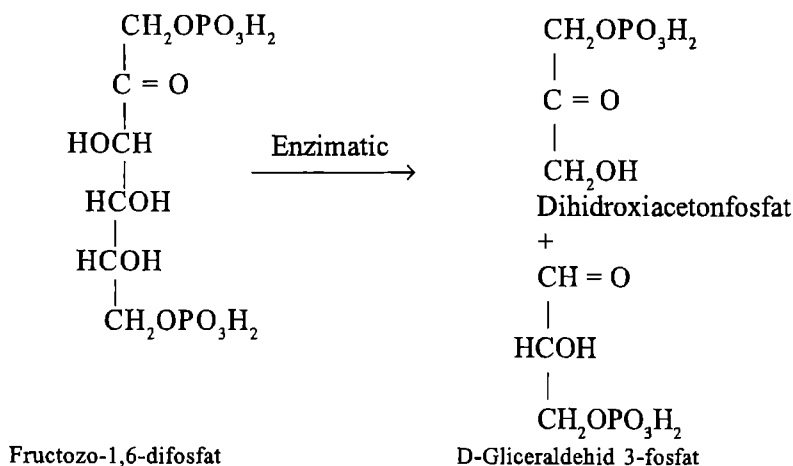
Dintr-un mediu de reacție al glucozei cu acidul tetrafosforic a fost izolat, după hidroliză parțială cu acid bromhidric și trecerea pe o coloană de Amberlite IR-100 (forma H<sup>+</sup>), acidul glucozo 6-fosforic (J. E. Seegmiller și B. L. Horecker, 1951).

*Proprietăți.* Sarea de potasiu a D-glucozo 6-fosfatului este higroscopică și de aceea este mai puțin adecvată pentru păstrare decât cea de bariu. Puritatea glucozo 6-fosfatului se poate determina prin analiză elementară, rotație optică, putere reducătoare sau enzimatic (A. Kornberg, 1950; H. Z. Sable, 1952). Rotația optică și determinarea cantitativă a fosforului sunt criteriile de puritate cele mai accesibile. Sarea de potasiu are  $[\alpha]_D^{24} = +21,2^\circ$  (1,3% în apă). Glucozo-6-fosfatul, spre deosebire de esterul din poziția 1 este relativ stabil la hidroliză acidă. În acid clorhidric 1 N la 100°C se hidrolizează numai 12% în 4 h și 45% în 20 h.

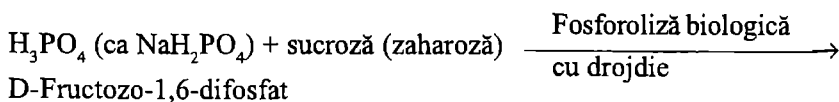
Un preparat de fosfohexozoizomerază (lipsit de activitate fosfoglucomutazică) din mușchi de șobolan convertește glucozo-6-fosfatul în proporție de 32% în fructozo-6-fosfat (la 25°C). În același timp fructozo-6-fosfatul este convertit la un amestec de echilibru care conține 68,4% glucozo-6-fosfat și 31,6% fructozo-6-fosfat. Glucozo-6-fosfatul este transformat reversibil în glucozo-1-fosfat de către fosfoglucomutază. Amestecul la echilibru conține numai 5% glucozo-1-fosfat. O metodă sensibilă și foarte specifică pentru determinarea glucozo-6-fosfatului este reducerea NADP-ului în prezența glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (A. Kornberg, 1950).

### 5.1.5. D-GLICERALDEHID 3-FOSFATUL

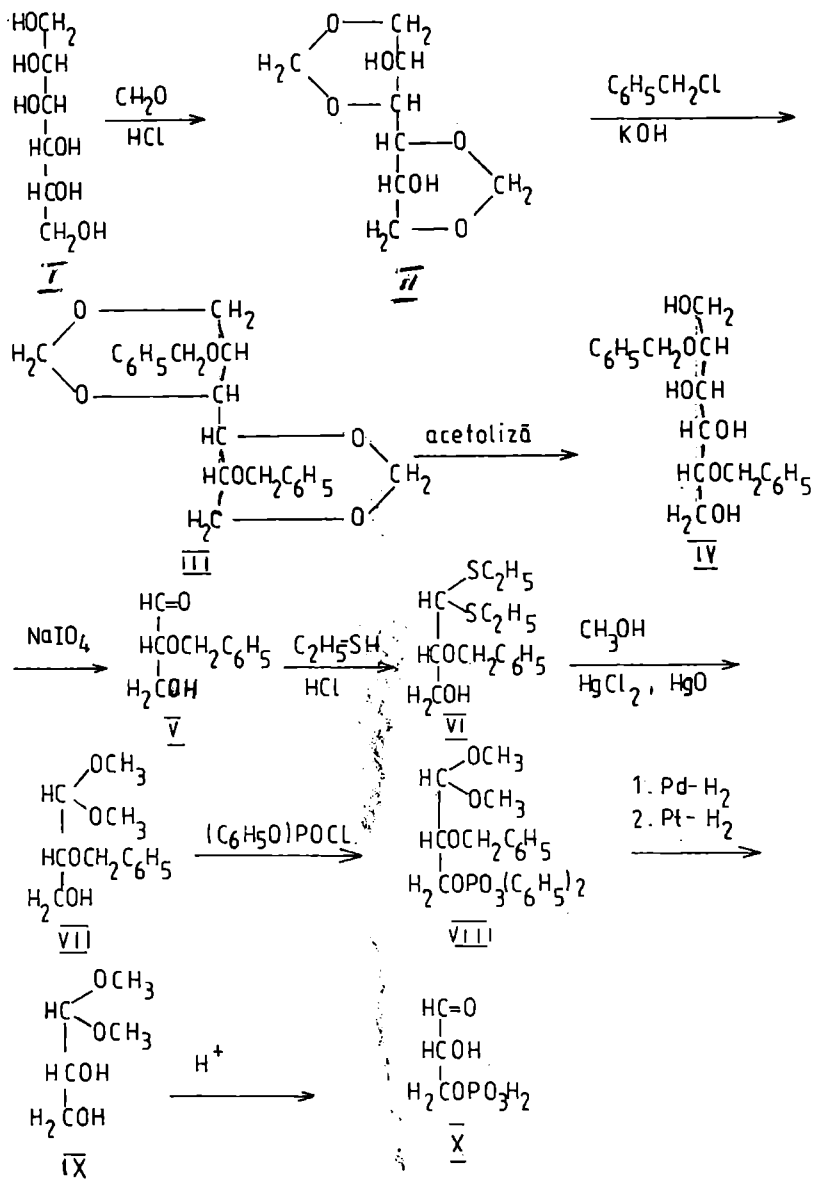
D-Glicerinaldehid 3-fosfatul a fost preparat enzimatic din fructozo-1,6-difosfat (O. Meyerhof și R. Junowick-Kocholaty, 1943):



D-Fructozo-1,6-difosfatul a fost preparat prin următoarea metodă:



A fost realizată deasemenea o sinteză chimică a D-glicerinaldehid 3-fosfatului (C. E. Ballou și H. O. L. Fischer, 1955):



unde:

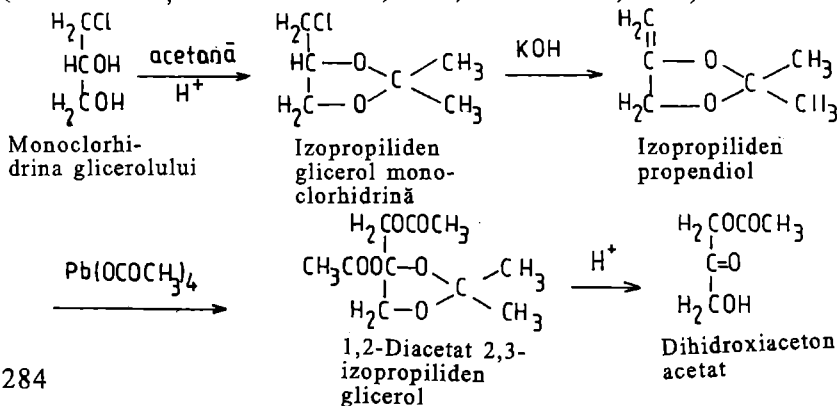
- I este D-manitol
- II, 1,3-4,6-di-O-metilen D-manitol
- III, 2,5-di-O-benzil 1,3-4,6-di-O-metilen D-manitol
- IV, 2,5-di-O-benzil D-manitol
- V, 2-O-benzil D-gliceraldehidă
- VI, 2-O-benzil D-gliceraldehid dietil mercaptol
- VII, 2-O-benzil D-gliceraldehid dimetil acetal
- VIII, 2-O-benzil 3-difenilfosforil D-gliceraldehid dimetil acetal
- IX, 3-fosforil D-gliceraldehid dimetil acetal
- X, D-gliceraldehid 3-fosfat

*Proprietăți.* D-Gliceraldehid 3-fosfatul posedă proprietățile chimice ale esterului fosforic a unei hidroxialdehide. Compusul este implicat în biosinteza acidului 1,3-difosfoglicerol (vezi acolo).

### 5.1.6. DIHIDROXIACETON FOSFATUL

Dihidroxiaceton fosfatul a fost obținut mai întâi prin sinteză, prin reacția dintre dihidroxiacetonă și oxiclорură de fosfor în chinolină. Studiul cinetic al hidrolizei dihidroxiaceton fosfatului în acid clorhidric 1 N la 100°C a arătat că hidroliza era completă în 40 min (W. Kiessling, 1934). Formarea triozofosfaților în reacții biochimice a fost observată astfel: amestecarea hexozodifosfatului cu extract de mușchi (sau de drojzii) lipsit de coenzime ducea la apariția unui triozofosfat hidrolizabil în mediu alcalin. Acest compus, spre deosebire de D-gliceraldehid 3-fosfat, nu era oxidat de către iod sau brom dovedindu-se identic cu dihidroxiaceton fosfatul sintetizat de către Kiessling; izolarea și caracterizarea dihidroxiaceton fosfatului natural ca sare de bariu sau calciu a confirmat această presupunere. Totodată hexozodifosfatul a fost obținut atât din dihidroxiaceton fosfat natural cât și sintetic (O. Meyerhof și K. Lohmann, 1934).

A fost elaborată și o altă metodă de sinteză a dihidroxiaceton fosfatului (C. E. Ballou și H. O. L. Fischer, 1955; C. E. Ballou, 1960):

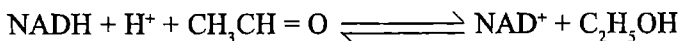
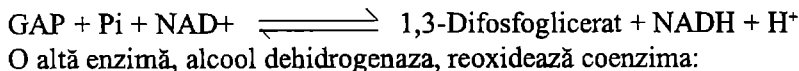




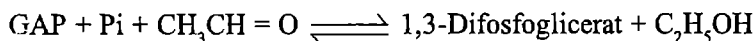


1,3-Difosfogliceratul a fost izolat din mediul de reacție ca sare cristalină a stricninei (E. Negelein și H. Brömel, 1939).

Rezultatele de mai sus au constituit o metodă de preparare a 1,3-difosfogliceratului (E. Negelein, 1957). Principiul este următorul: gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza catalizează următoarea reacție reversibilă:



Însumând cele două reacții obținem:



(Prin urmare NAD-ul este catalizator). Condițiile de reacție se aleg în așa fel încât echilibrul este aproape complet deplasat spre dreapta iar 1,3-difosfogliceratul este izolat ca sare cristalină, greu solubilă, de stricnină. Este esențial ca ambele preparate enzimatică să fie pure. Impuritățile proteice ar putea avea activitate fosfatazică (să hidrolizeze 1,3-difosfogliceratul pe măsură ce se formează) și/sau activitate triozofosfat izomerazică (să transforme GAP în dihidroxiacetone fosfat). Dacă se utilizează GAP de sinteză (H. O. L. Fischer și E. Baer, 1932; C. E. Ballou și H. O. L. Fischer, 1955) numai izomerul D este utilizat de către enzimă. Atât gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (O. Warburg și W. Christian, 1939) cât și alcool dehidrogenaza (E. Negelein și H. J. Wulff) pot fi izolate din drojdii. La sfârșitul reacției enzimele sunt denaturate cu acetonă iar 1,3-difosfogliceratul este izolat ca sare a stricninei.

*Proprietăți.* Determinarea cantitativă a 1,3-difosfogliceratului se realizează spectrofotometric (O. Warburg și W. Christian, 1939). Sarea recristalizată a stricninei, uscată în vid la 60°C, are formula elementară  $\text{C}_{87}\text{H}_{96}\text{N}_8\text{P}_2\text{O}_{18}$  (sare de tetrastricnină), care a fost confirmată prin analiza chimică.

La estimarea colorimetrică a fosforului după metoda lui Briggs modificată de Martland și Robison, fosforul labil este scindat și măsurat ca fosfat anorganic.

1,3-Difosfogliceratul se descompune spontan transformându-se în 3-fosfoglicerat și fosfat anorganic. Acest proces are loc cu atâta ușurință încât nu se cunoaște nici o stare în care compusul să rămână neschimbat un timp apreciabil. În soluție apoasă hidroliza urmează ecuația:  $-dc/dt = k \cdot c$ . La temperatura de 38°C și pH 7,2  $k = 0,026 \text{ min}^{-1}$ . Prin urmare se va hidroliza, 2,6% într-un minut sau 50% în 27 min. Viteza de hidroliză este mai mică la pH între 7 și 9; la 0°C 1,3-difosfogliceratul se descompune în proporție de 6% în 24 h. Produsul este mai stabil când este congelat în soluție slab alcalină; pierderea

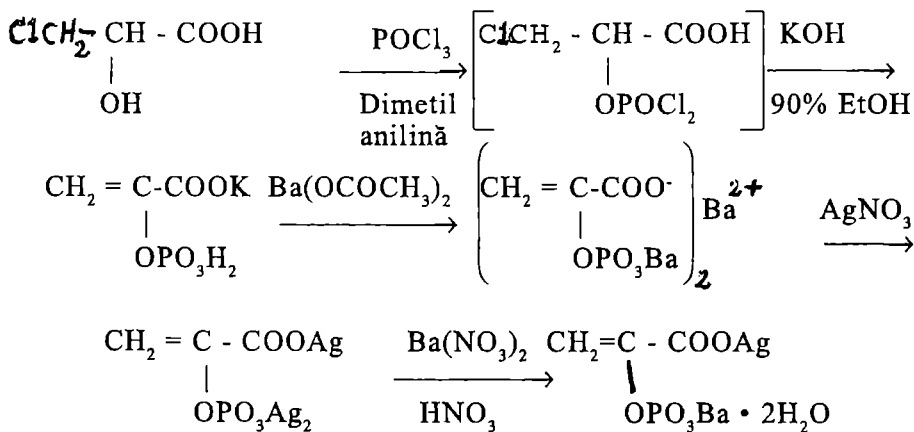
în 24 ore este de numai 3%. Uscând o soluție neutră de 1,3-difosfoglicerat în exicator se pierde 77%, în timp ce preparatul uscat obținut prin precipitare cu acetonă la pH 2,1 pierde numai 19% timp de 24 h în exicator. Sarea cristalizată a stricininei, precum și sarea de calciu sunt deasemenea instabile în stare uscată.

O soluție neutră de 1,3-difosfoglicerat rotește foarte puțin lumina polarizată. 3-Fosfogliceratul ce rezultă prin descompunerea spontană a 1,3-difosfogliceratului are  $[\alpha]_D^{20} = -675^\circ$  în soluție 8,3% de molibdat de amoniu; în aceleași condiții 3-fosfogliceratul are  $[\alpha]_D^{20} = -682^\circ$ .

În soluție apoasă neutră 1,3-difosfogliceratul are o bandă de absorbție caracteristică la 215 nm care dispare la descompunerea compusului. Coeficientul molar de extincție este  $\epsilon = 2,11 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

### 5.1.8. FOSFOENOLPIRUVATUL

S-a constatat că fosfoenolpiruvatul este un intermediar al scindării enzimactice a glucidelor cu extract muscular. Compusul a fost descoperit ca sare cristalizată de bariu și argint ( $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_6\text{PBaAg}$ ; K. Lohmann și O. Meyerhof, 1934). Sarea de bariu și argint a acidului fosfoenolpiruvic este compusul cel mai adecvat pentru izolarea acestui compus din materiale biologice precum și din amestecuri de sinteză. Prima sinteză a fosfoenolpiruvatului a fost realizată prin fosforilarea acidului piruvic cu oxiclорură de fosfor în chinolină (W. Kiessling, 1936); ulterior metoda a fost îmbunătățită (G. Schmidt și S. J. Thannhauser, 1943; P. Ohlmeyer, 1951). A fost imaginată și o sinteză pornind de la acid  $\beta$ -clorolactic (E. Baer și H. O. L. Fischer, 1949; E. Baer, 1952):



Sarea de bariu și argint a fosfoenolpiruvatului

*Proprietăți.* Sarea de bariu și argint a acidului fosfoenolpiruvic dă la analiza elementară procentele calculate pentru formula  $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_6\text{PBaAg} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . La

temperatura de 78°C în vid înalt pe pentoxid de fosfor compusul pierde o moleculă de apă.

Testul cu hipoidit este util pentru determinarea fosfopiruvatului în diferite etape ale procedurii de sinteză sau izolare: soluția apoasă de fosfoenolpiruvat diluată corespunzător se amestecă cu iod și hidroxid de sodiu. După un timp amestecul se acidificază cu acid clorhidric și se dozează fosfatul anorganic. Hidroliza instantanee și cantitativă a fosfatului din fosfoenolpiruvat în prezența sărurilor mercurice poate servi deasemenea ca metodă analitică.

Cinetica hidrolizei în acid clorhidric N la 100°C a arătat că clivarea este completă în 60 min iar după hidroliză reacția cu dinitrofenil-hidrazina este pozitivă. La hidrogenarea fosfoenolpiruvatului se absoarbe un mol hidrogen per mol de compus și rezultă acidul lactofosforic, greu hidrolizabil: în 4 h la 125°C în acid clorhidric 2 N se hidrolizează 81%; prin hidroliza produsului hidrogenat rezultă acid lactic.

O purificare rapidă și eficientă a fosfoenolpiruvatului s-a realizat prin cromatografie de schimb ionic (M. F. Utter și K. Kurahashi, 1954).

## 5.2. CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI (CICLUL KREBS)

Prin intermediul ciclului acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs) unitățile acetil ale acetil-CoA, rezultate la catabolismul AG, glucidelor și unor amino-acizi, sunt oxidate la CO<sub>2</sub> și H<sub>2</sub>O. De aceea ciclul acizilor tricarboxilici ocupă o poziție centrală în cadrul metabolismului majorității organismelor aerobe.

### 5.2.1. ACIDUL IZOCITRIC

Acidul treo-D<sub>3</sub>-izocitric sau acidul α-hidroxitricarbalilic a fost obținut inițial prin sinteză, prin descompunerea acidului triclorometil paraconic cu barită (R. Fittig, 1889). Ulterior a fost descoperit în sucul de mure unde există în proporție de 5/6 ca lactonă (E. K. Nelson, 1925; W. F. Bruce, 1935). S-a stabilit apoi că acidul izocitric este un intermediar al metabolismului acidului citric; totodată s-a elaborat o metodă polarimetrică pentru determinarea acestuia (C. Martius, 1938). Ulterior metoda de dozare polarimetrică a fost înlocuită cu o metodă mai rapidă, mai sensibilă și mai specifică, metoda care utilizează izocitrat dehidrogenaza (S. Ochoa, 1948).

Acidul treo-D<sub>3</sub>-izocitric există la o concentrație de 10-15% din substanța uscată a frunzelor de *Bryophyllum calycinum* împreună cu o proporție și mai mare de acid malic. Acidul citric este deasemenea prezent în cantități apreciabile, în proporții mai mici existând și acizii oxalic, succinic, precum și alți acizi

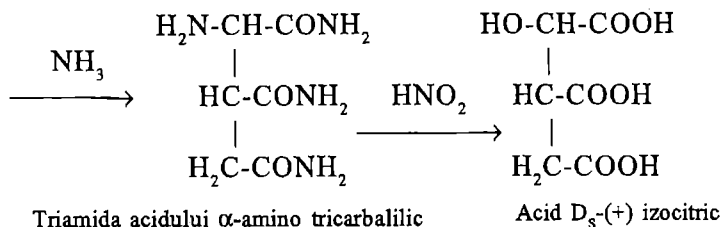
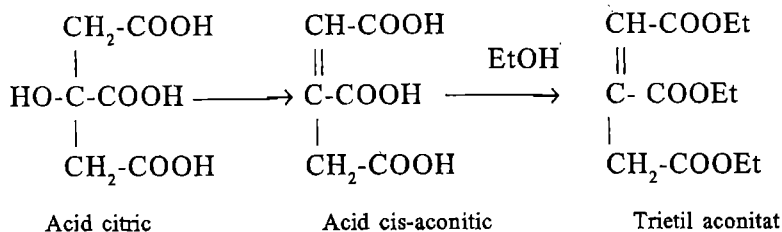
organici. La fel cu majoritatea plantelor din familia Crassulaceae, frunzele acestei specii suferă o variație diurnă pronunțată în ceea ce privește aciditatea. Dimineața acizii organici pot totaliza 40% din substanța organică totală. În cursul unei zile însorite cantitatea de acizi se diminuează rapid, locul lor fiind luat de către amidon, încât în mijlocul după-amiezii acizii organici totalizează numai 25% din substanța uscată. În mare parte această fluctuație este datorată schimbării cantitative a acidului malic, acidul citric jucând un rol similar dar de mai mică anvergură. Cu toate acestea acidul izocitric nu ia parte la această variație, cantitatea prezentă rămânând constantă cu condiția ca schimbările de lumină să urmeze alternanța naturală lumină-întuneric. Deci este recomandabil ca frunzele să fie colectate în după-amiaza unei zile însorite, pentru separarea acidului izocitric, când proporția celorlalți acizi este minimă.

Acizii organici se extrag din pudră uscată de frunze, cu etanol diluat acidifiat, se precipită ca săruri de bariu și se obțin ca acizi liberi prin adăugare de acid sulfuric. Soluția se concentrează apoi și se încălzește pe o baie de apă pentru a deshidrata acidul izocitric la lactona sa. Esterificarea cu metanol se realizează utilizând drept catalizator trifluorura de bor eterată. Catalizatorul și eterii cu punct de fierbere scăzut se distilă în vid iar esterul dimetilic al lactonei acidului izocitric se izolează, din reziduiul rămas în vasul de distilare, prin recristalizare în apă. Acidul (+)-izocitric se obține ca sare de sodiu sau de potasiu prin saponificare cu un mic exces de alcalii, urmat de neutralizare la pH-ul dorit.

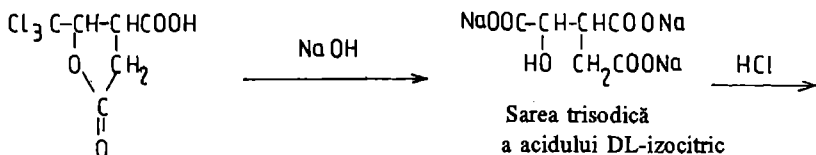
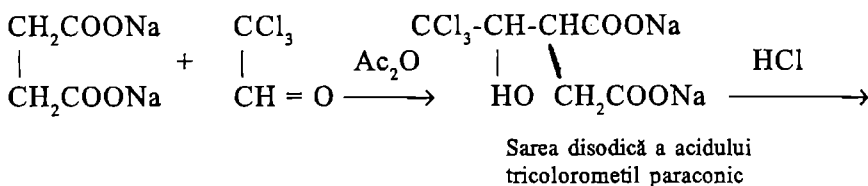
Planta utilizată de obicei este *Bryophyllum calycinum*; *B. fedtchesnkoii* și *B. crenatum* dau rezultate satisfăcătoare, și fără îndoială că numeroase alte plante din genuri înrudite aparținând familiei Crassulaceae pot fi de asemenea utilizate (G. W. Pucher și H. B. Vickery, 1946). Dimetil lactona acidului izocitric a fost purificată și prin distilare în vid (p. f. 180-188°C/5 mm Hg); produsul a fost apoi recristalizat din etanol și apoi din apă. S-a recomandat de asemenea conversia esterului dimetilic al lactonei acidului izocitric la lactona acestuia prin refluxare cu acid clorhidric diluat (H. B. Vickery, 1953).

A fost elaborată o metodă mai rapidă de purificare prin extracția țesutului vegetal cu eter etilic la pH puternic acid, în loc de etanol acidifiat. Din 200 g material vegetal uscat s-au obținut 10-20 g izocitrat monopotesic  $C_6H_7O_7K$  (H. B. Vickery și D. G. Wilson, 1960).

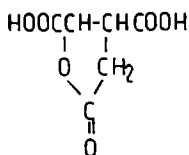
O sinteză a acidului DL-izocitric a constat în utilizarea ca precursor inițial a acidului citric (acid  $\beta$ -hidroxi tricarbolic) (J. P. Greenstein, 1936):



Metoda lui Fittig, bazată pe acidul triclormetilparaconic, a fost deasemenea îmbunătățită (G. W. Pucher și H. B. Vickery, 1946):



Lactona acidului triclormetilparaconic



Lactona acidului DL-izocitric

**Proprietăți.** Esterul dimetilic al lactonei acidului treo-D<sub>s</sub>-(+)-izocitric are p. t. 105-107°C. Rotația specifică în metanol este  $[\alpha]_D^{20} = -65^\circ$  iar echivalentul de saponificare este 64,04. Esterul nu este hidrosopic iar păstrarea la întuneric timp ce câțiva ani a dus doar la o îngălbenire ușoară a produsului. Lactona acidului

izocitric a fost preparată prin fierberea esterului dimetilic al lactonei acidului izocitric cu acid clorhidric diluat; p. t. al lactonei este 156-157°C.

### 5.3. METABOLIȚI AI AMINOACIZILOR

Aminoacizii care nu sunt utilizați în sinteza proteinelor sunt metabolizați în sensul că grupările amino sunt convertite la uree iar scheletul de atomi de carbon se transformă în fragmente mai simple. Există 20 de secvențe multienzimatice diferite pentru oxidarea celor 20 de aminoacizi diferiți.

În continuare prezentăm spre exemplificare structura și obținerea câtorva derivați metabolici ai aminoacizilor.

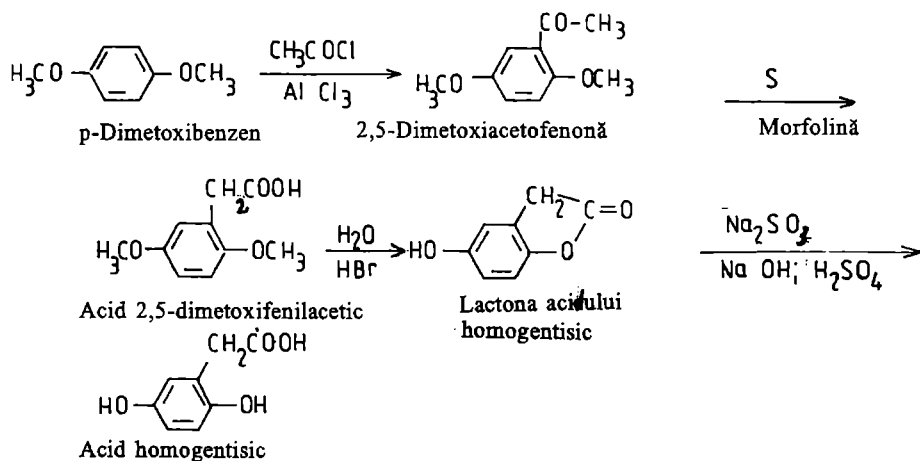
#### 5.3.1. ACIDUL HOMOGENTISIC

Acidul homogentisic este un intermediar al conversiei fenilalaninei și tirozinei la acid acetoacetic și fumaric.

Au fost relatate mai multe metode de preparare ale acidului homogentisic: din aldehida gentisică (E. Baumann și S. Frankel, 1895), din isatină (O. Neubauer și L. Flatov, 1907), p-hidrochinonă și bromură de alil (G. Hahn și W. Stanier, 1929), din p-dimetoxibenzen *via* 2,5-dimetoxibenzaldehidă (A. Neuberger, 1948), din acid, 2,5-dimetoxifenilpiruvic (G. Leaf și A. Neuberger, 1948). Primele metode aveau randamente mici dar erau valoroase pentru confirmarea structurii, precum și pentru facilitarea accesului la acidul homogentisic.

Compusul a fost izolat din urina șobolanilor bolnavi de alcaptonurie experimentală (A. Neuberger și T. A. Webster, 1947) precum și din ficatul șobolanilor normali (W. E. Knox și M. LeMay-Knox, 1951).

Un bun randament al sintezei chimice se constată pornind de la p-dimetoxibenzen (H. Wolkowitz și M. A. Dunn, 1955):

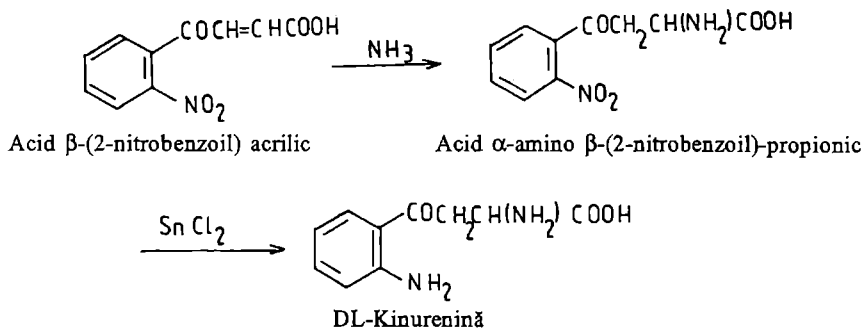


**Proprietăți.** Atât acidul homogentisic cât și lactona sa sunt puțin higroscopici, sunt stabili la aer și nu se descompun într-o măsură apreciabilă în soluții apoase neutre sau acide, în vase ermetic închise la temperatura camerei timp de câteva zile. Ambii compuși se descompun în soluție alcalină. Solubilitatea acidului homogentisic și a lactonei per 100 ml apă la temperatura de 25°C este 85 g și respectiv 0,075 g. Acidul homogentisic are un maxim de absorbție la 290 nm, în apă. Acidul homogentisic a fost determinat în lichidele biologice printr-o metodă spectrofotometrică bazată pe proprietățile sale reducătoare (reduce ionul de argint în soluție acidă și, pe de altă parte, dă reacție pozitivă cu clorura ferică). Acidul homogentisic are p. t. 147-148°C; lactona sa recristalizată din apă are p. t. 188-190°C.

### 5.3.2. L-KINURENINA

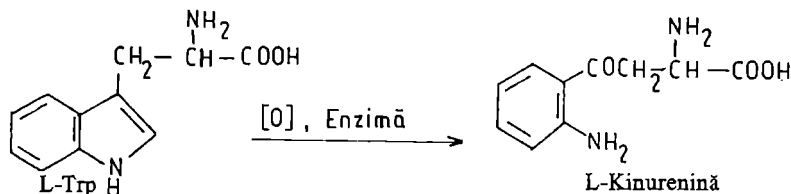
L-Kinurenina este un intermediar al transformării triptofanului în acid 3-hidroxi-antranilic, via 3-hidroxi-L-kinurenină (O. Hayaishi și R. Y. Stanier, 1952).

Inițial L-kinurenina a fost izolată din urina iepurilor cărora li se administrase L-triptofan prin tub stomacal sau injecții subcutanate. Din 4 g triptofan s-au obținut cam 0,935 g L-kinurenină (media de la 11 iepuri) (R. E. Kallio și C. P. Berg, 1949). DL-Kinurenina a fost sintetizată pornind de la bromură de o-nitrofenacil (A. Butenandt și colab., 1943). Sinteza DL-kinureninei de la acid 3-(2-nitro-benzoil) acrilic decurge în felul următor (T. Sakan, 1942):



S-a elaborat și o metodă rapidă pentru obținerea L-, D- și DL-kinureninei prin ozonoliza N-acetil-L-, N-acetil-D- și respectiv N-acetil-DL-triptofanului, urmat de hidroliza produșilor de ozonoliză (R. E. Kallio și C. P. Berg, 1949). O metodă biochimică de preparare a L-kinureninei se bazează pe constatarea că extractul acelar provenit de la unele specii de *Pseudomonas* crescute pe triptofan oxidează aproape cantitativ L-triptofanul la L-kinurenină (O. Hayaishi, 1953):





Mersul reacției se urmărește fie prin scăderea extincției la 280 nm (maximul de absorbție al triptofanului) fie prin creșterea extincției la 360 nm (maximul de absorbție al L-kinureninei).

**Proprietăți.** Cel mai valoros criteriu de puritate este spectrul UV. Astfel L-kinurenina prezintă maxime de absorbție la: 360 nm ( $\epsilon = 4.500$ ), 257 nm ( $\epsilon = 7.500$ ) și 230 nm ( $\epsilon = 18.900$ ), la pH 7,0 ( $\epsilon$  este coeficientul molar de extincție, în  $\text{cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$ ). Există modificări minore ale spectrului cu schimbarea pH-ului între 2,0 și 12,0.

L-Kinurenina a fost obținută fie sub formă de sulfat fie în stare liberă. L-Kinurenin sulfatul anhidru are  $[\alpha]_D^{25} = +10,2^\circ$  ( $c = 1\%$  în apă) iar L-kinurenina are  $[\alpha]_D^{25} = -30,5^\circ$  ( $c = 1\%$  în apă).

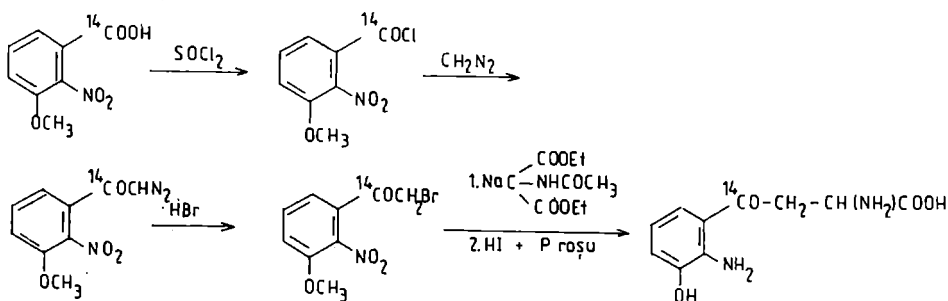
Spectrul IR al kinurenin sulfat monohidratului în Nujol arată o bandă largă în jurul a 3,5  $\mu$ , maxime ascuțite la 5,74  $\mu$  și 5,9  $\mu$  și o bandă largă cu maxime la 6,28  $\mu$ , 6,57  $\mu$  și 6,68  $\mu$ . L-Kinurenina în Nujol arată o bandă de absorbție largă în jurul a 3,4  $\mu$  și maxime ascuțite la 6,03  $\mu$ , 6,2  $\mu$  și 6,35  $\mu$ .

### 5.3.3. 3-HIDROXI-L-KINURENINA

L-Kinurenina este transformată în 3-hidroxi-L-kinurenină iar aceasta în acid 3-hidroxi-antralinic, în cursul metabolizării triptofanului.

Sinteza chimică a 3-hidroxi-DL-kinureninei a decurs printr-o metodă similară sintezei DL-kinureninei (M. Kotake și colab., 1951). 3-Hidroxi-L-kinurenina a fost izolată din urina pacienților care ingeraseră izoniazidă (R. R. Brown, 1957) precum și din diferite soiuri de viermi de mătase (K. Inagami și colab., 1957).

O sinteză a 3-hidroxi-DL-kinureninei, care a fost utilizată inclusiv pentru marcarea compusului cu carbon radioactiv, este următoarea (R. R. Brown și colab., 1962):



Conversia L-kinureninei la 3-hidroxi-L-kinurenină de către o suspensie mitocondrială din ficat (F. T. de Castro și colab., 1956; Y. Saito și colab., 1957) a fost deasemenea utilizată pentru prepararea acesteia.

**Proprietăți.** 3-Hidroxi-L-kinurenina proaspăt cristalizată conține aproximativ 2 moli de apă de cristalizare per mol de compus, care poate fi îndepărtată complet prin încălzire la 100°C în vid pe pentoxid de fosfor timp de mai multe ore. Punctul de topire nu este net: compusul începe să se topească la 175°C și se topește complet la 180°C cu descompunere. DL-3-Hidroxikinurenina liberă (cristale aciforme) se descompune la 223°C.

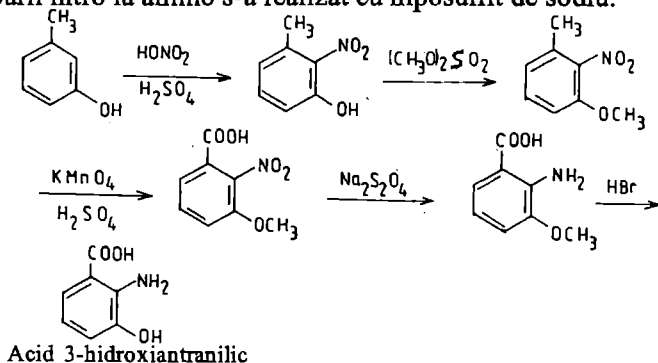
Spectrul UV al 3-hidroxi-kinureninei, cristalizată în prealabil, în tampon fosfat 0,1 M are maxime la 223 nm, 260 nm, 369 nm la pH 2,0; 228 nm, 267 nm și 368 nm la pH 7,4; 248 nm, 286 nm și 393 nm la pH 12,0. Coeficienții molari de extincție la pH 7,0 sunt: 368 nm ( $\epsilon = 4.050$ ), 267 nm ( $\epsilon = 7.630$ ), 228 nm ( $\epsilon = 19.000$ ).

Compusul dă cu ninhidrina o colorație roșu-purpurie, testul diazo Ehrlich este pozitiv iar cu clorura ferică dă o colorație roșu-sânger. Substanța este aproape insolubilă în alcool, puțin solubilă în apă rece dar ușor solubilă în apă la cald. La fierbere în prezența alcaliilor degajă un miros de iasomie.

### 5.3.4. 3-HIDROXIANTRANILATUL (Acidul 2-amino-3-hidroxibenzoic)

Acidul 3-hidroxiantranilic este un intermediar al transformărilor metabolice ale triptofanului.

Acidul 3-hidroxiantranilic a fost obținut prin oxidarea acidului antranilic cu persulfat de potasiu (E. Boyland și P. Sims, 1954). Anterior fusese sintetizat de la acid 3-metoxibenzoic, prin nitrare urmat de hidrogenare cu paladiu pe cărbune și hidroliză cu acid iodhidric (J. F. Nyc și H. K. Mitchell, 1948). Sinteza acidului 3-hidroxiantranilic de la m-crezol are avantajul că evită separări de amestecuri (o-p) (W. M. Stanley și colab., 1933; J. L. Warnell, 1958). Reducerea grupării nitro la amino s-a realizat cu hiposulfid de sodiu:



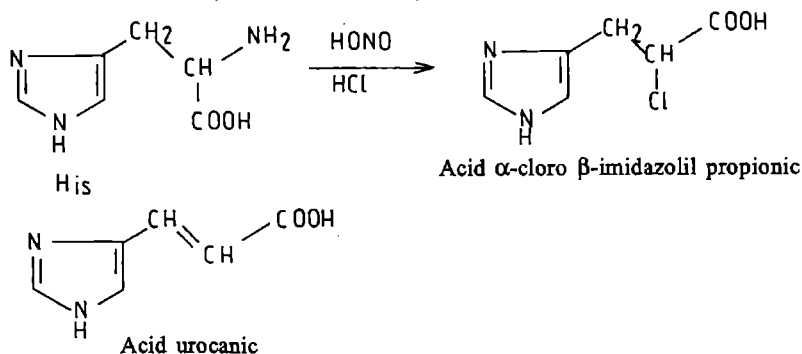
**Proprietăți.** Acidul 3-hidroxi-antranilic pur, încălzit în capilar, se carbonizează la 246-250°C și se descompune la 250-252°C; sub presiune redusă (0,1 mm) sublimază la 160-170°C dând cristale aciforme de culoare albă. Hidroclorura acidului 3-hidroxi-antranilic are p. t. 227°C iar 3-metoxiantranilatul are p. t. 94°C. Acidul 3-hidroxi-antranilic prezintă un maxim de absorbție la 310 nm, la pH neutru. Spectrul de absorbție în acid clorhidric diluat prezintă un minim la 260 nm și un maxim la 300 nm. Totodată spectrul de absorbție UV al acidului 3-hidroxi-antranilic variază într-o manieră caracteristică la schimbarea pH-ului și solventului.

Acidul 3-hidroxi-antranilic prezintă în UV o fluorescență caracteristică, proprietate utilizată și la detecția cromatografică. S-a găsit că intensitatea fluorescenței acidului 3-hidroxi-antranilic crește pe măsură ce polaritatea solventului scade, astfel că fluorescența sa este de 16 ori mai intensă în etanol absolut decât în tampon fosfat Krebs-Ringer. La scăderea pH-ului fluorescența scade: la pH 4 are o intensitate de 4 ori mai mică decât la pH 7. Creșterea pH-ului peste 7 duce la scăderea rapidă a fluorescenței.

### 5.3.5. UROCANATUL (Acidul 3-imidazolil acrilic)

Acidul urocanic este un intermediar al metabolizării histidinei.

O metodă chimică convenabilă de sinteză a acidului urocanic utilizează drept precursor histidina. Prin reacția acesteia cu acidul azotos, în mediu de acid clorhidric concentrat, se obține acidul 2-cloro-3-imidazolil propionic care, prin tratare cu trimetil amină, dă acid urocanic (S. Edlbacher și H. von Bidder, 1942; A. H. Mehler și H. Tabor, 1953):



Prepararea enzimatică (enzimă din ficat sau *Pseudomonas fluorescens*) a fost de asemenea utilizată.

**Proprietăți.** Cel mai util indicid de puritate este coeficientul molar de extincție ( $\epsilon = 1,88 \cdot 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$ , la 277 nm și la pH 7,4).

Prin hidrogenarea acidului urocanic pe catalizator de platină se absoarbe un mol de hidrogen per mol acid urocanic iar din mediul de reacție a fost izolat acidul imidazolil-propionic. Acidul urocanic are două valori  $pK$ , la 3,5 și la 5,8. La punctul izoelectric (pH aproximativ 4,6) acidul urocanic este relativ insolubil, proprietate utilizată la separarea din amestecuri. O soluție saturată la 0°C, 37°C și 100°C conține aproximativ 100 mg, 600 mg și respectiv 6 g acid urocanic dihidrat per 100 ml. Sarea de sodiu și hidrociorura sunt foarte solubile în apă. Spectrul IR este valoros pentru evidențierea configurației *trans* a legăturii duble din fracțiunea acrilică a moleculei.

VERIFICAT  
2017

VERIFICAT  
2007

---

Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 108/1994 la  
Tipografia Editurii Universității din București

---

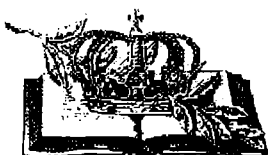






DATA RESTITUIRII		
<del>A2 itcu file</del>		
<del>23 FEB. 2009</del>		
15 OCT 2007		
10. 2010		
<del>Z</del>		
09.07.2021		
08.09.2021		

BIBLIOTECA CENTRALA  
UNIVERSITARA „CAROL I”



DE APPETITO ET ANIMA

