INVESTIGAȚII COMPUTAȚIONALE PRIVIND FEZABILITATEA REACȚIEI DE ESTERIFICARE DINTRE L-CARNITINĂ ȘI ACIDUL PROTOCATECUIC

COMPUTATIONAL INVESTIGATIONS ON THE FEASIBILITY OF THE ESTERIFICATION REACTION BETWEEN L-CARNITINE AND PROTOCATECHUIC ACID

ARSENE Ion, dr., conf. univ. UPS „Ion Creangă” din Chișinău, Institutul de Chimie, Chișinău

ARSENE Ion, PhD, associate professor UPS “Ion Creanga” from Chisinau, Institute of Chemistry, Chisinau

ORCID: 0000-0003-3102-3507,
arsene.ion@upsc.md

CZU: 543+544+547:519.6
DOI: 10.46727/c.v2.19-20-09-2025.p114-121

Abstract. This research explores the chiral behavior and conformational landscape of L-carnitine by vibrational circular dichrosis (VCD) spectroscopy correlated with density functional theory (DFT) calculations, as well as the thermodynamic and kinetic feasibility of its esterification reaction with protocatechical acid. The DFT simulations showed the existence of several energetically stable conformities, differentiated by distinct spectroscopic signatures in IR and VCD, significantly influenced by the solvent effect and the network of intramolecular hydrogen bonds. The comparison of the calculated spectra with the experimental IR data confirmed the attribution of characteristic vibrations (C=O, O–H), while the VCD bands allowed the differentiation of stable conformances, highlighting the potential of the method for conformational validation in solution. The analysis of the esterification mechanism showed that the reaction with protocatechuic acid is thermodynamically unfavorable and presents a high activation barrier, although the stabilization of intermediates by aromatic conjugation and hydrogen bonds partially contributes to the decrease in transition energy. The results obtained highlight the relevance of combining VCD spectroscopy with theoretical calculations for correlating the structure with the reactivity of L-carnitine, providing new insights on its biochemical role and interactions with food acids.
Keywords: L-carnitine, VCD, DFT, conformational analysis, esterification mechanism

Rezumat. Această cercetare explorează comportamentul chiral și peisajul conformațional al L-carnitinei prin spectroscopie de dicroism circular vibrațional

(VCD) corelată cu calcule de teorie a funcționalului densității (DFT), precum și fezabilitatea termodinamică și cinetică a reacției sale de esterificare cu acidul protocatecuic. Simulările DFT au evidențiat existența mai multor conformeri stabili energetic, diferențiați prin semnături spectroscopice distincte în IR și VCD, sensibil influențate de efectul solventului și de rețeaua de legături de hidrogen intramoleculare. Compararea spectrelor calculate cu datele IR experimentale a confirmat atribuirea vibrațiilor caracteristice (C=O, O–H), în timp ce benzile VCD au permis diferențierea conformerilor stabili, subliniind potențialul metodei pentru validarea conformațională în soluție. Analiza mecanismului de esterificare a arătat că reacția cu acidul protocatecuic este termodinamic nefavorabilă și prezintă o barieră de activare ridicată, deși stabilizarea intermediarilor prin conjugare aromatică și legături de hidrogen contribuie parțial la scăderea energiei de tranziție. Rezultatele obținute evidențiază relevanța combinării spectroscopiei VCD cu calculele teoretice pentru corelarea structurii cu reactivitatea L-carnitinei, oferind perspective noi asupra rolului său biochimic și a interacțiunilor cu acizii alimentari.
Cuvinte-cheie: L-carnitină, VCD, TFD, analiză conformațională, mecanism de esterificare

Introducere

Carnitina (L-carnitina) este un compus natural, esențial pentru metabolismul lipidic la mamifere, care joacă un rol central în transportul acizilor grași cu lanț lung în mitocondrii, pentru oxidare β, prin formarea esterilor acil-carnitină (acylcarnitines) [1]. Prin această reacție de esterificare biologică, gruparea acil (derivată de acid carboxilic) se leagă de gruparea hidroxil a carnitinei, cu eliminarea echivalentă a CoA-ului (în sistemul acil-CoA + carnitină → acil-carnitină + CoA), fără eliminarea directă a unei molecule de apă în reacția catalizată de transferul acilului [2]. Pe de altă parte, din perspectiva chimică, reacția simplă de esterificare între un acid carboxilic alimentar și gruparea hidroxil a carnitinei (ca un alcool) ar presupune: activarea acidului carboxilic (prin protonare sau printr-un agent de activare); nucleofilie a grupării hidroxil din carnitină; eliminarea unei molecule de apă conform reacției tip Fischer sau a altor mecanisme de esterificare chimică.

Interesul pentru analiza unei asemenea reacții chimice (non-enzimatice sau asistate enzimatic, biocatalitic) provine din câteva considerente: stabilirea modului în care acizii alimentari (în special acizii grași, acizii carboxilici simpli sau acizii nesaturați) ar putea forma esteri de carnitină în condiții alimentare, digestive ori industriale; posibile implicări metabolice: esterii de carnitină pot fi transportabili între compartimente celulare, pot funcționa ca intermediar în procesarea metabolică sau pot fi excretați; acumularea sau alterarea raportului acil-carnitină / carnitină liberă sunt

semnalizatori pentru diverse tulburări metabolice (ficat, disfuncții mitocondriale, diabet etc.) [3]; aplicații potențiale de sinteză: biocataliză (lipaze etc.) ca să obții esteri de carnitină cu acizi alimentari, care pot avea proprietăți biochimice utile, de exemplu modificări de solubilitate, biodisponibilitate ori stabilitate. Un studiu relevant a demonstrat esterificarea acidului conjugat linoleic (CLA) cu L-carnitină folosind lipaze, în sisteme fără solvent și/sau cu acetonitril, cu randamente variabile în funcție de condițiile de reacție (lipază, timp, conținutul de apă, sisteme de uscare etc.) [4].

Esterii de carnitină permit mobilizarea acizilor grași în mitocondrii pentru oxidare β. Fără această esterificare (catalizată de *carnitine acyltransferases,* CPT-I și CPT-II, și transportorul CACT), acizii grași nu pot traversa eficient membrana mitocondrială internă [5]. Carnitina ajută de asemenea la reglarea nivelului de acil-CoA liber, care altfel ar putea inhiba enzime metabolice (feedback negativ) sau ar produce acumulări toxice. Acest rol este crucial în stările de stres metabolic, ischemie, diabet, etc. [5].

Comparativ, dacă esterificarea non-enzimatică cu acizii alimentari ar fi semnificativă, ar putea influența profilul acilcarnitinelor din sânge, ar putea produce estimator de stres oxidativ sau ar putea afecta biodisponibilitatea carnitinei libere, ceea ce are implicații în nutriție și sănătate.

Caracterul său chiral și prezența mai multor grupări funcționale (hidroxil, carboxil, amoniu cuaternar) fac ca proprietățile spectroscopice să fie extrem de sensibile la conformația moleculară și la interacțiunile cu mediul. Spectroscopia de dicroism circular vibrațional (VCD) reprezintă o metodă recomandată pentru investigarea stereochimiei și a conformațiilor moleculelor chirale, prin diferențierea absorbțiilor IR ale radiației circulare stânga/dreapta polarizate [6].

Aplicarea calculelor DFT pentru simularea spectrelor VCD ale carnitinei și a posibilelor sale conformații permite corelarea modelelor teoretice cu structura experimentală, deschizând perspective pentru o mai bună înțelegere a rolului său biochimic și a interacțiunilor cu acizii alimentari [7].

Scopul cercetării este investigarea comportamentului chiral și a conformațiilor L-carnitinei prin spectroscopie de dicroism circular vibrațional (VCD) și calcule DFT, cu accent pe corelarea proprietăților spectroscopice cu structura moleculară și interacțiunile de mediu, precum și pe elucidarea fezabilității termodinamice a reacției de esterificare cu acidul

protocatecuic, prin determinarea energiilor libere de reacție și a barierelor de activare asociate mecanismului de formare a esterilor.

Metode computaționale

Geometriile conformerilor L-carnitinei au fost generate utilizând o căutare conformațională inițială GMMX, urmată de optimizări de geometrie prin metoda DFT la nivelul teoriei B3LYP/6-31G [8], implementată în pachetul de programe Gaussian 09 [9]. Optimizările au fost efectuate atât în fază gazoasă, cât și în solvent (apă), fără restricții de simetrie. Stabilitatea relativă a conformerilor a fost evaluată pe baza energiilor libere Gibbs, selectându-se pentru analiza spectroscopică acei conformeri aflați într-o fereastră energetică de 3–5 kcal/mol față de minimul global. Spectrele IR și VCD teoretice au fost calculate la același nivel de teorie, iar intensitățile relative au fost obținute prin ponderarea conformerilor în funcție de populația Boltzmann. Pentru analiza reacției de esterificare cu acidul protocatecuic, au fost identificate structurile intermediare și stările de tranziție, confirmate prin calcule de frecvențe vibraționale.

Rezultate și discuții

Analiza conformațională a L-carnitinei a evidențiat existența a cinci conformeri stabili energetic (Tabelul 1), aflați într-un interval de 3–5 kcal/mol față de structura cu energie minimă. Prezența grupărilor funcționale polare (hidroxil, carboxilat și amoniu cuaternar) favorizează formarea unei rețele extinse de legături de hidrogen intramoleculare, care contribuie la stabilitatea relativă a conformerilor și la particularitățile spectroscopice.

Tabelul 1. Energia totală a conformerilor studiați

Nr. conformerului	Energia totală (u.a.e)
1	-556,2136729
2	-556,2111425
3	-556,2168417
4	**-556,2172069**
5	-556,2072333

Dintre structurile identificate, conformerul 4 s-a dovedit a fi cel mai stabil, având o energie cu 6,26 kcal/mol mai mică decât conformerul 5, care prezintă cea mai ridicată energie și este, prin urmare, cel mai instabil

(Tabelul 1 și Figura 1). Conformerul 4 a fost selectat pentru studiul ulterior al reacției de esterificare.

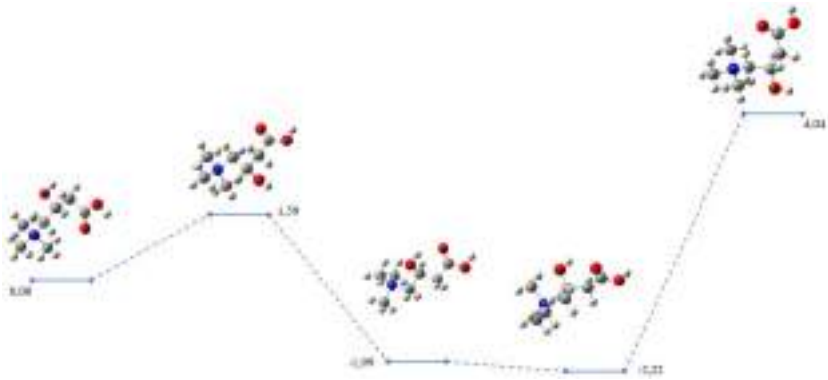
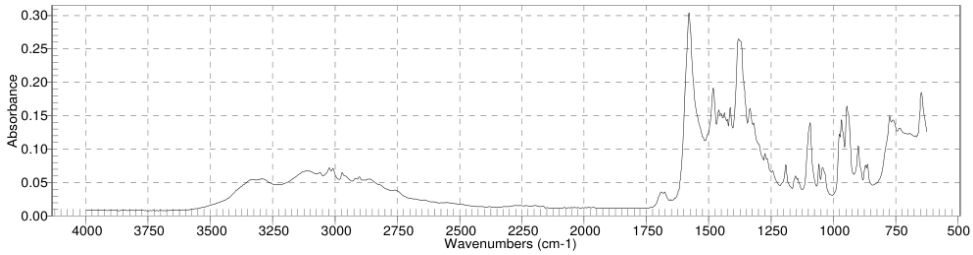


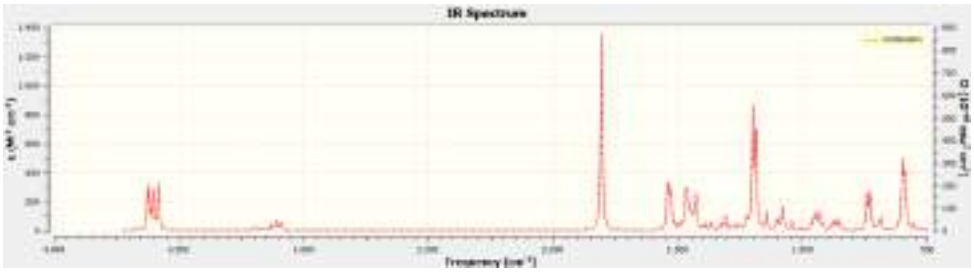
Figura 1. Profilul energetic al stabilității conformerilor L-carnitinei, kcal/mol

Spectrele IR și VCD calculate la nivel DFT (B3LYP/6-311G) au evidențiat diferențe semnificative între conformerii analizați, în special în regiunile corespunzătoare vibrațiilor funcționale caracteristice. Banda carbonilului (C=O) apare experimental în jur de ~1740 cm^{-1}, fiind calculată teoretic la 1805 cm^{-1}, iar vibrațiile grupărilor hidroxil (O–H) sunt plasate în jurul a ~3400 cm^{-1}, cu valoarea teoretică de 3603,98 cm^{-1}. De asemenea, s-au identificat moduri de vibrație în zona 1465 cm^{-1}, asociate hidrogenilor din grupele metilice, precum și o bandă în jurul a 590 cm^{-1}, corespunzătoare hidrogenilor grupărilor hidroxilice implicați direct în reacția de esterificare (Figura 2).

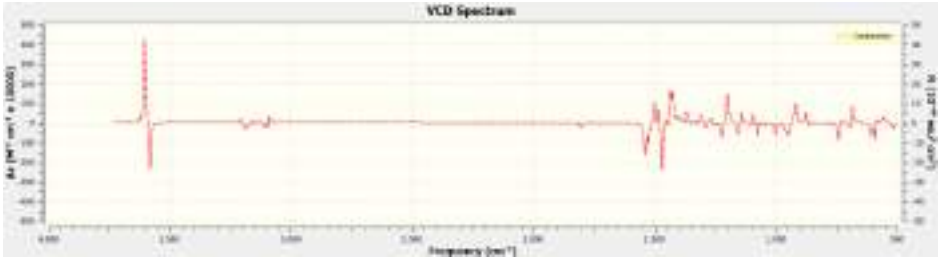
Compararea spectrului IR experimental cu spectrele IR și VCD calculate, a confirmat atribuirea benzilor principale corespunzătoare vibrațiilor C=O (~1740 cm^{-1}) și O–H (~3400 cm^{-1}). Dacă spectrul IR validează pozițiile vibraționale majore, spectrul VCD aduce informații suplimentare privind chiralitatea și distribuția conformațională a L-carnitinei. Semnele distincte ale benzilor VCD în regiunile caracteristice pentru vibrațiile amidice și hidroxilice permit diferențierea conformerilor stabili energetic, sugerând că spectroscopia VCD reprezintă o metodă experimentală promițătoare pentru validarea distribuției conformaționale a carnitinei în soluție.



a



b



c

Figura 2. Spectrul IR experimental (a) comparat cu spectrele IR (b) și VCD (c) teoretice obținute prin calcule DFT pentru L-carnitină

Includerea efectului solventului a condus la o stabilizare suplimentară a conformerilor, care implică interacții hidroxil–carboxilat, fapt reflectat atât în intensitățile semnalelor VCD, cât și în deplasările de frecvență. Această constatare subliniază sensibilitatea ridicată a spectroscopiei VCD la micro-mediu și relevanța corelării dintre simulări și condițiile experimentale.

Pentru a evalua fezabilitatea termodinamică a reacției de esterificare dintre L-carnitină și acidul protocatecuic, au fost calculate energiile libere de reacție și barierele de activare aferente etapelor mecanismului propus (Figura 3).

Rezultatele arată că procesul de esterificare este termodinamic nefavorabil, reacția fiind endotermică, cu o valoare a energiei libere de reacție de +14,68 kcal/mol, ceea ce indică lipsa spontaneității în condiții standard. Analiza profilului energetic a evidențiat că

pasul limitativ al reacției este eliminarea moleculei de apă din intermediarul tetraedric.

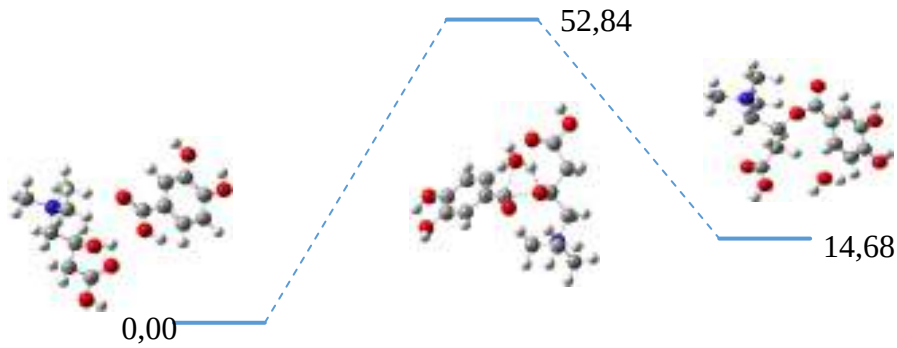


Figura 3. Profilul energetic al reacției de esterificare a L-carnitinei cu acidul protocatecuic, kcal/mol

În cazul acidului protocatecuic, bariera de activare calculată este ridicată, de 52,84 kcal/mol, ceea ce sugerează o cinetică lentă a procesului. Totuși, grupările fenolice ale acidului pot contribui la stabilizarea intermediarului prin legături de hidrogen, iar conjugarea electronică a nucleului aromatic favorizează delocalizarea sarcinii, conducând la o scădere parțială a energiei stării de tranziție.

Concluzii

Analiza conformațională a evidențiat faptul că L-carnitina prezintă mai mulți conformeri stabili energetic, diferența de stabilitate fiind guvernată de rețeaua intramoleculară de legături de hidrogen. Dintre aceștia, conformerul 4 a fost identificat drept cel mai stabil și a constituit baza pentru analiza ulterioară a reactivității.

Simulările DFT și compararea spectrelor calculate cu spectrul IR experimental au demonstrat o bună concordanță în atribuirea vibrațiilor caracteristice (C=O, O–H), iar spectroscopia VCD s-a dovedit esențială pentru diferențierea conformerilor și pentru evidențierea sensibilității L-carnitinei la micro-mediu și la efectul solventului. Aceste rezultate confirmă relevanța combinării spectroscopiei vibraționale cu modelarea teoretică pentru descrierea corectă a peisajului conformațional al moleculelor chirale.

Studiul termodinamicii și cineticii reacției de esterificare cu acidul protocatecuic a arătat că procesul este endotermic și nefavorabil din punct de vedere energetic, cu o energie liberă de reacție pozitivă (+14,68 kcal/mol) și o barieră de activare ridicată (52,84 kcal/mol). Acest fapt indică o cinetică

lentă și o probabilitate redusă de desfășurare spontană în condiții standard. Totuși, stabilizarea intermediarilor prin legături de hidrogen și conjugarea electronică a nucleului aromatic reduc parțial energia stării de tranziție.

În ansamblu, rezultatele obținute subliniază valoarea metodei VCD combinate cu calculele DFT pentru înțelegerea distribuției conformaționale și a reactivității L-carnitinei, oferind o bază solidă pentru explorarea ulterioară a interacțiunilor sale cu acizi alimentari și a potențialului biochimic al esterilor corespunzători.

Mulțumiri: Această lucrare a fost realizată în cadrul subprogramului de cercetare 010603 „Identificarea proceselor tehnologice de epurare, formarea calității și cantității apei și cercetări avansate în chimie computațională și ecologică”.

Bibliografie:

1. REUTER, S.E., EVANS, A.M. Carnitine and Acylcarnitines. Clin Pharmacokinet 51, 553–572 (2012). https://doi.org/10.1007/BF03261931.
2. MAHADEVAN, S. et al. Metabolism of l-Carnitine Esters of β-Substituted Palmitic Acid by Rat Liver Mitochondria Journal of Biological Chemistry, Volume 245, Issue 12, 3218 - 3224.
3. SCHMIDT-SOMMERFELD E, et al. Analysis of carnitine esters by radio-high performance liquid chromatography in cultured skin fibroblasts from patients with mitochondrial fatty acid oxidation disorders. Pediatr Res. 1998 și 210-4, 44(2):.
4. LI Z, YANG D, JIANG L, JI J, JI H, ZENG X. Lipase-catalyzed esterification of conjugated linoleic acid with L-carnitine in solvent-free system and acetonitrile. Bioprocess Biosyst Eng. 2007 și 331-6., 30(5):.
5. REUTER, S.E., EVANS, A.M. Carnitine and Acylcarnitines. Clin Pharmacokinet 51, 553–572 (2012).
6. KAROLINA DI REMIGIO EIKÅS, MAARTEN T. P. BEEREPOOT, AND KENNETH RUUD A Computational Protocol for Vibrational Circular Dichroism Spectra of Cyclic Oligopeptides The Journal of Physical Chemistry A 2022 126 (32), 5458-5471.
7. MAZZEO G, et al. Vibrational Circular Dichroism (VCD) Reveals Subtle Conformational Aspects and Intermolecular Interactions in the Carnitine Family. Chirality. 2015 Dec și 27(12):907-13.
8. A. BECKE, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. In: J. Chem. Phys. 1993, 98, 5648-5652. doi: 10.1063/1.464913.
9. FRISCH V. F. et al. Gaussian 09, revision B.01. Gaussian, Inc., Wallingford, CT. 2009.