



Faculté de sciences  
Département de chimie

## **Mémoire de fin d'études**

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique  
Spécialité : chimie organique

### **Thème**

**Etude des propriétés antioxydantes des antivitamines k  
(AVK)**

Présenté par

**Zouani marwa**

Devant le jury :

**Mm. S. KASMI.**

**Professeur/USDB1**

**Président**

**Mr. A. AIT YAHIA**

**MAA/USDB1**

**Examineur**

**Mm. F. ATI**

**MAA/USDB1**

**Promotrice**

**Mm. K. HAMZA**

**MCB /USDB1**

**Co. promotrice**

**Promotion : 2021-2022**

## **Remerciements**

***Tout d'abord je remercie Allah le tout puissant pour le courage et la patience qu'il ma adonnée pour surmonter toutes les difficultés rencontrées durant tout mon cursus universitaire.***

***J'adresse mes remerciements à:***

***Mme Ati Fella ma promotrice pour ses précieux conseils, son encouragement et sa disponibilité dans ce projet.***

***Pr .Kasmi pour avoir accepter de présider le jury de ce mémoire.***

***Dr. Ait Yahia pour l'intérêt qu'il à apporté au travail en acceptant d'être examinateur.***

***Dr. Hamza pour ses précieux conseils et son aide.***

***Je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.***

## Résumé

Le présent travail est une étude théorique et expérimentale des propriétés électroniques et antioxydantes de trois molécules antivitamin K (AVK) à savoir l'acenocoumarol, le phenprocoumon et la warfarine en plus de leur noyau de base coumarine.

L'étude théorique a porté sur le calcul des descripteurs BDE, IP, PDE, PA et ETE caractérisant les trois mécanismes d'action possibles d'un antioxydant

Le test DPPH a été utilisé pour évaluer l'activité antioxydante expérimentalement.

Les résultats obtenus montrent que la warfarine possède la meilleure activité, comparable avec le BHT alors que l'acenocoumarol, le phenprocoumon et le noyau coumarine possèdent un faible potentiel antioxydant.

## الملخص

العمل الحالي هو دراسة نظرية و تجريبية للخصائص الإلكترونية ومضادات الأكسدة لثلاثة جزيئات مضادة للفيامين K (AVK) وهي الأسينوكومارول والفينبروكومون و لوارفارين بالإضافة إلى نواة الكومارين الأساسية . ركزت الدراسة النظرية على حساب واصفات وهي BDE, IP, PDE, PA et ETE التي توصف الآليات الثلاث الممكنة للعمل المضاد للأكسدة.

لاختبار النشاط المضاد للأكسدة تم استخدام اختبار DPPH.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن الوارفارين لديه أفضل نشاط، يمكن مقارنته بـ BHT بينما الأسينوكومارول والفينبروكومون ونواة الكومارين لديها إمكانات منخفضة لمضادات الأكسدة

## Abstract

Herein are a theoretical and experimental study of the electronic and antioxidant properties of three antivitamin K molecules (AVK), namely acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin, in addition to their basic coumarin.

The theoretical study focused on the calculation of the descriptors BDE, IP, PDE, PA and ETE characterizing the three possible mechanisms of action of an antioxidant.

The DPPH test was used to test for antioxidant activity.

The results obtained show that warfarin has the best activity, comparable with BHT while acenocoumarol, phenprocoumon and the coumarin have a low antioxidant potential.

# Table des matières

Remerciement

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

## **INTRODUCTION GENERALE**

## **I PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE 1 : VITAMINES K ET ANTIVITAMINES K (AVK)**

1.1. Vitamine K .....	
1.1.a. Structure de vitamine K.....	
1.1.b. Propriétés physicochimiques et ADME de vitamine K.....	
1.1.d. Rôle de vitamine K.....	
1.2. Antivitamines K (AVK) .....	
1.2. a Propriétés physicochimiques et ADME des AVK.....	
1.2.b. Rôle des AVK.....	

### **CHAPITRE 2 : L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE**

2.1. Introduction.....	
2.2. Antioxydants .....	
2.2.a Antioxydants synthétiques.....	
2.2.b Antioxydants naturels.....	
2.4. Méthodes de mesure de l'activité antioxydante.....	
2.5. Test DPPH .....	

### **CHAPITRE 3 : METHODES DE CALCUL THEORIQUE ET MODELISATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE**

3.1. Introduction.....	
3.2. Modèles théoriques.....	
2.2.a Equation de Schrodinger .....	

3.2.b Les méthodes Hartree-Fock (HF) .....	
3.2.c La méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) .....	
3.2.d La méthode DFT Unrestricted .....	
3.2.e Les bases de fonctions.....	
3.3. Mécanismes d'action des antioxydants .....	
3.4. Méthodologie des calculs théoriques.....	

## **II PARTIE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE 1: MATERIELS ET METHODES .....**

### **CHAPITRE 2: RESULTATS ET DISCUSSIONS**

2.1. Analyse des résultats de calcul théorique.....

2.2. Analyse des résultats expérimentaux.....

### **CONCLUSION GENERALE**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Liste des figures

**Figure 1** : Structures chimiques de la vitamine K1, K2, K3

**Figure 2** : Structures chimiques des AVK

**Figure 3** : Classification des antioxydants phénoliques

**Figure 4** : Mécanisme de réduction de DPPH par un antioxydant AH

**Figure 5** : La dégradation de la coloration violette du mélange DPPH-vitamine C dans l'éthanol

**Figure 6** : Géométrie des AVK et du noyau coumarine

**Figure 7** : Les orbitales HOMO, LUMO et le GAP de coumarine, acenocoumarol, phenprocoumone et warfarine

**Figure 8** : Surfaces du potentiel électrostatique de coumarine et des AVK

**Figure 9** : Distribution de la densité de spin de coumarine et des AVK

## Liste des Tableaux

**Tableau N1** : Propriétés physicochimiques des vitamines K1, K2 et K3

**Tableau N2** : Propriétés physicochimiques de coumarine et des AVK (acenocoumarol, phenprocoumone et warfarine)

**Tableau N3** : les ROS, RNS et les espèces radicalaires non libres

**Tableau N4** : Structure Chimique et applications des importants antioxydants synthétiques.

**Tableau N5**: Familles et nomenclatures des réactifs chimiques utilisés

**Tableau N6**: Masse molaires, masses, volumes et concentration des solutions mères des composés testés.

**Tableau N7** :  $E_{HOMO}$ ,  $E_{LUMO}$ ,  $\mu$  et Gap d'énergie de coumarine et AVK

**Tableau N8** : les valeurs de BDE, IP, PDE, PA et ETE en Kcal /Mol

**Tableau N9** : Concentration des solutions testées, leurs activités et leurs courbes de variation de l'activité en fonction de la concentration dans l'éthanol.

**Tableau N10** : Concentration des solutions testées, leur activité et les courbes de variation de l'activité en fonction de la concentration dans le DMSO

## Liste des abréviations

<b>AVK</b>	Antivitamine K.
<b>ADME</b>	Absorption- Distribution- Métabolisme- Excrétion
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RNS</b>	Reactive nitrogen species
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>AVC</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>DFT</b>	Density functional theory
<b>HAT</b>	Hydrogen atom transfer
<b>SET-PT</b>	Single electron transfer followed by proton transfer
<b>SPLET</b>	Sequential proton loss electron transfer
<b>BDE</b>	Bond dissociation enthalpy
<b>IP</b>	Ionization potential
<b>PDE</b>	Proton dissociation enthalpy
<b>PA</b>	Proton affinity
<b>ETE</b>	Electron transfer enthalpy
<b>HF</b>	Hartree-Fock
<b>UHF</b>	Unrestricted Hartree-Fock
<b>LDA</b>	Local Density Approximation
<b>GGA</b>	Generalized Gradient Approximation
<b>STO</b>	Slater Type Orbital
<b>GTO</b>	Gaussian Type Orbital
<b>B3LYP</b>	Becke 3 Lee, Yang, Parr
<b>PM6</b>	Parametric Method 6
<b>Ha</b>	Hartree
<b>C</b>	Concentration
<b>DPPH</b>	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl



<b>UV</b>	ultra-violet
<b>BHA</b>	butyle hydroxyle anisol.
<b>BHT</b>	hydroxytoluènebutyle
<b>Abs</b>	absorbance
<b>OM</b>	orbitale moléculaire
<b>mg</b>	milligramme
<b>ml</b>	millilitre
<b>C</b>	Concentration
<b>m</b>	nanomètre

## Introduction générale

Les antivitamines K (AVK) sont des anticoagulants oraux qui visent à fluidifier le sang, ils sont utilisés dans la prise en charge des phlébites, des embolies pulmonaires ou dans certains troubles cardiaques [1].

Bien que leur efficacité soit largement reconnue, leur utilisation courante reste encore délicate du faite des nombreuses interactions médicamenteuses [2].

Dans le but d'apporter plus d'informations sur les propriétés structurales et électroniques ainsi que le mode d'action des AVK, nous nous intéressons donc à l'étude théorique et expérimentale de ses composés à l'état fondamental en appliquant la méthode DFT et le test DPPH pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

L'étude portera sur trois composés AVK de type coumarines à savoir l'acénocoumarol, le phenprocoumon et la warfarine) en plus de leur noyau de base (coumarine).

Les résultats obtenus permettront de rationaliser et de fournir un aperçu de leur potentiel antioxydant. Ainsi, l'information recueillie peut être utile pour synthétiser des AVK avec moins d'effets secondaires.

L'activité antioxydante des AVK sera réalisée par le calcul des descripteurs BDE, IP, PDE, PA et ETE caractérisant les trois mécanismes d'action possibles des antioxydants à savoir le transfert d'atome d'hydrogène, le transfert d'électron suivis par le départ de proton et le transfert de proton suivi du départ de l'électron [3].

Les résultats de calcul seront comparés avec les résultats du test DPPH effectué pour la coumarine, l'acénocoumarol, le BHT, le BHA et la vitamine C.

Le mémoire est divisé en deux parties :

Une partie bibliographique qui renferme un premier chapitre sur les vitamines K et les antivitamines K. le deuxième chapitre, définit l'activité antioxydante. Dans le troisième chapitre, nous présenterons les modèles théoriques et la méthodologie de calcul.

La partie expérimentale est consacré au test DPPH et la à la présentation ainsi que la discussion des résultats théoriques et expérimentaux obtenus.

En fin, les résultats les plus remarquables et les perspectives qui ressortent de cette étude seront résumés dans une conclusion générale.



**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**



**CHAPITRE 1**  
**VITAMINES K ET ANTIVITAMINES K**  
**(AVK)**

---

## 1.1 Vitamine K

La vitamine K est une vitamine liposoluble, découverte fortuitement suite à des recherches sur le cholestérol à la fin des années 1920 par le biochimiste danois Henrick Dam. Il a soumis à des poussins un régime alimentaire sans matières grasses, il constata alors la survenue d'hémorragies chez ces derniers. Les chercheurs ont conclu qu'il existe une substance inconnue jusqu'alors, dont l'absence entraîne une tendance aux hémorragies. Ils décident de lui attribuer le nom de vitamine K, en référence au mot allemand « Koagulation ». C'est en 1936, que cette vitamine a été isolée par Dam et synthétisée par l'américain E. DOISY en 1939. En 1943, cette découverte leurs a valu le prix Nobel partagé de médecine et de physiologie. [4]

La vitamine K est essentielle pour produire des protéines capables de réguler la coagulation sanguine, la fixation du calcium par les systèmes osseux, la souplesse des artères et le bon état des vaisseaux sanguins en général, des tendons, cartilages et autres tissus conjonctifs. [5]

Les carences sont fréquentes, surtout chez le très jeune enfant. Notre corps a besoin de vitamine K pour former des caillots en cas de saignement.

Aussi bien la viande que les légumes peuvent contenir de la vitamine K. Les légumes à feuilles vertes sont les composés qui contiennent les plus grandes concentrations de vitamine K.

### 1.1.a Structure de la vitamine K

La vitamine K regroupe une famille de composés liposolubles caractérisés par une structure naphthoquinone substituée par un groupe méthyle en position 2 et une chaîne aliphatique en position 3 [6]. Les différences entre les composés sont basées sur la longueur et le degré de saturation de la chaîne aliphatique (Figure 1). On distingue notamment : [7]

- **La vitamine K1**

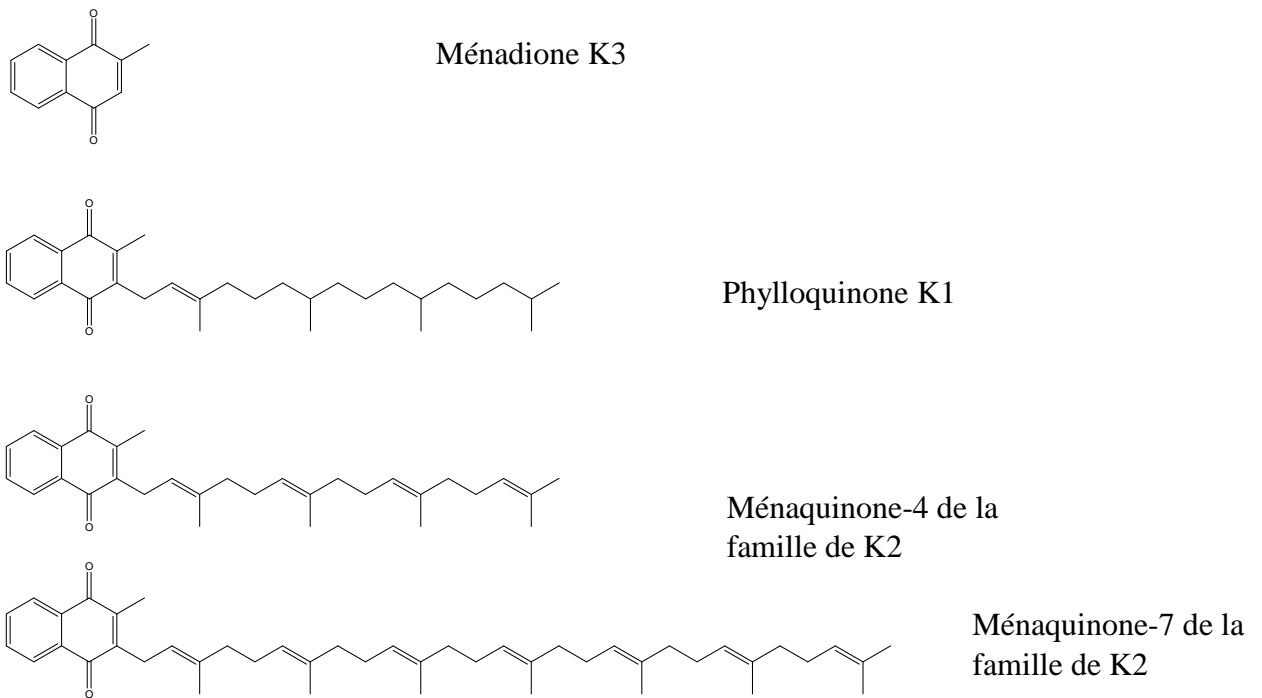
La vitamine K1 appelée également phytoménadione ou phylloquinone est présente dans les plantes. Elle représente la source principale de vitamine K alimentaire.

- **La vitamine K2**

La vitamine K2 ou ménaquinone est synthétisée par des microorganismes, dont les bactéries de l'intestin. Les molécules de vitamine K2 sont composées de plusieurs unités prenyle insaturées en position 3. Le nombre d'unités détermine la nomenclature de la vitamine K2, c'est à dire ménaquinone-*n* (MK-*n*), où *n* représente le nombre d'unités prenyle (*n*=2 à 13). Le soja fermenté est riche en MK-7 et le fromage en MK-4.

- **La vitamine K3**

La vitamine K3 ou ménadione est une forme synthétique de vitamine K.



**Figure 1** Structures chimiques de la vitamine K1, K2, K3

### 1.1.b. Propriétés physicochimiques et ADME de vitamine K

Les propriétés physicochimiques d'une molécule ont un effet très important sur la pharmacocinétique de cette dernière si elle va être utilisée comme un médicament.

La pharmacocinétique est l'étude du devenir de médicament dans l'organisme à savoir l'**A**bsorption de la molécule, la **D**istribution dans l'organisme, l'**E**limination comprenant la biotransformation ou **M**étabolisme et l'excrétion (ADME).

La phylloquinone K1 joue le rôle d'accepteur d'électrons dans le photosystème I des chloroplastes de sorte qu'elle est présente en grande quantité dans les aliments d'origine végétale. La phylloquinone est la forme prédominante de vitamine K dans l'alimentation humaine. Une étude aux Pays-Bas a d'ailleurs révélé qu'elle constitue environ 90% de l'apport total de vitamine K[8] .

Les ménaquinones K2 sont presque toutes synthétisées par des bactéries anaérobies. Seule la MK-4 peut être synthétisée par l'organisme suivant la conversion de la phylloquinone ou l'alkylation de la ménadione [9]. Peu d'aliments sont riches en MK. Le natt, un aliment

japonais traditionnel fait de fèves de soja fermentées par *Bacillus natto*, est sans doute la meilleure source alimentaire de MK.

L'étude de la pharmacocinétique de doses pharmacologiques de MK-4 et de phylloquinone suggèrent que l'absorption intestinale des MK est moindre que celle de la phylloquinone [10]. Cette hypothèse est appuyée par les résultats d'une étude métabolique ayant rapporté qu'à dose équivalente, les MK sous forme de suppléments sont moins bien absorbées que la phylloquinone chez des jeunes adultes.[11]

La ménadione K3 est un métabolite intermédiaire de la conversion de la phylloquinone en MK-4. Contrairement à la phylloquinone et aux MK qui sont hydrophobiques, la ménadione possède la particularité d'être hydrosoluble [12]. Elle n'est pas présente naturellement dans l'alimentation mais une forme de synthèse demeure disponible.

Toutefois, le supplément de ménadione n'est autorisé que pour usage vétérinaire seulement. En effet, à une dose pharmacologique, la ménadione peut causer de l'anémie hémolytique, une hyperbilirubinémie chez les nouveau-nés [13].

Transportée au foie par les lipoprotéines riches en triglycérides, elle peut être soit métabolisée par glucuroconjugaison, soit stockée, mais de manière limitée (environ 8 jours). Les métabolites sont éliminés par les urines et par la bile.[14]

Les propriétés physicochimiques sont calculées en utilisant ADMETlab 2.0 [15] (disponible à : <https://admetmesh.scbdd.com>) et sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau N1** : Propriétés physicochimiques des vitamines K1, K2 et K3

	Log S	Log P	PM	nHA	nHD	Log D
K1	-5.314	9.42	450.35	2	2	6.109
K2	-4.528	8.45	444.3	2	2	5.519
K3	-3.221	2.20	172.05	2	0	1.966

PM : poids moléculaire ; nHA: nombre d'accepteurs de liaisons H; nHD: nombre de donneurs de liaisons H; logP : log de coefficient de partition ; log S : log de solubilité ; log D : log coefficient de distribution à PH=7.4.

La règle de Lipinski permet de déterminer si un composé chimique ayant de propriétés médicamenteuses est susceptible d'être administré par voie orale chez les humains. Selon cette règle, un composé est capable d'être administré par voie orale s'il remplit au moins trois(3) critères des cinq (5) suivantes:

- Un poids moléculaire maximum de 500g/mol ( $PM \leq 500$ ).
- Un coefficient de partition  $\log P \leq 5$ .
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène, atomes d'azote ou oxygène avec un ou plusieurs atomes d'hydrogènes  $\leq 5$
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène, atome d'azote ou oxygène  $\leq 10$ .
- $\log P$  est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau.

Le  $\log P = \log (C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}})$ , doit être compris entre 2 et 5. Cette valeur permet de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. S'il est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement [16].

- $\log S$  doit être compris entre -4 et 0.5.
- $\log D$  doit être compris entre 1 et 3.
- Le poids moléculaire (MW) est lié à la taille de la molécule. Lorsque la taille moléculaire augmente, une cavité plus grande doit être formée dans l'eau pour solubiliser le composé.
- Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (O et N atomes) et le nombre de donneurs de liaison hydrogène (NH et OH) se sont révélés critiques dans un contexte de développement de médicaments car ils influencent sur l'absorption et la perméabilité.

Les résultats du tableau montre que :

Les formes K1 et K2 sont caractérisés par  $\log P$  élevée ( $>3$ ), ces deux formes sont apolaires et lipophiles ( $\log S < -4$ ). Par contre la forme K3 est soluble dans l'eau ( $\log S > -4$ ).

K1 et K2 présentent deux violations à la règle de Lipinski par contre K3 vérifie les cinq critères.

### **1.1.c Rôle de vitamine K**

La fonction la mieux connue de la vitamine K est d'intervenir dans la synthèse des formes actives de plusieurs facteurs de la coagulation (l'hémostase). Au delà de cette fonction biologique, la vitamine K joue un rôle important dans le bon fonctionnement de l'organisme. Elle intervient dans la minéralisation osseuse et l'inhibition de la calcification cardiovasculaire. Elle est impliquée aussi dans l'inflammation, l'incidence du cancer et le métabolisme du glucose, de plus, elle est considérée parmi les facteurs influençant la stabilité du traitement anticoagulant [5].



---

## 1.2. Antivitamines K (AVK)

Les antivitamines K (AVK) sont des anticoagulants oraux utilisés depuis plus d'un demi-siècle dans le traitement et la prévention des pathologies thromboemboliques. Ils ont permis de réduire considérablement le risque de récurrence et de mortalité des accidents emboliques et des thromboses veineuses et artérielles [1].

La découverte des antivitamines K remonte aux années 1920 aux Etats-Unis, suite à la survenue d'hémorragies spontanées décimant des troupeaux de bétail ayant consommé du trèfle doux (*Melilotus alba*) avarié. C'est en 1939, que K.P. Link isole la structure de cet agent hémorragique : le 3,3-di méthylène, 4- hydroxy coumarine. Ce n'est qu'en 1940, qu'il parvient à la synthétiser en lui donnant le nom « dicoumarol ». K.P. Link démontre également qu'un traitement par vitamine K inhibe l'action du dicoumarol, il en conclut que ce dernier est un antagoniste de la vitamine K [17]. En 1948, la warfarine, premier AVK de synthèse, vit le jour lors de l'élaboration d'un raticide responsable d'hémorragies intestinales aiguës et fatales chez ces animaux. En 1954, cette molécule révolutionnaire a montré une efficacité supérieure au dicoumarol et reste à ce jour la molécule la plus documentée des AVK [17].

### 1.2. a. Propriétés physicochimiques et ADME des AVK

Les anticoagulants oraux appartiennent au groupe des 4 hydroxycoumarines. Ils partagent la même structure chimique de base (figure 2). Ce sont des acides faibles avec des pKa de 4.2 (phenprocoumone) et 5.0 (warfarine et acenocoumarol). Ils sont solubles dans l'alcool (éthanol, méthanol). Leurs poids moléculaire varient de 280.3 (phenprocoumone) à 308.3 (warfarine) et 353.3 (acenocoumarol).

Chaque molécule a un seul centre chiral qui donne deux énantiomères, la forme S est environ 2 à 5 fois plus puissante que la configuration R [2][18].

Lorsqu'on compare les trois antagonistes de la vitamine K, acenocoumarol, phenprocoumone et warfarine, il a été démontré *in vitro* que l'acénocoumarol avait un pouvoir anticoagulant intrinsèque plus élevé que la warfarine et le phenprocoumone [19].

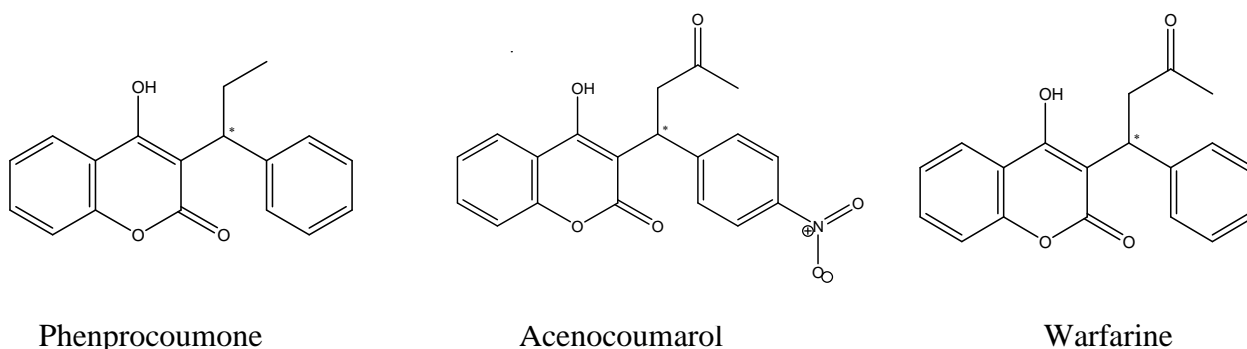
Dans la situation clinique, un mélange racémique des deux énantiomères est administré par voie orale [2].

Chaque antagoniste de vitamine K est disponible auprès des fabricants sous forme de comprimés contenant 1-10mg de warfarine sodum, 3 mg phenprocoumon et 1-4mg acenocoumarol [19].

Ces trois AVK présentent des différences substantielles malgré leur structure chimique similaire, les différences concernent principalement le métabolisme et l'élimination.

Les AVK ont un indice thérapeutique faible et une grande variation inter et intra-individuelles de leur relation dose-réponse [2], de ce fait, leur utilisation est régulièrement suivie par des contrôles .

Un grand nombre de médicaments interfèrent avec la pharmacocinétique des AVK. Certains les potentialisent, tandis que d'autres diminuent leurs effets [2].



**Figure 2** : Structures chimiques des AVK

Les propriétés physicochimiques de coumarine et des AVK ont été calculées par le logiciel ADMETlab 2.0 [15] (disponible à : <https://admetmesh.scbdd.com>) et sont représentées dans le tableau 2 et sont représentées dans le tableau N2 suivant :

**Tableau N2** : Propriétés physicochimiques de coumarine et des AVK (acenocoumarol, phenprocoumone et warfarine)

	Log S	Log P	PM	nHA	nHD	Log D
Coumarine	-2.019	1.672	146.04	2	0	1.506
Acenocoumarol	-4.836	2.755	353.09	7	1	2.696
Phenprocoumone	-4.677	3.989	280.11	3	1	3.340
Warfarine	-4.624	2.701	308.10	4	1	2.654

---

Les AVK étudiés sont des substances liposolubles, caractérisés par  $0 < \text{Log P} < 5$  Leur absorption digestive est donc rapide et complète. La liaison aux protéines plasmatiques est assurée de 90 à 99% par l'albumine. Cette liaison est donc de forte affinité et restrictive. L'élimination, sous forme de métabolites généralement inactifs, est principalement urinaire [20].

Les trois AVK présentent une seule violation à la règle de Lipinski à savoir la solubilité ( $\text{Log S} < -4$ ).

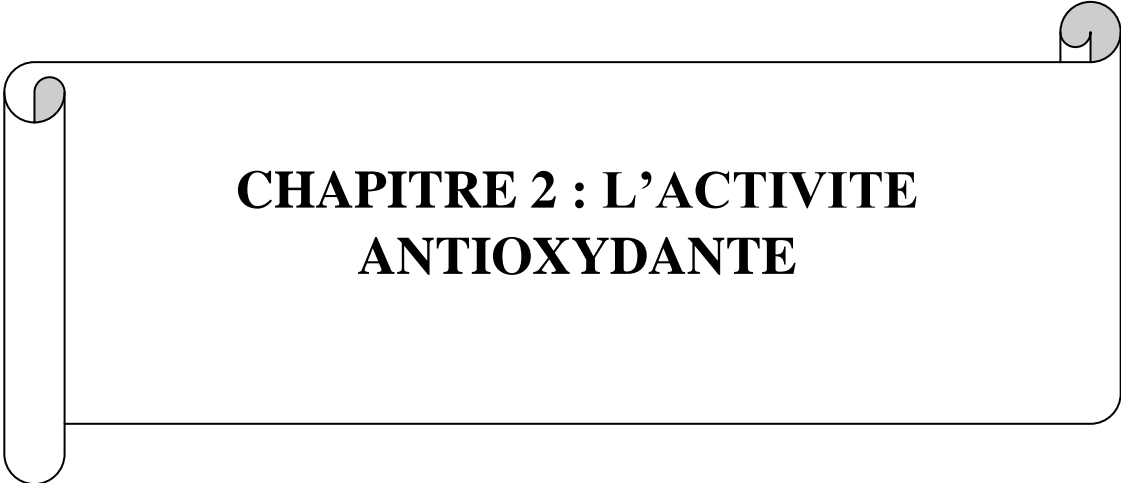
### **1.2. b Rôle des AVK**

Les AVK bloquent le cycle de la vitamine K indispensable à la formation de ponts calciques lors de la génération de thrombine (protéine de la coagulation sanguine) et sa régulation.

Pour jouer son rôle, la vitamine K doit être sous forme réduite, alors que la vitamine K naturelle d'origine alimentaire est oxydée. Les AVK empêchent la réduction de la vitamine K en inhibant l'activité de deux enzymes impliquées dans ce mécanisme.[21]

Le suivi de l'anticoagulation par des cliniques spécialisées, qu'elles soient constituées par des hématologues, des pharmaciens cliniciens, des infirmiers ou des médecins spécialisés dans l'anticoagulation, tend à améliorer la qualité et la sécurité des patients traités par des anticoagulants oraux.

---



**CHAPITRE 2 : L'ACTIVITE  
ANTIOXYDANTE**

## Chapitre 2 L'activité antioxydante

### 2.1 Introduction

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) et les espèces réactives d'azote (RNS) sont les sous-produits du processus redox cellulaire et sont bien documentées pour jouer un double rôle en tant qu'espèces délétères et bénéfiques. La surproduction de ces espèces entraîne un stress oxydatif, état dans lequel le système biologique est incapable de maintenir l'équilibre oxydant-antioxydant [22]. Le stress oxydatif est un important médiateur des dommages aux structures cellulaires, y compris les lipides et les membranes, les protéines et l'ADN et participe au vieillissement prématuré et aux principales maladies, y compris le cancer, la maladie d'Alzheimer, l'autisme, l'infection au VIH et l'AVC [23]. Dans un état physiologique normal, la génération d'espèces réactives est étroitement régulée par différents antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

Ces radicaux sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles à l'organisme à dose raisonnable e.g. lorsque la balance antioxydant/prooxydant est en équilibre. Les radicaux libres sont utiles à l'organisme car ils détruisent les bactéries au sein des cellules phagocytaires mais ils peuvent interagir avec les matériaux biologiques en changeant la structure et donc la fonction et le rôle de ces derniers.

Les radicaux libres constituent aussi un système de transmission de signaux. Ils peuvent être considérés comme des messagers intra et inter cellulaire. ils permettent ainsi d'induire la réponse cellulaire à de nombreux stress : thermiques, U.V, xénobiotiques, permettant l'expression de gènes de défense [24].

**Tableau N3** : les ROS, RNS et les espèces radicalaires non libres

ROS/RNS	Espèces radicalaires non libres
HO <sup>·</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
HOO <sup>·</sup>	O <sub>3</sub>
L <sup>·</sup>	LOOH
LOO <sup>·</sup>	HOCl
ROO <sup>·</sup>	ONOO <sup>-</sup>
LO <sup>·</sup>	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
NO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	HNO <sub>2</sub>
NO <sup>·</sup>	NO <sub>2</sub> Cl
NO <sup>+</sup>	NO <sup>-</sup>
RS <sup>·</sup>	ONOOH
P <sup>·</sup>	N <sub>2</sub> O

---

## **2.2 Antioxydants**

Un antioxydant est une molécule qui peut piéger les espèces radicalaires avant d'atteindre leurs cibles biologiques d'où leur fonction de protecteur chimique et donc un bon antioxydant est un bon capteur de radicaux libres.

Les antioxydants jouent un rôle vital dans les systèmes alimentaires ainsi que dans le corps humain pour réduire les processus oxydatifs et les effets nocifs de ROS en donnant un atome d'hydrogène ou un électron pour chélater les métaux actifs redox et inhiber les lipoxygénases [25].

Dans les systèmes alimentaires, la peroxydation lipidique et la formation de produit de peroxydation lipidique secondaire peuvent être évitée par l'utilisation de molécules antioxydantes nutritionnelles aidant ainsi à maintenir la saveur, la couleur et la texture du produit alimentaire pendant le stockage[26].

### **2.2.a Antioxydants synthétiques**

Les antioxydants synthétiques ont été développés pour être un système standard de mesure de l'activité antioxydante comparant avec les antioxydants naturels et pour être incorporés dans les aliments.

Ils sont ajoutés à la nourriture afin qu'il puisse résister à divers traitements et conditions ainsi que pour prolonger la durée de conservation.

Presque tous les produits alimentaires transformés contiennent des antioxydants synthétiques qui sont jugés bons, bien que certaines études indiquent le contraire[27]. Ces antioxydants synthétiques sont ajoutés aux produits pour prévenir ou retarder l'apparition de l'oxydation des lipides pendant le traitement et l'entreposage des graisses, des huiles et des aliments contenant des lipides.

**Tableau N4 : Structure Chimique et applications des importants antioxydants synthétiques.**

<b>Antioxydant synthétique</b>	<b>Applications</b>	<b>Référence</b>
BHA (butylated hydroxyanisole)	antioxydants alimentaires	Branen (1975)[28]
BHT (butylated hydroxytoluene)		Botterweck et al. (2000) [29] Aguillar et al. (2011) Aguillar et al. (2012)
TBHQ (tert-butylhydroquinone)	antioxydants alimentaires	Gharavi and El-Kadi (2005)[30]
PG (propyl gallate)	antioxydants alimentaires	Anton et al. (2004) Soares et al. (2003)[31]
OG (octyl gallate) 2,4,5-Trihydroxy butyrophénone	Antioxydants alimentaires et cosmétiques	Kubo et al. (2001)[32]
2,4,5-Trihydroxy butyrophénone		Astill et al. (1959)[33]
NDGA (nordihydroguaiarétique acid)	antioxydants alimentaires	Evan and Gardner (1979)[34]
4-Hexylresorcinol	Prévention du brunissement des aliments	Chen et al. (2004)[35]

---

## **2.2.b Antioxydants naturels**

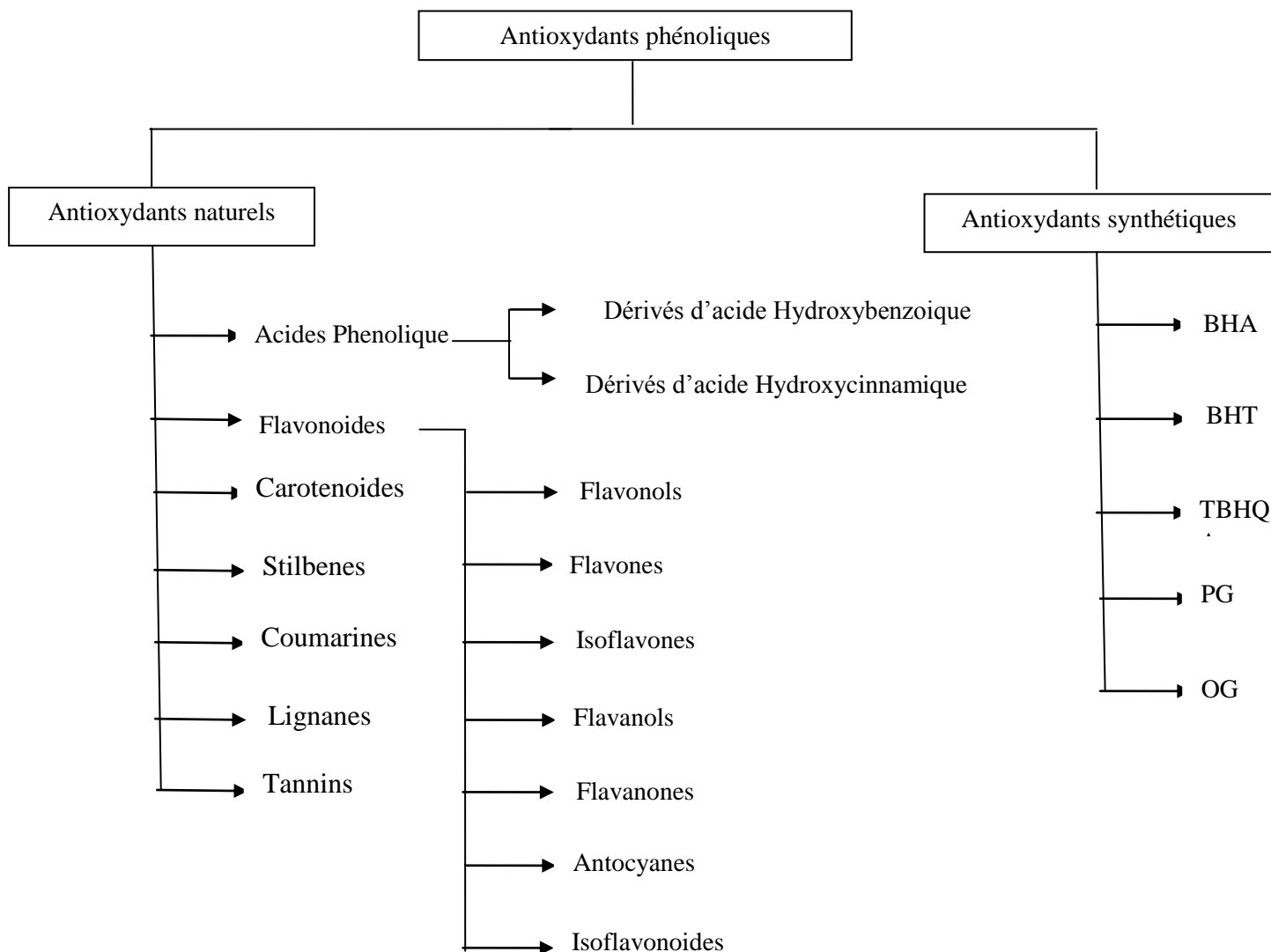
Les principales sources d'antioxydants naturels sont les composés phénoliques existants dans les plantes. Ces composés peuvent se trouver dans toutes les parties des plantes [36] (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

L'alimentation humaine contient un éventail de composés différents qui possèdent des activités antioxydantes ou qui ont été suggérées pour récupérer les ROS en fonction de leurs propriétés structurelles. Les principaux représentants des antioxydants alimentaires sont la vitamine C, les tocophérols, les caroténoïdes et les flavonoïdes. Mis à part la vitamine C, chaque groupe de ces antioxydants se compose d'un certain nombre de composés structurellement différents, par exemple, plus de 600 caroténoïdes différents ont été identifiés. À ce jour, une cinquantaine d'entre elles pourraient se trouver dans l'alimentation humaine [36]. Dans l'alimentation, il peut y avoir des effets synergiques de ces divers composés alimentaires, qui sont difficiles à évaluer à l'heure actuelle.

En effet, le régime alimentaire peut être considéré comme un orchestre où les interactions entre les constituants peuvent produire des effets qui ne sont pas les propriétés nécessaires des constituants individuels [37].

La classification des antioxydants phénoliques est représentée sur la figure suivant :





**Figure 3** : Classification des antioxydants phénoliques

## 2-4 Méthodes de mesure de l'activité antioxydante

Différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ont été introduites pour mesurer et étudier les propriétés antioxydantes et la capacité des antioxydants commerciaux, des aliments, des médicaments, des produits pharmaceutiques et des échantillons biologiques. Le concept de capacité antioxydante est d'abord issu de la chimie et a ensuite été adapté à la biologie, à la médecine, à l'épidémiologie et à la nutrition [53].

L'activité antioxydante ne devrait pas être conclue à partir d'un seul test. Plusieurs procédures *in vitro* devraient être effectuées pour évaluer les activités antioxydantes des échantillons d'intérêt [53]. Ces méthodes peuvent être divisées en fonction des mécanismes de réaction en

---

méthodes de transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et de transfert d'électron unique (SET), le produit final est le même pour les deux mécanismes, mais la cinétique et le potentiel de la réaction sont différents. Les méthodes basées sur SET [54] détectent la capacité d'un antioxydant potentiel à transférer un électron pour réduire tout composé, y compris les métaux, les carbonyles et les radicaux. SET affiché par un changement de couleur à mesure que l'oxydant est réduit. Les méthodes basées sur le mécanisme HAT mesurent la capacité classique d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par don d'hydrogène[55]. Les réactions HAT sont indépendantes du solvant et du pH et sont généralement assez rapides, complétées en quelques secondes ou quelques minutes.

Les méthodes basées sur le mécanisme HAT sont les suivantes:

- Oxygen radical absorbance capacity (ORAC).
- Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP).
- Total radical scavenging capacity assay (TOSCA).
- B-Carotène bleaching assays.
- Chemiluminescent assay.

Les méthodes basées sur le mécanisme SET mesurent la capacité d'un antioxydant potentiel. Ces méthodes transfèrent un électron pour réduire tout composé, y compris les ions métalliques, les carbonyles et les radicaux [56]. Ils comprennent les essais suivants:

- Total phenolics assay by Folin–Ciocalteu reagent assay.
- Trolox equivalence antioxidant capacity assay (TEAC).
- Ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP).
- Total antioxidant potential assay, using a  $\text{Cu}^{2+}$ -complex as an oxidant.
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH·)

## **2-5 Test DPPH**

Le test DPPH est basé sur la réduction de DPPH (radical stable) dans une solution alcoolique en présence d'un antioxydant et la formation de la forme non radicalaire DPPH-H. Ce test mesure la capacité de réduction de DPPH par les antioxydants qui peut être évaluée en mesurant la diminution de son absorbance. Le test est simple et pratique et ne nécessite pas de traitement d'échantillon, néanmoins, il est limité car il utilise un radical non-physiologique et sa sensibilité peut être influencée par un certain nombre de facteurs, comme le type et la quantité de solvant utilisé. De plus, certains composés absorbent dans la même gamme de





**CHAPITRE 3**  
**METHODES DE CALCUL**  
**THEORIQUE ET MODELISATION DE**  
**L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE**

### 3.1. Introduction

Les développements théoriques ont permis de faire de la physique quantique appliquée à la chimie un outil indispensable associé à la chimie expérimentale.

Au cours des années de développement de la chimie quantique deux voies se sont dégagées ; l'une aborde les problèmes en décrivant les systèmes par une fonction d'onde, l'autre le fait par le biais de sa densité électronique.

Les méthodes de chimie quantique permettent le calcul de la structure électronique de systèmes tels que les atomes, les molécules neutres, les espèces radicalaires, les ions, les clusters d'atomes, les surfaces de solides, etc. Des algorithmes de calculs très précis sont utilisés pour minimiser l'énergie totale en fonction des paramètres structuraux et pour prédire la structure la plus stable des composés étudiés. Les fonctions d'onde ainsi obtenues permettent de calculer des propriétés électriques et magnétiques, de même qu'elles conduisent à l'obtention d'indices de réactivité et d'autres caractéristiques encore. Ces méthodes permettent donc aussi bien l'interprétation de résultats expérimentaux, que la prédiction de propriétés pour lesquelles aucune expérience n'a pu encore fournir d'informations.

### 3.2 Modèles théoriques

#### 3.2.a Equation de Schrodinger

L'étude théorique de tout système électronique consiste en l'utilisation de méthodes basées sur la résolution de l'équation de Schrödinger [38], indépendante du temps. En résolvant l'équation aux valeurs propres et aux vecteurs propres :

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (1)$$

Où  $\hat{H}$  est l'opérateur hamiltonien associé à l'énergie totale du système étudié,  $E$  l'énergie totale du système et  $\Psi$  la fonction d'onde recherchée, il sera alors possible de déterminer toutes les informations du système étudié.

Des solutions  $\psi_i$  physiquement acceptables existent seulement pour certaines valeurs de  $E$  [39]. Ainsi, l'interprétation de la fonction d'onde implique la quantification de l'énergie.

L'interprétation de  $\psi_i$  est basée sur la suggestion faite par Born. Ce dernier utilise une analogie avec la théorie ondulatoire de la lumière, dans laquelle le carré de l'amplitude d'une onde électromagnétique est interprété comme son intensité et ainsi, en terme quantique, comme le nombre de photons présents.

L'interprétation de Born, sur l'équation de Schrödinger, est que le carré de la fonction d'onde d'une particule (ou l'intégrale de  $\psi^* \psi$ , si  $\psi$  est complexe sur tout l'espace) est proportionnel à la probabilité de trouver cette particule en chaque point de l'espace.

### **3.2.b Les méthodes Hartree-Fock (HF)**

La méthode SCF proposée en 1927 par D. Hartree [40] est un des meilleurs procédés de la résolution des problèmes de la chimie quantique. Elle a été appliquée aux atomes polyélectroniques puis a été rapidement étendu aux systèmes polyatomiques. Cette méthode repose sur un principe simple qui stipule que l'interaction électrostatique du type  $\frac{1}{r_{ij}}$  d'un électron  $i$  donné d'un atome polyélectronique avec tous les électrons  $j$  est remplacée par l'interaction de cet électron avec un champ moyen ou effectif  $V_{\text{eff}}(i)$  créé par le noyau et la totalité des électrons  $j$ .

La minimisation de l'énergie est effectuée par la méthode SCF (Self Consistent Field) à l'aide des équations de Hartree-Fock mono-électroniques obtenues sous la condition d'énergie minimale, tout en respectant la contrainte d'orthonormalité des orbitales.

La méthode de Hartree-Fock (HF) est donc l'application du principe variationnel à la minimisation de l'énergie avec utilisation de fonctions d'onde construites sur la base d'un déterminant de Slater. Les équations HF peuvent donc être considérées comme étant des équations de Schrödinger décrivant un électron se déplaçant dans un potentiel moyen créé par les noyaux et les autres électrons restant. Les valeurs propres seront les énergies mono-électroniques associées aux fonctions d'ondes qui correspondent dans ce cas à des orbitales. Cependant, ces équations ne sont pas réellement de type valeurs propres / vecteurs propres car les fonctions sont développées sur une base de dimension finie.

La méthode proposée par Roothaan et Hall en 1951[41] basée sur l'approximation LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) de Mulliken développe les orbitales moléculaires en termes de combinaisons linéaires d'orbitales atomiques. Les orbitales

atomiques utilisées pour l'expansion des orbitales moléculaires constituent les *fonctions de base* (Basis Set) choisies pour la description du système. Plus le set de fonctions choisi est grand, plus les orbitales moléculaires se rapprocheront de celles qui seraient obtenues si les équations de HF étaient résolues rigoureusement, ce qui est connu comme étant la *limite Hartree-Fock*.

Les méthodes de chimie quantique peuvent être classées sur la base du traitement des intégrales de répulsion interélectronique : méthodes dites « ab initio » (c'est-à-dire basées sur les premiers principes, non empiriques), et méthodes semi-empiriques. Dans les méthodes ab initio les intégrales sont évaluées rigoureusement et tous les électrons sont, en principe, pris en compte (voir plus loin). Dans la seconde catégorie de méthodes, une grande partie de ces intégrales est négligée, simplifiée ou approchée en corrélant les résultats à des données expérimentales. De plus, certains des électrons ne sont pas explicitement pris en considération et généralement seuls les électrons de valence, ou même les électrons  $\pi$  (méthodes de Hückel), sont impliqués dans ce type de calculs.

Une seconde classification possible se fonde sur le traitement de la corrélation électronique. La méthode HF non corrélée peut être améliorée par des traitements appelés *post-Hartree Fock*. De plus, une alternative de choix pour l'ajout de la corrélation électronique est l'utilisation de méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité.

### **3.2.c La méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)**

La théorie de la fonctionnelle de la densité (ou DFT pour Density Functional Theory) est une méthode, désormais très utilisée, qui constitue une alternative efficace aux méthodes basées sur l'approximation Hartree-Fock et la description des fonctions d'onde à l'aide de configurations. Elle s'appuie sur l'idée que l'énergie d'un système électronique  $E$ , quel qu'il soit, peut s'exprimer à l'aide de la seule densité électronique  $\rho(r)$ . On dit alors que l'énergie électronique  $E$  est une fonctionnelle de cette densité  $\rho$ .

Ce concept a été à l'origine de divers modèles, notamment celui de Thomas-Fermi [21,22]

Kohn et Sham en 1965[42] qui ont étendu à la densité le principe variationnel. D'autre part, ils posent qu'à tout système réel on peut toujours faire correspondre un système fictif d'électrons indépendants de même densité électronique  $\rho(r)$ . Dans ce cas, l'énergie

électronique exacte d'une molécule de  $n$  électrons dans son état fondamental est donnée par la relation:

$$E = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \varphi_i(1) | \Delta_1 | \varphi_i(1) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{Z_{\alpha} \rho(1)}{r_{1\alpha}} dv_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(1)\rho(2)}{r_{12}} dv_1 dv_2 + E_{xc}[\rho]$$

Le premier terme de cette expression correspond à l'énergie cinétique des électrons ; le deuxième à l'attraction entre les noyaux et les électrons ; le troisième traduit l'interaction coulombienne entre les charges et le dernier est une fonctionnelle de la densité et est appelé l'énergie d'échange-corrélation. Ce terme regroupe l'ensemble des interactions non classiques entre les électrons, et c'est bien sur lui qui reste mal connu et qui doit être approché. Les  $\varphi_i$  sont les orbitales Kohn-Sham. La densité électronique exacte peut être déterminée à partir des  $\varphi_i$

$$\rho(r) = \sum_i^{occ} n_i |\varphi_i(r)|^2$$

L'énergie d'échange-corrélation rassemble les contributions liées aux effets d'échange et de corrélation. Le problème se ramène à trouver une expression approchée pour les évaluer à partir de la densité  $\rho$ . Les recherches sur la formulation des termes d'échange  $E_x[\rho]$  et de corrélation  $E_c[\rho]$  ont engendré plusieurs méthodes que l'on peut classer :

Les méthodes locales issues de l'approximation LDA (Local Density Approximation).

Les méthodes non-locales issues de l'approximation GGA (Generalized Gradient Approximation). Parmi les plus connues et les plus utilisées on peut citer les fonctionnelles d'échange de Becke (B88) [43] et de Perdew et Wang (PW91) [44]. Pour la corrélation, on dispose, entre autres, des fonctionnelles de Perdew (P86) [45], de Lee, Yang et Parr (LYP) [46] et de Perdew et Wang (PW91). Toutes ces fonctionnelles permettent une amélioration de l'estimation des énergies de liaison dans les molécules, ainsi que des barrières d'énergie par rapport à l'approximation locale LDA.

Les méthodes hybrides qui sont des méthodes non-locales pour lesquelles une partie de l'échange de Slater est substitué par le terme d'échange exact Hartree-Fock (par exemple les méthodes BH&HLYP, B3LYP, B3PW91). La première fonctionnelle de ce type a été proposée par Becke, et contient 50 % d'échange HF ; c'est la fonctionnelle « half and half » [47]. Elle présentait l'inconvénient de contenir une trop forte proportion d'échange HF, et la



fonctionnelle de ce type actuellement la plus utilisée est celle connue sous l'acronyme B3LYP[48]. Celle-ci est une fonctionnelle à trois paramètres combinant les fonctionnelles d'échange local, d'échange de Becke et d'échange HF, avec les fonctionnelles de corrélation locale et corrigée du gradient de Lee, Yang et Parr.

### 3.2.d La méthode DFT Unrestricted

A l'instar de la méthodologie Hartree-Fock, il est possible de différencier les orbitales  $\alpha$  des orbitales  $\beta$ , et donc d'employer une méthode de type unrestricted DFT (UDFT). Ce formalisme permet alors les phénomènes de rupture de symétrie évoqués utile pour la description des ruptures de liaison. Les résultats UDFT ne diffèrent pas de ceux obtenus par la DFT pour les espèces à couches fermées, bien entendu, mais des énergies plus basses peuvent être obtenues dans certains cas, par exemple lorsqu'il est question des biradicaux singulets. Il est donc préférable d'utiliser l'UDFT de manière générale [49]

### 3.2.e Les bases de fonctions

Les traitements mathématiques induits par la résolution de l'équation de Schrödinger électronique nécessitent par commodité de développer les orbitales  $\phi_i$  sur une base de fonctions choisies et fixées  $\chi_p$ . Dans un cas général, pour représenter une fonction des trois coordonnées de l'électron, on devrait normalement utiliser un très grand nombre de termes dans le développement afin que la fonction  $\phi_i$  soit correctement décrite. C'est uniquement parce que l'on suppose à l'avance que l'orbitale  $\phi_i$  ne prendra des valeurs importantes qu'au voisinage des atomes ou entre les atomes sur les liaisons chimiques que l'on peut espérer utiliser un nombre beaucoup plus restreint de fonctions de base. A condition toutefois de choisir pour base des fonctions  $\chi_p$  appropriées. On utilise en général des fonctions décrivant les orbitales des différents atomes de la molécule.

Les fonctions de Slater (STO) qui sont dérivées des solutions exactes pour l'atome d'hydrogène ont été le premier type de fonctions utilisées couramment pour les calculs moléculaires. Cependant celles-ci ne sont pas appropriées pour un calcul rapide des intégrales bi-centriques, on leur préférera les fonctions gaussiennes (GTF):

$$\chi_p(X, Y, Z) = \sum_K a_K G_K(X, Y, Z)$$

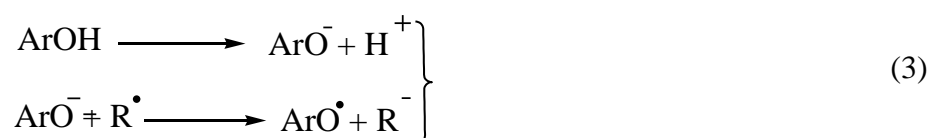
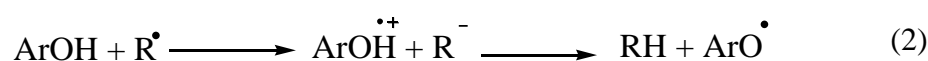
Le choix le plus simple consiste à prendre une contraction pour décrire chaque orbitale atomique. On utilise deux ou trois contractions pour chaque orbitale atomique. Cela permet à la fonction  $\phi_i$  de s'adapter au mieux en se contractant ou en se gonflant du fait de la meilleure flexibilité de la partie radiale de la base. Une série de bases dites "split valence" ont été développées, les orbitales de valence sont dans ce cas décrites par plus de contractions que les orbitales de coeur, elles ont donc plus de poids dans les calculs de structure électronique.

Les bases présentées ci-dessus peuvent également être augmentées, et c'est souvent le cas, avec des fonctions de polarisation ou diffuses. Les fonctions de polarisation correspondent à des fonctions primitives dont le moment angulaire est plus grand que le maximum correspondant aux orbitales occupées de l'atome (par exemple des orbitales p pour H, des orbitales d pour C ...). Elles conduisent à une meilleure répartition des charges et sont nécessaires en particulier pour traiter la corrélation électronique. Les fonctions diffuses sont quant à elles indispensables pour décrire les liaisons faibles et dans les calculs d'affinité électronique. Elles privilégient les situations où le nuage électronique est étendu: ce sont des gaussiennes ayant un faible exposant et donc faiblement décroissantes avec la distance r. On attire l'attention sur le fait que l'addition de fonctions de polarisation ou diffuses augmente sensiblement les temps de calcul.

Les difficultés liées à la détermination de la fonctionnelle exacte  $E_{xc}[\rho]$  dans la DFT sont comparables à celles à la résolution exacte de l'équation de Schrödinger. Le succès grandissant des méthodes DFT tient d'une part au volume des calculs qu'elles demandent, beaucoup plus réduit que dans les méthodes ab initio, ce qui les rend précieuses pour l'étude de systèmes comportant un grand nombre d'électrons. Elles présentent d'autre part l'avantage de prendre en compte, les effets de la corrélation électronique.

### 3.3 Mécanismes d'action des antioxydants

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. un antioxydant peut réagir avec un oxydant par les 3 mécanismes suivants [3] :



Dans le premier mécanisme (1) appelé mécanisme HAT, l'antioxydant cède son proton à l'oxydant et la réaction est gérée par la BDE (bond dissociation enthalpy).

La BDE est calculée par la formule suivante :

$$\text{BDE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{ArOH})$$

Avec :  $\Delta H(\text{ArO}^\bullet)$  enthalpie du radical  $\text{ArO}^\bullet$ ,  $\Delta H(\text{H}^\bullet)$  enthalpie du radical  $\text{H}^\bullet$  et  $\text{H}(\text{ArOH})$  enthalpie de la molécule neutre (antioxydant).

Plus la BDE est faible plus le caractère donneur d'hydrogène de l'antioxydant est fort, plus l'activité antioxydante est meilleure.

Dans le deuxième mécanisme (SET-PT)(2), l'antioxydant cède un électron à l'oxydant suivie d'un proton et est géré par les descripteurs IP et PDE.

IP et PDE sont calculés par les formules suivantes :

$$\text{IP} = H(\text{ArOH}^{\bullet+}) + H(e^-) - H(\text{ArOH})$$

$$\text{PDE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}^{\bullet+})$$

Avec  $\Delta H(\text{H}^+)$  enthalpie du proton  $\text{H}^+$ ,  $\Delta H(\text{ArOH}^{\bullet+})$  enthalpie du radical cation  $\text{ArOH}^{\bullet+}$  et  $\Delta H(e^-)$  enthalpie de l'électron.

Des valeurs faibles d'IP et de PDE signifient une meilleure activité antioxydante.

Dans le troisième mécanisme (SPLET)(3), l'antioxydant libère son H en premier lieu ensuite un électron en faveur de l'oxydant. Ce mécanisme est géré par les deux descripteurs PA et ETE calculés par les formules suivantes :

$$\text{PA} = H(\text{ArO}^\ominus) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH})$$

$$\text{ETE} = H(\text{ArO}^\bullet) + H(e^-) - H(\text{ArO}^\ominus)$$

Avec  $\Delta H(\text{R}^\ominus)$  enthalpie de l'anion  $\text{R}^\ominus$ .

Les valeurs faibles de PA et ETE montrent une meilleure activité antioxydante.

### 3.4. Méthodologie des calculs théoriques

Les descripteurs théoriques de l'activité antioxydante ont été déterminés au niveau B3LYP/6-311++G(d,p) afin de relier le pouvoir antioxydant aux propriétés énergétiques et structurales de la molécule. Les calculs ont été effectués en phase gazeuse et sur les conformations les plus stables des composés étudiés.

Nous avons réalisés nos calculs au niveau du laboratoire de la recherche et des programmes avancés en utilisant le Gaussian 09. Les molécules neutres, ont été optimisées par les deux

méthodes PM6 et DFT (B3LYP/6-311++G (d,p)) [50] et les structures ont été visualisés avec GaussView5.0.

Le formalisme UHF a été utilisé pour les radicaux et les radicaux cations, de plus, chaque état stationnaire a été caractérisé comme un vrai minimum sur la surface d'énergie potentielle par un calcul de fréquence.

L'enthalpie du proton  $H^+$ , du radical  $H\cdot$  et celle de l'électron étant prises des références [51] et valent respectivement: 0.0024 Ha, -0.499 Ha et 0.0012 Ha [52].



**PARTIE EXPERIMENTALE**



**CHAPITRE 1**  
**MATERIELS ET METHODES**

Dans la partie expérimentale de notre travail, nous avons essayé d'évaluer l'activité antioxydante de l'acénocoumarol et le noyau coumarine en utilisant le test DPPH à fin de comparer les résultats expérimentaux avec les données théoriques. Les antioxydants de références utilisés sont le BHT, le BHA et la vitamine C.

### 1.1 Appareillage et produits chimiques :

- Le suivie de l'absorbance dans le domaine UV-visible des produits étudiées est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible.
- L'ensemble des réactifs chimique utilisés au cours de notre expérimentation est présenté dans le tableau ci-dessous :

**Tableau N5:** Familles et nomenclatures des réactifs chimiques utilisés

Famille	Réactifs Chimiques	Nomenclateurs
Coumarines	Coumarine	1-benzopyrane-2-one
	Acénocoumarol	(RS)-4-hydroxy-3-2H-chromèn-2-one
Antioxydants de référence	BHT	2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol
	BHA	2-tert-Butyl-4-hydroxyanisole and 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (mixture)
	VIT C	(5R)-5-((11S)-1,2-dihydroxyéthyl)-3,4-dihydroxy-5-hydrofuran-2-one
Solvant	Ethanol	Ethanol
	DMSO	Dimethyl sulfoxide
Radical libre	DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

## 1.2 Méthodes :

### Méthode du piégeage du radical libre DPPH :

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différents composés, nous avons opté pour la méthode du piégeage du radical libre DPPH (1,1 Diphényl-2 picrylhydrazil).



**Figure 5:** La dégradation de la coloration violette du mélange DPPH-vitamine C dans l'éthanol.

### Mode opératoire :

La mesure de l'activité anti-radicalaire a été testée selon la méthode de Bois [58].

Une solution de radical DPPH a été préparée en dissolvant 4 mg de DPPH dans 100 ml de l'éthanol sous agitation pour s'assurer que la concentration de cette solution on réalise un test en prenant 1ml de solution de DPPH avec 1ml d'éthanol la lecture de l'absorbance de ce mélange à 517 nm devrait donner une absorbance de 0.57.

Des solutions mères des coumarines ont été préparées. Le choix de la concentration de ces solutions est basé sur les tests préliminaires des solutions qui donnent un intervalle d'activité de 5 à 90 %. Ce qui nous permettra de déduire la valeur d'EC<sub>50</sub>. La même méthode est utilisée pour les composés de références (BHT, BHA et Vit C). Ainsi, les concentrations des solutions mères utilisées sont données dans le tableau suivant :



**Tableau N6:** Masse molaires, masses, volumes et concentration des solutions mères des Composés testés.

Composé testé	MM (g/moles)	Masses et volumes utilisés	Concentration mol/l
BHA	180,27	4 ,5 mg dans 5ml	0,005 mol /l
BHT	220	5,5 mg dans 5ml	0,005 mol /l
VIT C	176 ,12	4 ,4 mg dans 5ml	0,005 mol /l
Coumarine	146,14	3,6 mg dans 5ml	0,005 mol /l
Acénocomarol	353, 326	1,6 g de deux comprimés qui contient chacun 4 mg d'acénocoumarol dans 5 ml	0,005 mol /l

Les solutions filles sont préparées en prélevant différents volumes des solutions mères que nous introduisons dans des tubes à essai secs et stériles. Ces solutions sont ajustées à 1ml avec l'éthanol. A la fin, 1 ml de la solution de DPPH est rajouté à tous les tubes.

L'ensemble du système est mis ensuite sous agitation, puis les tubes ont été maintenus dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min.

L'absorbance en UV-Visible à  $\lambda_{\max} = 517$  nm est mesurée. Trois analyses ont été effectuées pour chaque solution testée. L'activité antioxydant (AA) a été calculée à partir de l'équation suivante :

$$AA \% = [(ABS_{\text{control}} - ABS_{\text{échantillon}}) / ABS_{\text{control}}] * 100$$

Soit :

**ABS<sub>control</sub>** : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution de DPPH dans l'éthanol.

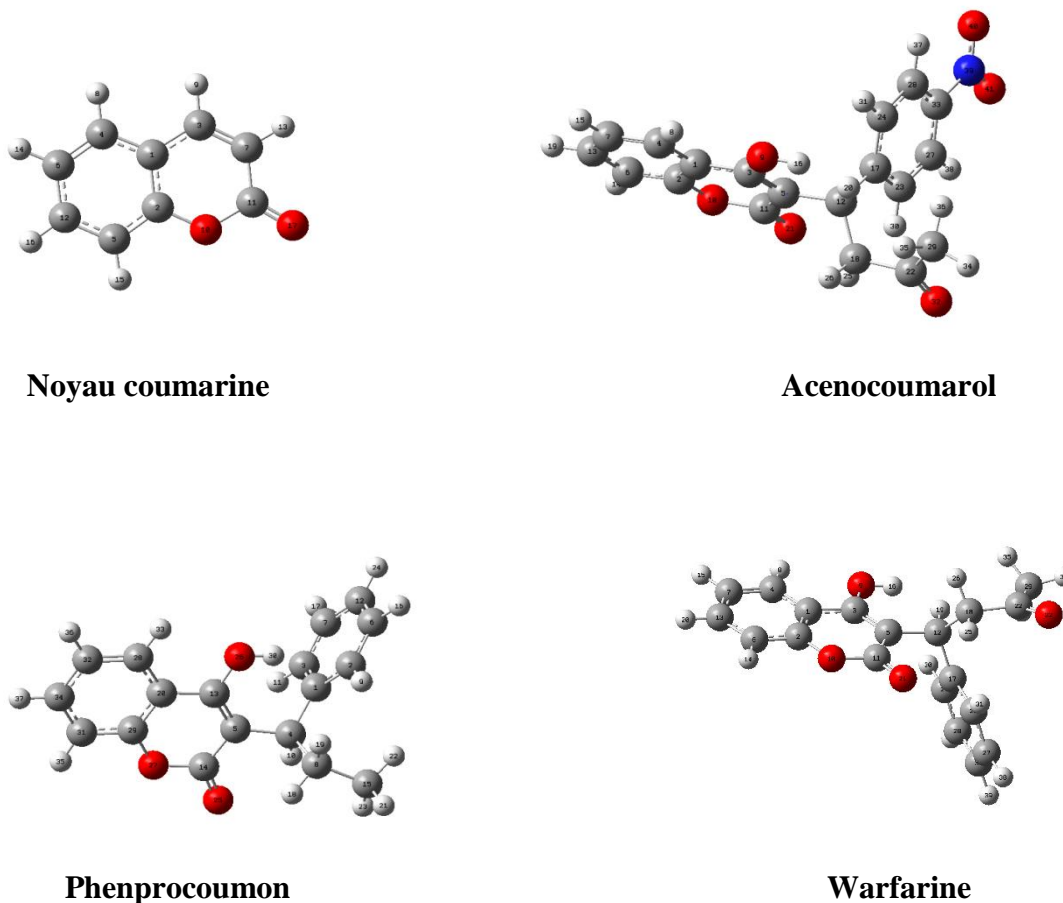
**ABS<sub>échantillon</sub>** : absorbance à 517 nm de chaque échantillon dans l'éthanol.



**CHAPITRE 2**  
**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## 2. 1 Analyse des résultats de calcul théorique

La géométrie des molécules optimisées est donnée dans la figure 6 suivante :



**Figure 6** : Géométrie des AVK et du noyau coumarine

L'optimisation des trois AVK montre une géométrie complètement plane du noyau coumarine.

Le noyau benzénique fait un angle dièdre de  $-114.674^\circ$  avec le noyau coumarine dans l'acenocoumarol et  $-41.427^\circ$  dans le phenprocoumon et  $-109.715^\circ$  dans la warfarine.

Le groupement propanone fait un angle dièdre de  $115^\circ$  avec le noyau coumarine dans l'acenocoumarol et  $120^\circ$  dans la warfarine.

Dans le phenprocoumon, le groupement éthyle fait un angle dièdre de  $90^\circ$  avec le noyau coumarine.

Les orbitales de frontière (HOMO et LUMO) sont les principaux participants dans les transitions électroniques, et leur écart d'énergie représente la réactivité [59]. L'analyse des

orbitales frontières permet d'expliquer la réactivité et les transitions électroniques au sein des molécules.

L'analyse du tableau 5 montre que l'acenocoumarol est la molécule la plus polaire, il possède le gap d'énergie le plus faible et la LUMO la plus basse en énergie ce qui lui confère le caractère le plus réactif et le plus électrophile des AVK.

**Tableau N7:**  $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ ,  $\mu$  et Gap d'énergie de coumarine et des AVK

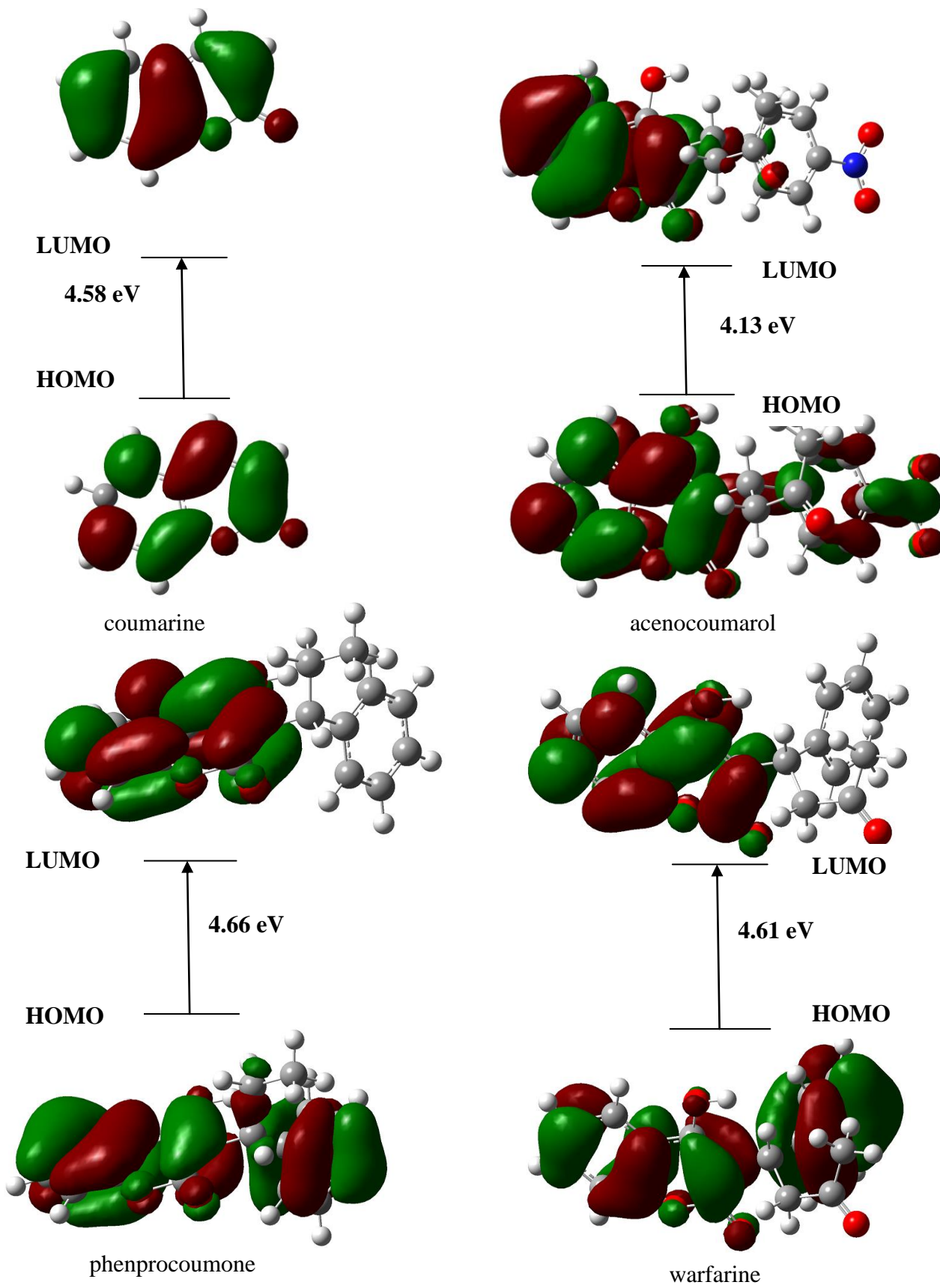
	Coumarine	Acenocoumarol	Phenprocoumone	Warfarine
$E_{\text{HOMO}}$ (eV)	-6.89	-7.02	-6.49	-6.71
$E_{\text{LUMO}}$ (eV)	-2.31	-2.89	-1.83	-2.10
$\mu$ (Debye)	5.17	9.65	4.17	6.26
Gap d'énergie (eV)	4.58	4.13	4.66	4.61

Par contre, le phenprocoumone possède la HOMO la plus haute en énergie ce qui lui confère le caractère nucléophile le plus important.

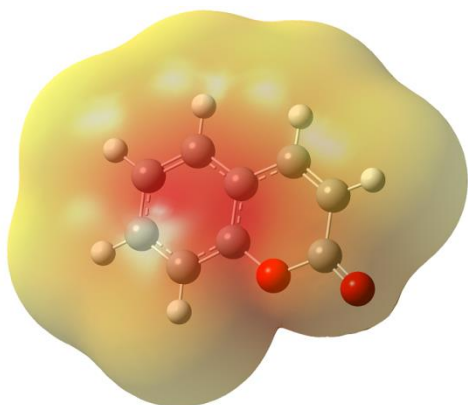
Les régions ESP positives (couleur bleue) sont les sites privilégiés d'attaque nucléophile, tandis que les sites ESP négatifs (couleur rouge) sont les sites privilégiés de l'attaque électrophile [60]. Les régions de couleur verte montrent la partie neutre.

Pour toutes les AVK, les régions sur les groupements carbonyles électronégatifs ont des valeurs ESP négatives (couleur rouge), le reste des régions est jaune (zone négative) et il n'y a pas de zone à des potentiels positifs (couleur bleue) ni des zones à potentiel neutre (couleur verte). Cela permet de conclure que l'ensemble de la molécule dans les AVK est un site privilégié d'attaque électrophile.

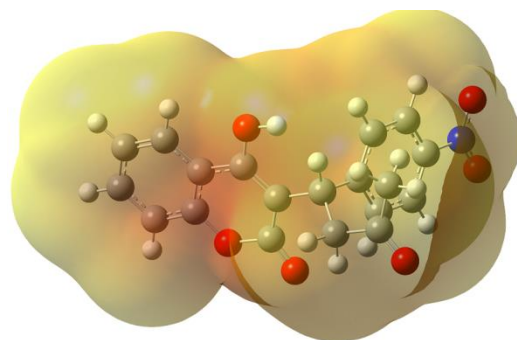
Dans ce cas les AVK sont des nucléophiles réagissant essentiellement avec la HOMO dont le nuage est délocalisé sur l'ensemble de la molécule (figure 5). Par contre la LUMO est localisée sur le noyau coumarine seulement (figure 5).



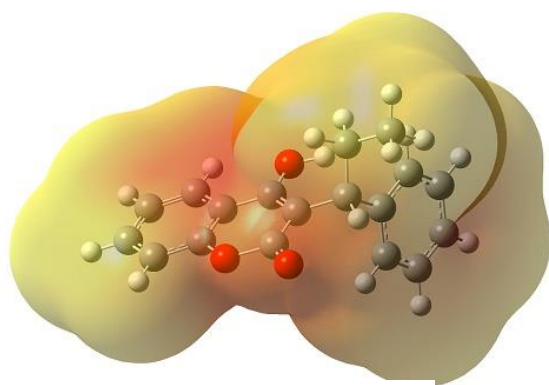
**Figure 7 :** Les orbitales HOMO, LUMO et le GAP de coumarine, acenocoumarol, phenprocoumone et warfarine



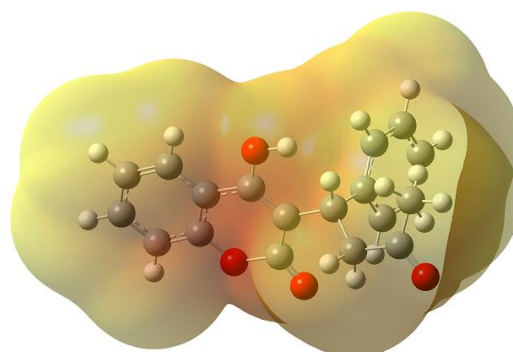
coumarine



acenocoumarol



phenprocoumone



warfarine

**Figure 8** : surfaces du potentiel électrostatique de coumarine et des AVK

Les résultats de calcul des descripteurs BDE, IP, PDE, PA et ETE des AVK sont rassemblés dans le tableau N8 suivant :

**Tableau N8** : les valeurs de BDE, IP, PDE, PA et ETE en Kcal /Mol

Composés	BDE	IP	PDE	PA	ETE	IP+PDE	PA+ETE
Coumarine	109.54	198.19	227.17	375.26	50.05	425.36	425.31
Acénocoumarol	100.84	213.17	203.48	325.10	91.56	416.66	416.66
Phenprocoumon	82.62	181.36	217.08	320.74	77.70	398.44	398.44
Warfarine	78.93	183.86	210.89	321.07	82.68	394.75	394.75
2-BHA	77.37	165.13	228.06	354.50	38.68	393.18	393.18
3-BHA	72.88	164.23	224.46	347.87	40.82	388.70	388.70
BHT	78.73	165.91	228.64	350.74	43.81	394.55	394.55

Les résultats donnés dans le tableau N8 montrent que :

- Pour la coumarine qui ne possède pas de liaison OH les BDE de C-H sont très élevées (109.54 Kcal/mol). Le noyau coumarine ne possède pas une activité antioxydante.

Les AVK possédant des liaisons O-H donnent l'ordre de BDE suivant :



La BDE la plus faible (78.93 Kcal/mol) est attribuée à la warfarine, comparable à la BDE de BHT(antioxydant synthétique) et plus grande que celle de la vitamine C (74.54Kcal/mol) et la vitamine E (72 Kcal/mol) [61].

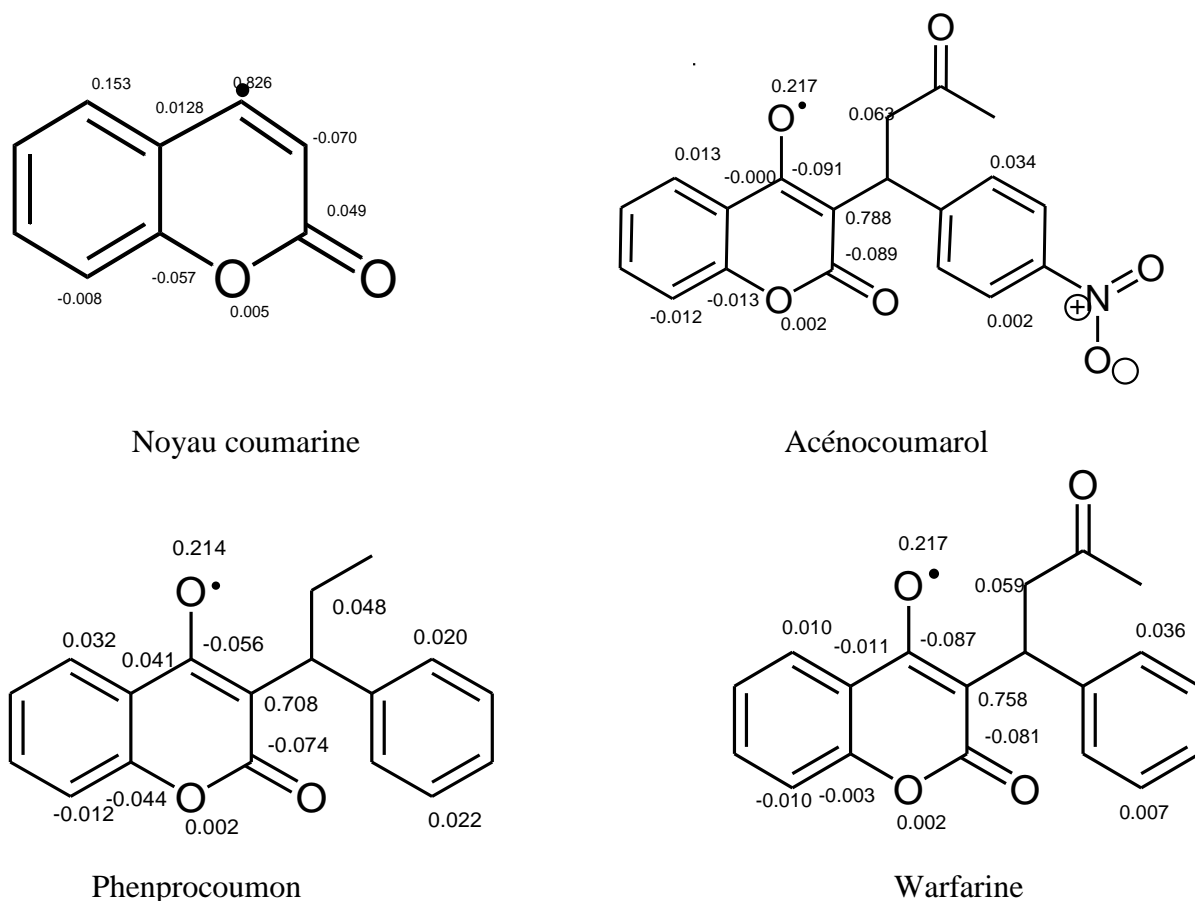
La BDE la plus élevée est attribuée à l'acénocoumarol (100.84 Kcal/mol), c'est la valeur caractéristique des liaisons C-H. Ce composé ne présente pas d'activité antioxydante.

Notant que ces calculs sont réalisés en phase gazeuse alors qu'expérimentalement, les réactions sont effectuées en phase liquide. Il se peut donc que les propriétés moléculaires en phase liquide soient différentes de celles décrites ici, ce qui montre l'importance de calcul des ces descripteurs en présence de solvant.

La comparaison entre les BDEs de l'acénocoumarol et la warfarine montre que la présence du groupement nitro sur le cycle benzénique fait augmenter la BDE d'environ 22 Kcal/mol.

La comparaison entre les BDEs de phenprocoumon et warfarine montre que la présence d'une fonction cétone lié au carbone 18, diminue la BDE d'environ 4 Kcal/mol.

La différence entre les BDEs des AVK est liée essentiellement à la stabilité du radical formé après le départ de H. La distribution de la densité de spin des radicaux illustrée sur la figure 7 montre que la densité est la même pour les trois AVK du faite que les groupements de substitutions lié au noyau coumarine n'influence pas à cause de la présence du carbone hybridé  $SP^3$  qui lie le noyau coumarine au reste de la molécule.



**Figure 9** : Distribution de la densité de spin de coumarine et des AVK

Le tableau montre que les valeurs de BDE sont plus faibles que les valeurs d'IP et de PA.

Cela montre que le mécanisme HAT est le mécanisme favorable en phase gazeuse.

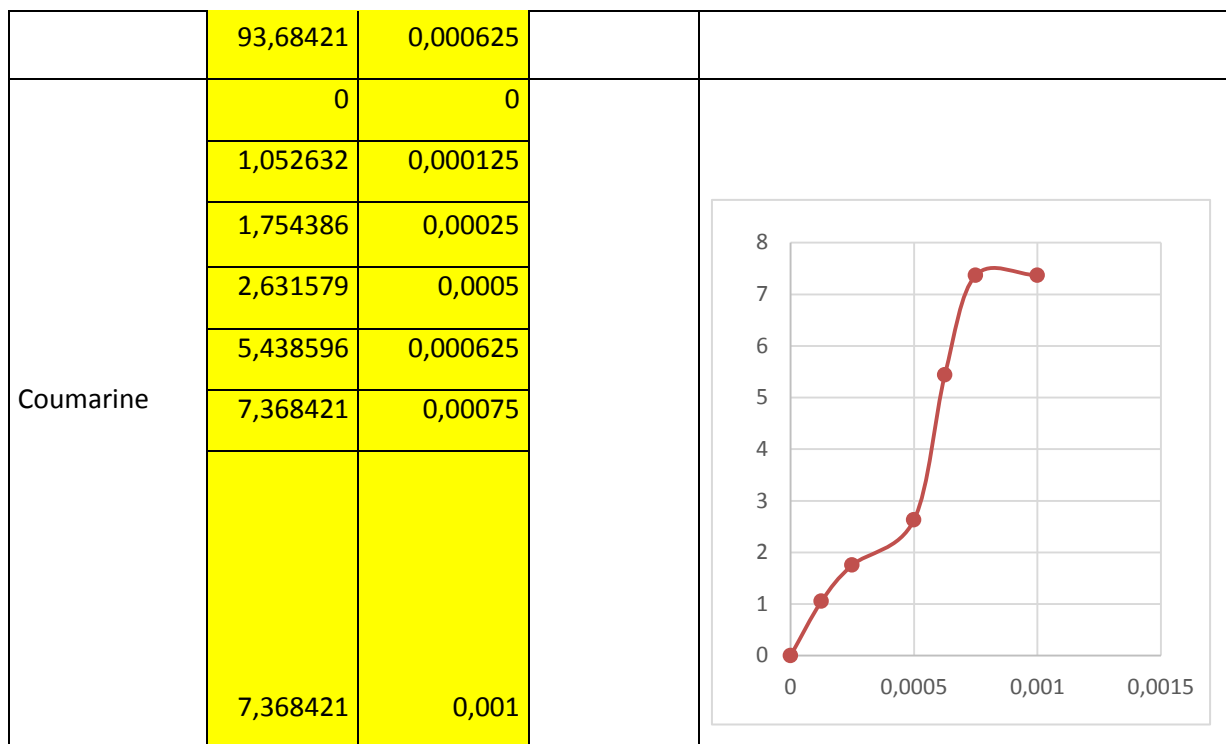


## 2. 2 Analyse des résultats expérimentaux

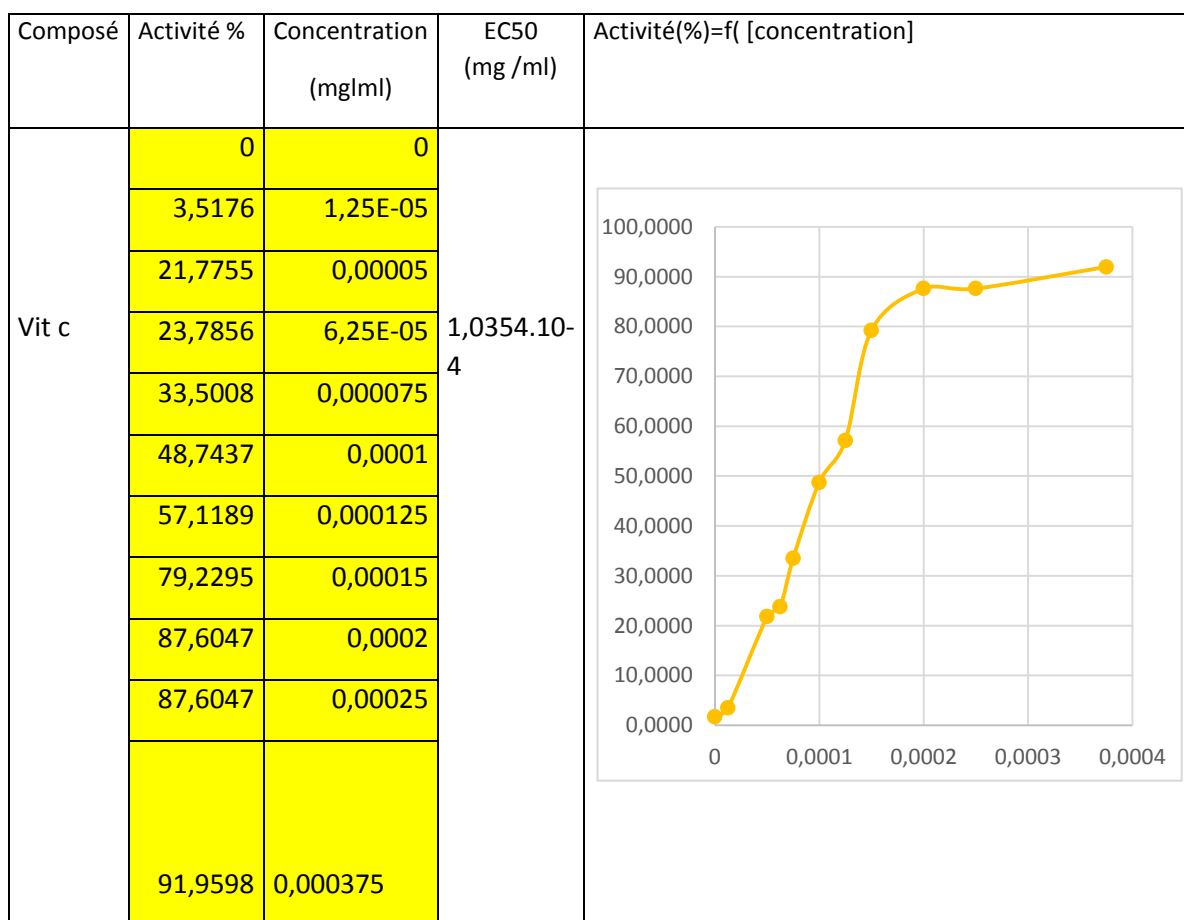
L'utilisation de l'éthanol comme solvant n'a pas permis de continuer l'expérience dans le cas de coumarine et l' l'acenocoumarol car l'augmentation de la concentration rend le composé insoluble. De ce fait, nous avons refait les expériences dans le DMSO, en réalisons le même mode opératoire. Les résultats obtenus dans les deux solvants sont rassemblés dans les tableaux N9et N10 suivants :

**Tableau N9** : Concentration des solutions testées, leurs activités et leurs courbes de variation de l'activité en fonction de la concentration dans l'éthanol.

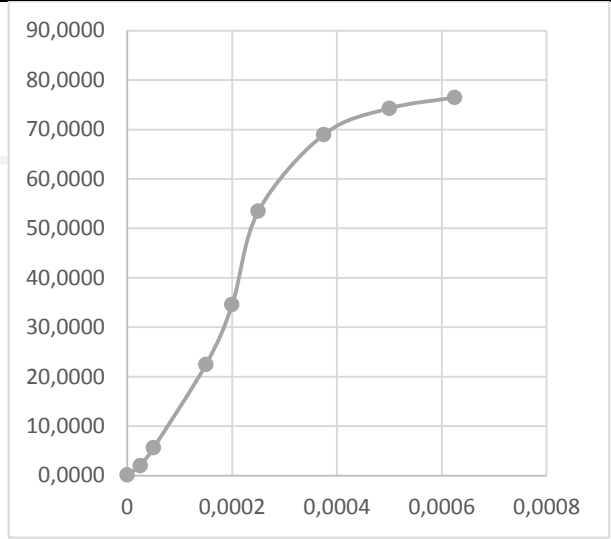
Composé	Activité (%)	Concentration (mg /ml)	EC50 (mg /ml)	Activité (%) =f (Concentration]
BHT	0	0	7,8876.10-5	
	18,42105	0,000025		
	36,66667	0,00005		
	59,29825	0,0001		
	79,12281	0,00015		
	87,01754	0,0002		
	90,52632	0,00025		
	91,75439	0,000375		
	92,2807	0,0005		
	93,50877	0,000625		
BHA	0	0	7,8619.10-5	
	14,73684	0,000025		
	36,49123	0,00005		
	60,17544	0,0001		
	75,61404	0,00015		
	87,01754	0,0002		
	90,17544	0,00025		
	90,52632	0,000375		
	92,10526	0,0005		



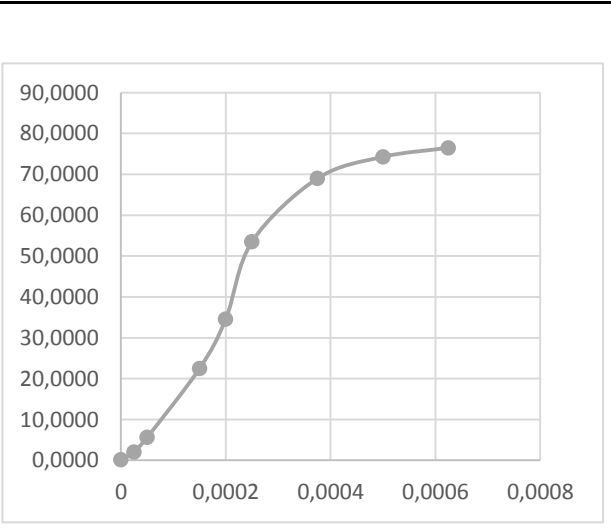
**tableau n10** : concentration des solutions testées, leur activité et les courbes de variation de l'activité en fonction de la concentration dans le DMSO.



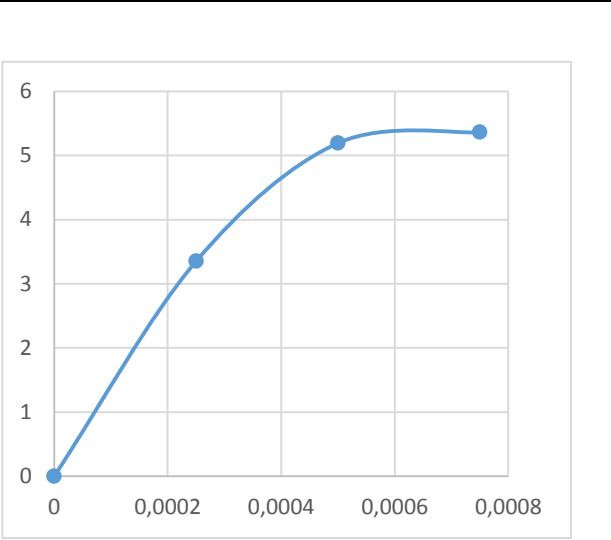
BHT	0,1704	0
	2,0443	0,00025
	5,6218	0,00005
	22,4872	0,00015
	34,5826	0,0002
	53,4923	0,00025
	68,9949	0,000375
	74,2760	0,0005
	76,4906	0,000625
		2,4117.10 <sup>-4</sup>



BHA	1,6779	0,0000
	19,6309	0,0000
	38,0872	0,0001
	65,2685	0,0001
	79,0268	0,0002
	87,5839	0,0002
	90,4362	0,0003
	90,9396	0,0004
	92,6174	0,0005
	93,9597	0,0006
		7,1809.10 <sup>-5</sup>

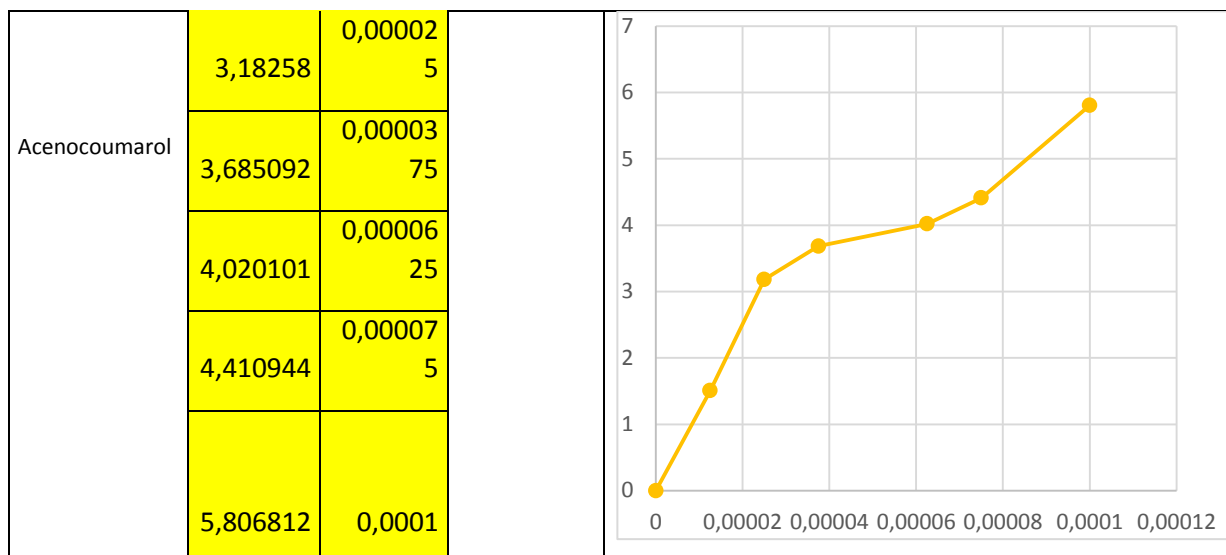


Coumarine	0	0
	0,53286	0,00025
	1,420959	0,0005
	4,262877	0,000625
	6,216696	0,00075
	6,216696	0,001



	0	0
	1,507538	0,0000125





Les résultats obtenus montrent que :

- Pour les produits de référence, on a pu atteindre la EC50 dans les deux solvants à de très faible concentration et les résultats obtenus dans l'éthanol sont en accord avec ceux cités dans la bibliographie.
- On remarque que la Vit C présente la meilleure activité antioxydante. D'autre part, l'utilisation du DMSO a permis une meilleure solubilité des AVK mais n'a pas amélioré l'activité antioxydante. Cela est en accord avec les résultats obtenus par les calculs théoriques.
- Le noyau coumarine et l'acenocoumarol ont une activité très faible (pas de EC50). Cela peut être expliqué par le fait que :

1/ Les molécules possèdent des BDEs très élevées.

2/ L'ensemble de la molécule présente une zone caractérisée par un EPS négatifs (site d'attaque électrophile) donc le noyau coumarine et l'acenocoumarol ne peuvent en aucun cas céder des protons ou des électrons.

---

## Conclusion générale

Nous avons présenté dans ce mémoire une étude théorique des propriétés structurales et électroniques des trois AVK (l'acénocoumarol, le phenprocoumon et la warfarine) plus le noyau coumarine.

Nous avons lié ces propriétés aux résultats expérimentaux obtenus par le test DPPH utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant de la coumarine et l'acénocoumarol.

L'optimisation de la géométrie et le calcul de fréquences nous a permis d'avoir les enthalpies pour calculer les descripteurs BDE, IP, PDE, PA et ETE décrivant les trois mécanismes HAT, SET-PT et SPLET.

Les résultats montrent que théoriquement, la warfarine, l'AVK la plus utilisée, présente une activité antioxydante comparable avec les composés phénoliques. Par contre, le noyau coumarine et l'acénocoumarol ont un potentiel antioxydant faible et cela a été rationalisé et quantifié théoriquement car les BDEs de ces deux composés sont très élevés. De plus l'analyse des orbitales frontières et l'ESP montre que ces molécules possèdent un caractère nucléophile qui ne leur permet pas de céder des protons ou des électrons pour neutraliser un radical.

En perspective, nous pouvons envisager l'étude des descripteurs de l'activité antioxydante en présence des différents solvants polaires et apolaire.

Tester l'activité antioxydante de molécules hypothétiques qui ressemblent à ces AVK en changeant le carbone hybridé  $SP^3$  en un carbone hybridé  $SP^2$  qui permet une meilleure délocalisation des électrons  $\pi$  et donc une meilleure stabilité des radicaux.

Utiliser d'autres méthodes de caractérisation du pouvoir antioxydant.

---

## Références

- [1] M. Vaubourdolle, *Biochimie-Hématologie*, 3<sup>ème</sup> édit. Wolters kluwer SA, 2007.
- [2] M. Ufer, “Comparative Pharmacokinetics of Vitamin K Antagonists,” vol. 44, no. 12, pp. 1227–1246, 2005.
- [3] A. Galano, “Free radicals induced oxidative stress at a molecular level : The current status , challenges and perspectives of computational chemistry based protocols,” *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 59, no. 4, pp. 231–262, 2015.
- [4] S. S. Shapiro, “Treating Thrombosis in the 21st Century,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 18, pp. 1762–1764, 2003, doi: 10.1056/nejme038152.
- [5] N. Presse, “Vitamine K et fonctions cognitives chez la personne âgée en santé : une approche épidémiologique nutritionnelle,” 2012.
- [6] M. L. Andersson, E. Eliasson, and J. D. Lindh, “A clinically significant interaction between warfarin and simvastatin is unique to carriers of the CYP2C9\*3 allele,” *Pharmacogenomics*, vol. 13, no. 7, pp. 757–762, 2012, doi: 10.2217/pgs.12.40.
- [7] M. J. Shearer and P. Newman, “Metabolism and cell biology of vitamin K,” *Thromb. Haemost.*, vol. 100, no. 4, pp. 530–547, Oct. 2008.
- [8] M. K. Shea *et al.*, “Vitamin K and vitamin D status: Associations with inflammatory markers in the Framingham offspring study,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 167, no. 3, pp. 313–320, 2008, doi: 10.1093/aje/kwm306.
- [9] S. L. Booth, M. E. O’Brien-Morse, G. E. Dallal, K. W. Davidson, and C. M. Gundberg, “Response of vitamin K status to different intakes and sources of phylloquinone-rich foods: Comparison of younger and older adults,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 70, no. 3, pp. 368–377, 1999, doi: 10.1093/ajcn/70.3.368.

- 
- [10] H. M. Macdonald, F. E. McGuigan, S. A. Lanham-New, W. D. Fraser, S. H. Ralston, and D. M. Reid, “Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: No evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 87, no. 5, pp. 1513–1520, 2008, doi: 10.1093/ajcn/87.5.1513.
- [11] G. H. Beaton *et al.*, “Sources of variance of 24-hour dietary recall data: Implications for nutrition study designing and interpretation,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 32, no. 12, pp. 2546–2559, 1979, doi: 10.1093/ajcn/32.12.2546.
- [12] A. T. Erkkilä, S. L. Booth, F. B. Hu, P. F. Jacques, and A. H. Lichtenstein, “Phylloquinone intake and risk of cardiovascular diseases in men,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 17, no. 1, pp. 58–62, 2007, doi: 10.1016/j.numecd.2006.03.008.
- [13] J. Oldenburg, M. Marinova, C. Müller-Reible, and M. Watzka, “The Vitamin K Cycle,” *Vitam. Horm.*, vol. 78, no. 07, pp. 35–62, 2008, doi: 10.1016/S0083-6729(07)00003-9.
- [14] S. L. Booth and A. Al Rajabi, “Determinants of Vitamin K Status in Humans,” *Vitam. Horm.*, vol. 78, no. 07, pp. 1–22, 2008, doi: 10.1016/S0083-6729(07)00001-5.
- [15] G. Xiong *et al.*, “ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. W1, pp. W5–W14, 2021, doi: 10.1093/nar/gkab255.
- [16] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 4–17, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.019.

- 
- [17] H. Lévesque, “L’histoire des traitements anticoagulants,” *Rev. Med. Interne*, vol. 25, no. SUPPL. 3, pp. 315–317, 2004, doi: 10.1016/S0248-8663(04)80002-X.
- [18] E. Jahnchen, T. Meinertz, H. Gilfrich, U. Groth, and A. M. Mainz, “The enantiomers of phenprocoumon : Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies,” pp. 342–349, 1976.
- [19] H. H. W. Thijssen, L. G. M. Baars, and H. T. M. Vervoort-Peters, “Vitamin K 2,3-epoxide reductase: the basis for stereoselectivity of 4-hydroxycoumarin anticoagulant activity,” *Br. J. Pharmacol*, vol. 95, pp. 675–682, 1988.
- [20] WHO, “Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy with vitamin K antagonists,” *WHO Tech. Reports Ser. No.979*, no. 889, pp. 271–316, 2013.
- [21] D. A. Triplett, “CURRENT RECOMMENDATIONS Use and Monitoring,” vol. 82, no. 3, 1998.
- [22] “Andreescu and Hepel; Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011.,” 2011, doi: 10.1021/bk-2011-1083.pr001.
- [23] Y.-Z. Fang, S. Yang, and G. Wu, “Free radicals, antioxidants, and nutrition.,” *Nutrition*, vol. 18, no. 10, pp. 872–879, Oct. 2002, doi: 10.1016/s0899-9007(02)00916-4.
- [24] C. Migdal and M. Serres, “Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant,” *Médecine/Sciences*, vol. 27, no. 4, pp. 405–412, 2011, doi: 10.1051/medsci/2011274405.
- [25] P. Kalın, İl. Gülçin, and A. C. Gören, “Antioxidant activity and polyphenol content of cranberries (*Vaccinium macrocarpon*),” *Rec. Nat. Prod.*, vol. 9, no. 4, pp. 496–502, 2015.



- 
- [26] S. Çakmakçı *et al.*, “Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 50, no. 2, pp. 472–481, 2015, doi: 10.1111/ijfs.12637.
- [27] M. Carochó and I. C. F. R. Ferreira, “A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 51, no. 1, pp. 15–25, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.
- [28] A. L. Branen, “Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 52, no. 2, pp. 59–63, Feb. 1975, doi: 10.1007/BF02901825.
- [29] A. A. Botterweck, H. Verhagen, R. A. Goldbohm, J. Kleinjans, and P. A. van den Brandt, “Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study,” *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 38, no. 7, pp. 599–605, Jul. 2000, doi: 10.1016/s0278-6915(00)00042-9.
- [30] N. Gharavi and A. O. S. El-Kadi, “tert-Butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 33, no. 3, pp. 365–372, Mar. 2005, doi: 10.1124/dmd.104.002253.
- [31] D. G. Soares, A. C. Andreazza, and M. Salvador, “Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 4, pp. 1077–1080, Feb. 2003, doi: 10.1021/jf020864z.
- [32] I. Kubo, P. Xiao, and K. Fujita, “Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action,” *Bioorganic & Med. Chem.*

- 
- Lett.*, vol. 11, no. 3, p. 347—350, 2001, doi: 10.1016/s0960-894x(00)00656-9.
- [33] B. Y. B. D. Astill and D. W. F. D. R. L. Roudabush, “The Metabolism of 2 : 4 : 5-Trihydroxybutyrophenone in the Rat and Dog Pale yellow,” vol. 72, pp. 451–459, 1958.
- [34] A. P. Evan and K. D. Gardner, “Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acid-induced renal cystic disease,” *Kidney Int.*, vol. 15, no. 1, pp. 7–19, 1979, doi: 10.1038/ki.1979.2.
- [35] Q.-X. Chen, L.-N. Ke, K.-K. Song, H. Huang, and X.-D. Liu, “Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase.,” *Protein J.*, vol. 23, no. 2, pp. 135–141, Feb. 2004, doi: 10.1023/b:jopc.0000020080.21417.ff.
- [36] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, “Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review,” *J. Funct. Foods*, vol. 18, pp. 820–897, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- [37] A. T. Diplock *et al.*, “Functional food science and defence against reactive oxidative species.,” *Br. J. Nutr.*, vol. 80 Suppl 1, pp. S77-112, Aug. 1998, doi: 10.1079/bjn19980106.
- [38] E. Schrodinger, “Quantisierung als Eigenwertproblem,” *Ann. del Phys.*, vol. 384, no. 4, pp. 361–376, 1926.
- [39] P. Knowles, M. Schutz, and H. Werner, *Ab Initio Methods for Electron Correlation in Molecules, Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry*, vol. 3. 2000.
- [40] D. R. Hartree, “The Wave Mechanics of an Atom with a non-Coulomb Central Field. Part III. Term Values and Intensities in Series in Optical Spectra,” *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.*, vol. 24, no. 3, pp. 426–437, 1928, doi: 10.1017/S0305004100015954.

- 
- [41] C. C. J. Roothaan, “New developments in molecular orbital theory,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 23, no. 2, pp. 69–89, 1951, doi: 10.1103/RevModPhys.23.69.
- [42] W. Kohn and L. J. Sham, “Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects,” *Phys. Rev.*, vol. 140, no. 4A, 1965.
- [43] A. D. Becke, “Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior,” *Phys. Rev. A*, vol. 38, no. 6, pp. 3098–3100, Sep. 1988, doi: 10.1103/PhysRevA.38.3098.
- [44] J. P. Perdew, M. Ernzerhof, K. Burke, J. P. Perdew, M. Ernzerhof, and K. Burke, “Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations Rationale for mixing exact exchange with density functional approximations,” vol. 9982, no. 1996, pp. 9982–9985, 2010.
- [45] J. P. Perdew, “Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas,” *Phys. Rev. B*, vol. 33, no. 12, pp. 8822–8824, 1986, doi: 10.1103/PhysRevB.33.8822.
- [46] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, “Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density,” *Phys. Rev. B*, vol. 37, no. 2, pp. 785–789, Jan. 1988, doi: 10.1103/PhysRevB.37.785.
- [47] A. D. Becke, “A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories,” *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 2, pp. 1372–1377, 1993, doi: 10.1063/1.464304.
- [48] A. D. Becke, “Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange,” *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 7, pp. 5648–5652, 1993, doi: 10.1063/1.464913.
- [49] J. Gräfenstein, A. M. Hjerpe, E. Kraka, and D. Cremer, “An accurate description of the Bergman reaction using restricted and unrestricted DFT: Stability test, spin density, and on-top pair density 1,” *J. Phys. Chem. A*,

- 
- vol. 104, no. 8, pp. 1748–1761, 2000, doi: 10.1021/jp993122q.
- [50] M. J. Frisch *et al.*, “Gaussian 09 Revision A.2.” 2009.
- [51] J. Rimarčík, V. Lukeš, E. Klein, and M. Ilčin, “Study of the solvent effect on the enthalpies of homolytic and heterolytic N–H bond cleavage in p-phenylenediamine and tetracyano-p-phenylenediamine,” *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 952, no. 1, pp. 25–30, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2010.04.002>.
- [52] J. E. Bartmess, “Thermodynamics of the electron and the proton,” *J. Phys. Chem.*, vol. 98, no. 25, pp. 6420–6424, 1994, doi: 10.1021/j100076a029.
- [53] A. Floegel, D. O. Kim, S. J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, “Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 24, no. 7, pp. 1043–1048, 2011, doi: 10.1016/j.jfca.2011.01.008.
- [54] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, “Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 5, pp. 997–1027, 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739.
- [55] D. Huang, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” 2005. doi: 10.1007/s11418-014-0862-8.
- [56] J. S. Wright, E. R. Johnson, and G. A. Dilabio, “Predicting the activity of phenolic antioxidants : Theoretical method , analysis of substituent effects , and application to major families of antioxidants,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 6, pp. 1173–1183, 2001, doi: 10.1021/ja002455u.
- [57] F. Shahidi and Y. Zhong, “Measurement of antioxidant activity,” *J. Funct. Foods*, pp. 1–25, 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047.
- [58] B. M. S, “Nature Publishing Group,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 4617, pp. 6420–

---

6424, 1958.

- [59] U. Nancy, G. Bram, and J.-L. Rivail, “La théorie des orbitales moléculaires et l’émergence de la chimie quantique,” 2003.
- [60] M. J. Alam and S. Ahmad, “Quantum chemical and spectroscopic investigations of 3-methyladenine,” *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 128, p. 653—664, 2014, doi: 10.1016/j.saa.2014.02.170.
- [61] H. Boulebd, “Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study,” *J. Mol. Struct.*, p. 127210, 2019, doi: 10.1016/j.molstruc.2019.127210.

