

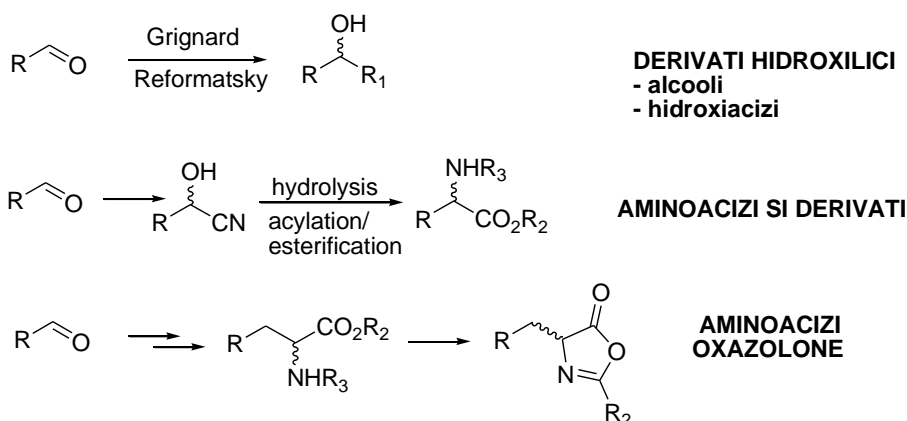
## Raport stiintific sintetic al proiectului

### PROCESE BIOORGANICE STEREOSELECTIVE CONTINUE DE REZOLUTIE CINETICA DINAMICA

pentru perioada 2011-2013

#### 2011: Sinteza chimica a compusilor racemici si Dezvoltarea metodelor analitice de separare a enantiomerilor

Compusii organici racemici care vor fi utilizati ca si substraturi ale bioproceselor ce urmeaza a fi realizate au fost preparati prin metodologii sintetice descrise in literatura, unele dezvoltate chiar de catre colectivul nostru, folosind ca si compusi de pornire aldehidele (hetero)aromate. Acestea au fost transformate in compusi cu functiuni hidroxilice (alcooli secundari prin reactii Grignard sau cu acetaldehida si compusi organoliti si  $\beta$ -hidroxiesteri respectiv  $\beta$ -hidroxiacizi prin reactie Reformatsky), aminoacizi si derivati functionali ai acestora, respectiv oxazolone, toti racemici.



Pentru a investiga stereoselectivitatea proceselor catalizate de lipaze este necesara determinarea prealabila a conditiilor de separare cromatografica chirala a enantiomerilor, atat pentru substrat cat si pentru produs. In functie de structura acestora, au fost utilizate cromatografia de gaze sau cea de lichide de inalta performanta, prin folosirea coloanelor cromatografice adecvate cu faza stationara chirala. S-au determinat in toate situatiile conditiile optime de realizare a separarilor cromatografice ale celor doi enantiomeri (base line separation).

#### 2012: Investigarea proceselor de rezolutie ale unor racemati prin rezolutie cinetica enzimatica (EKR).

Au fost realizate ambele obiective prevazute pentru anul 2012.

1. Prin rezolutii cinetice enzimaticе a fost realizata sinteza ambilor enantiomeri ai unor compusi organici chirali cu importanta sintetica din clasa:

- a.  $\alpha$ -hidroxiacizilor heterociclici
  - b. alcoolilor tiazolici
  - c. fenil-tiofenil-cianohidrinelor
  - d. heteroaril-etanamineLOR
2. Au fost efectuate studii preliminare pentru realizarea unor procese de rezolutie cinetica enzimatica, prin testarea agentilor bazici capabili sa realizeze racemizarea eficienta *in situ* a fenil-tiofenil cianohidrinelor
  3. S-a reusit producerea si izolarea unei lipaze "anti-Kazlauskas", dar performantele catalitice (activitate si selectivitate) sunt modeste, astfel incat utilizarea ei in procese de DKR nu este economic avantajoasa.

Rezultatele obtinute in anul 2012, prezentate succinct anterior, au fost publicate in trei articole cotate ISI. Factorul de impact cumulate al acestor publicatii este 8.633.

1. Mara Ana Naghi, László Csaba Bencze, Jürgen Brem, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Monica Ioana Tosa: **Sequential enzymatic procedure for the preparation of enantiomerically pure 2-heteroaryl-2-hydroxyacetic acids** *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 181-187 (IF 2.652)
2. Laura Pop, Pierrik Lassalas, László Csaba Bencze, Monica Ioana Tosa, Botond Nagy, Florin Dan Irimie, Christophe Hoarau: **Chemoenzymatic synthesis of highly enantiomerically enriched secondary alcohols with a thiazolic core** *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 474-481 (IF 2.652)
3. Jürgen Brem, László-Csaba Bencze, Arto Liljebld, Mihaela C. Turcu, Csaba Paizs, Florin-Dan Irimie, Liisa T. Kanerva: **Chemoenzymatic preparation of 1-heteroarylethanamines of low solubility** *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *17*, 3288-3294 (IF 3.329)

## STUDII SI REZULTATE OBTINUTE IN ANUL 2013

Obiectivul major al acestei etape il reprezinta obtinerea unor biocatalizatori, enzime imobilizate, capabile sa realizeze transformarile urmarite (rezolutia enzimatica cinetica dinamica- **DKR**) in conditii avantajoase din punct de vedere economic, pretabile la transpunere la scara mare in bioreactoare cu functionare continua.

Ca element de noutate mentionam de la inceput imobilizarea unor lipaze pe nanotuburi de carbon, caracterizarea acestor noi biocatalizatori si testarea lor in procese de rezolutie cinetica enzimatica- **EKR**.

In scopul realizarii DKR este necesara si determinarea conditiilor optime pentru racemizarea *in situ* a substratului, dupa ce procesul de EKR a fost optimizat.

Ca si proces a fost aleasa transformarea unor cianohidrine din seria 5-feniltiofenului.

### **Obiectivele etapei:**

1. Elaborarea metodelor de imobilizare a enzimelor
2. Testarea performantelor enzimelor imobilizate

Cianohidrinele sunt sintoni chirali versatili si valorosi in sinteza organica, motiv pentru care obtinerea lor in forma enantiopura reprezinta o provocare importanta si multe grupuri de cercetare au fost atrase de aceste clase de compusi.<sup>1</sup>

Cea mai simpla metoda de obtinere a cianohidrinelor, aditia HCN la compusi carbonilici, este un proces de echilibru. Daca se lucreaza in conditii bazice procesul este complet lipsit de stereoselectivitate si genereaza amestecuri racemice ale produsului. Pentru a controla stereoselectivitatea procesului, ar fi necesara utilizarea unor conditii acide sau neutre.

Cianohidrinele optic active sunt intermediari versatili pentru sinteza unei varietati mari de compusi valorosi, cum ar fi: aminoacizii,<sup>2</sup> hidroxiacizii,<sup>3</sup> etc.<sup>4</sup>

In acest scop au fost dezvoltate o gama variata de metode de sinteza chimica<sup>5</sup> si enzimatica.<sup>6</sup>

Deosebit de atractive sunt in acest context metodele enzimatice deoarece ele permit obtinerea unor enantioselectivitati superioare, chiar si prin utilizarea unor preparate enzimatice disponibile comercial la preturi accesibile.

Metodele enzimatice pot fi clasificate in urmatoarele trei categorii:

1. Aditia HCN la aldehide in prezenta oxinitrilazelor ca si catalizatori chirali<sup>6</sup>;
2. rezolutia cinetica enzimatica a cianohidrinelor racemice mediata de lipaze<sup>7</sup>;
3. rezolutia cinetica dinamica a cianohidrinelor racemice.<sup>7,8</sup>

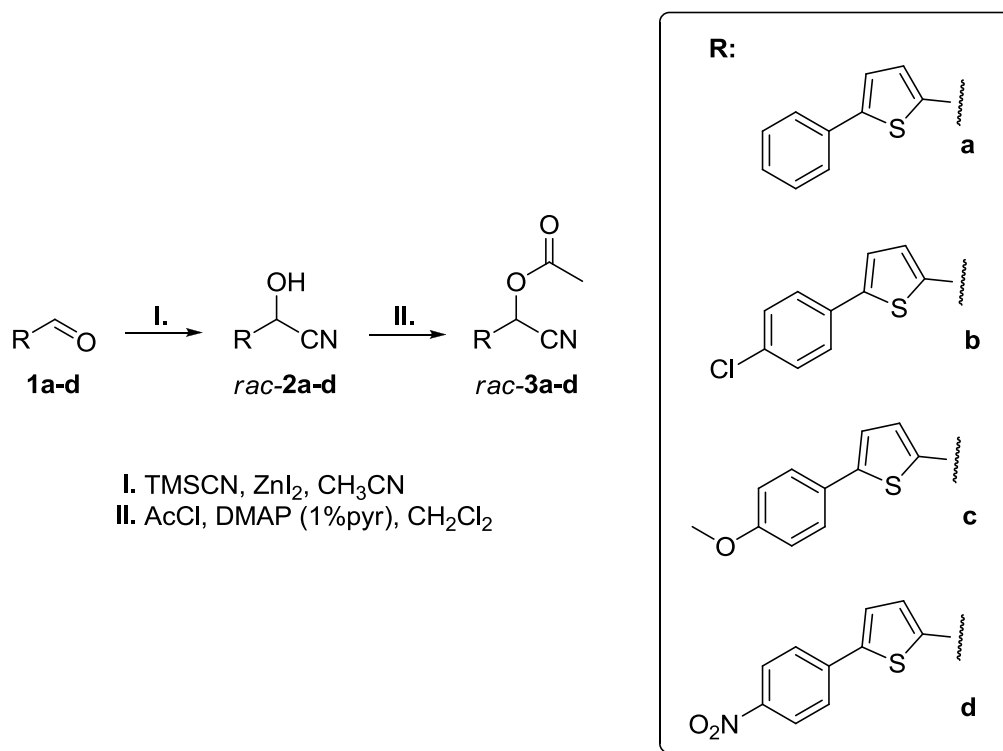
Unul din cele mai mari dezavantaje ale metodelor care folosesc aditia acidului cianhidric eliberat *in situ* (din acetoncianhidrina, un produs lichid care a inlocuit cu succes

acidul cianhidric gazos) la aldehide si cetone este faptul ca, in special in cazul cetonelor, echilibrul este deplasat spre stanga, ceea ce reduce cons

Procesele de rezolutie cinetica si rezolutie cinetica dinamica enzimatica au devenit in schimb in ultima perioada un instrument uzual pentru elaborarea unor tehnologii ecologice si sustenabile cu un caracter interdisciplinar avansat.<sup>9</sup> Dintre acestea trebuie amintit aici primele procese de DKR a cianohidrinelor aldehidelor aromatice si a acetonei studiate la inceputul anilor 90 de catre Oda si colab.<sup>10</sup>

In scopul elaborarii unui proces eficient de rezolutie cinetica dinamica este necesar sa fie indeplinite urmatoarele criterii: 1. Rezolutia cinetica sa fie foarte selectiva ( $E > 20$ ); 2. racemizarea sa fie rapida, cel putin de 10 ri mai rapida decat reactia enzimatica de transformare a enantiomerului mai putin reactiv; 3. Catalizatorul bazic sa nu reactioneze cu produsul reactiei enzimatic; 4. Racemizarea sa poata fi realizata in conditiile reactiei enzimatic In cazul studiat, realizarea sintezei cianohidrinei in conditii bazice este un avantaj deoarece permite indeplinirea tuturor acestor conditii.<sup>11</sup>

In schema 1 este prezentata sinteza cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* studiate din aldehidele corespunzatoare **1a-d** si acilarea lor la acetatii racemici *rac-3a-d*.



**Schema 1.** Sinteza cianohidrinelor si acetatilor racemici

Condițiile separării cromatografice a enantiomerilor individuali determinate ca sunt prezentate în tabelul 1 pentru toți compusii seriei.

**Tabelul 1.** Timpii de retenție ai enantiomerilor compusilor racemici **2,3a-d**

Compus	$t_r$ [min]	Compus	$t_r$ [min]
(R)- <b>2a</b>	9.9	(R)- <b>3a</b>	8
(S)- <b>2a</b>	11	(S)- <b>3a</b>	9
(S)- <b>2b</b>	31	(S)- <b>3b</b>	19
(R)- <b>2b</b>	37	(R)- <b>3b</b>	21
(R)- <b>2c</b>	14.8	(S)- <b>3c</b>	10
(S)- <b>2c</b>	17.3	(R)- <b>3c</b>	11
(S)- <b>2d</b>	18.5	(R)- <b>3d</b>	10
(R)- <b>2d</b>	20	(S)- <b>3d</b>	11

## REZOLUTIA CINETICA ENZIMATICA

Au fost testate mai multe lipaze disponibile comercial pentru EKR a cianohidrinelor. Cea mai buna enantioselectivitate s-a obtinut cu lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B, Novozym 435), din *Pseudomonas fluorescens* (AK) adsorbita pe Celita ( $ee_p = 98\%$  și  $ee_s = 72\%$  la  $c = 42\%$  după 3 h, în MTBE). La utilizarea lipazei A din *Candida antarctica* imobilizata pe celita reactia a fost rapida și selectivitatea relativ buna ( $ee > 83\%$ ) la o conversie de 48% pentru ambii produși.

**Tabelul 2.** Eacilarea enantioselectiva a *rac-2a* cu acetat de vinil în diferiti solvenți

Nr	Enzima	Solvent	Timp (h)	c (%)	$ee_s$ (%)	$ee_p$ (%)	E
1	CaL-A	Acetonitril	3	48	83	90	50
2		Acetat de etil	3	22.7	21.5	73.1	7.9
3		MTBE	3	28.8	18.8	46.3	3.2
4		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3	15.8	16.5	87.4	17.6
5		Methyl-THF	17	34	22.8	44.3	3.2
6	L-AK	MTBE	3	42	72	98	>200
7		Methyl-THF	3	12.6	14	98	121
8		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	17	44.6	79.8	99	>200
9	CaL-B	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	17	23	28	91	29
10	L-AKsolgel	MTBE	21	9.5	10	98	109

**Tabelul 3.** Acilarea enzimatica la scara preparativa in conditiile optime

<b>Substrat</b>	<b>Timp (h)</b>	<b>c(%)</b>	<b>ee<sub>S</sub>(%)</b>	<b>ee<sub>P</sub>(%)</b>	<b>E</b>
<i>rac-2a</i>	3	48	83	90	50
<i>rac-2b</i>	3	49	90	94	99
<i>rac-2c</i>	3	49	87	90	54
<i>rac-2d</i>	3	50	91	88	49

**REZOLUTIA ENZIMATICA CINETICA DINAMICA**

A fost studiată prepararea acetatului cianohidrinei **3a** din aldehida **1a** și acetoncianohidrina ca sursa de HCN, conform Schemei 2B. Acetatul de vinil a fost un agent de acilare convenabil, deși studiile anterioare au susținut necesitatea folosirii acetatului de izopropenil.<sup>12</sup>

**Tabelul 4.** Rezolutia cinetica enzimatica dinamica pornind de la aldehide cu 5 equiv acetoncianohidrina

<b>Baza</b>	<b>Cantitate (μL)</b>	<b>Timp (h)</b>	<b>ee<sub>P</sub>(%)</b>	<b>ee<sub>S</sub>(%)</b>
trietiamina	1	6	0.5	2.2
trietiamina	0.5	4	11	2.3
trietiamina	0.5	16	1	12
dietiamina	1	15	29	70
dietiamina (NaOH)	0.5	47	23	5
CaL-A pe SWCNT	10mg	6 days	99	3
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 90	5mg	23	99	4
Amberlit IRA-904	5mg	19	17	14
Diizopropilamina	1	13	1	3.5
Dietanolamina	3mg	3	0	2.5
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> bazica	4mg	16	48	12

Printre bazele testate care nu au dat rezultate, amintim: sefaroza, difenilamina, N,N-dimetilamina, Amberlite IR-4B, urea, guanidina, piridina și silicagelul. Studiind influența unor aditivi asupra procesului studiat, la folosirea trietilaminei ca și baza, s-au obținut rezultatele din tabelul 5.

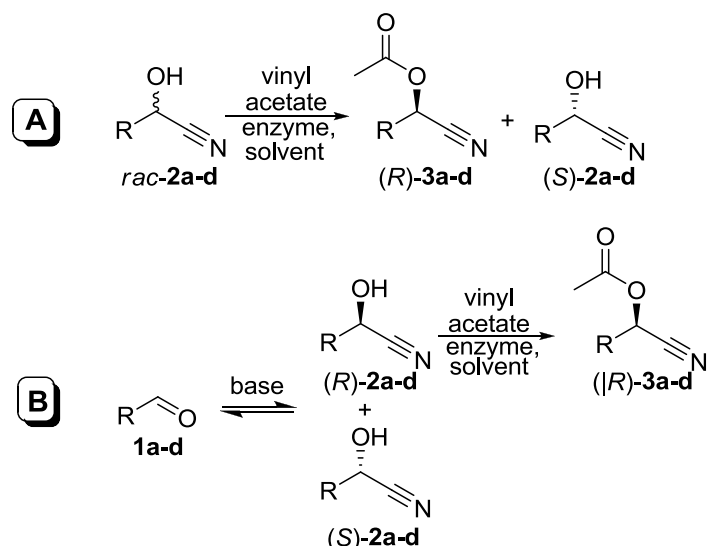
**Tabelul 5.** Efectul temperaturii si aditivilor la DKR a **2a** cu trietilamina ca baza

Aditiv	Temperatura (°C)	Timp (h)	ee <sub>P</sub> (%)	ee <sub>S</sub> (%)
fara	40	6	1.4	0
<i>t</i> -butanol	25	3	35	4
acetofenona	25	3	22	1
acetofenona	25	6	8	1
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /eter 18C6	25	6	0.2	7
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /eter 18C6	25	3	0.2	8

O explicatie posibila a eficientei reduse ar putea fi cantitatea de baza utilizata, prezentata deja in literatura pentru cazul mandelonitrilului<sup>13</sup>. Si in cazul nostru, acidul acetic eliberat in reactia de O-acilare datorita apei prezente in enzima poate neutraliza partial baza si astfel determina scaderea eficientei procesului de rezolutie cinetica dinamica.

**Tabelul 6.** DKR a *rac*-**2b,c,d** cu acetat de vinil, L-AK in MTBE

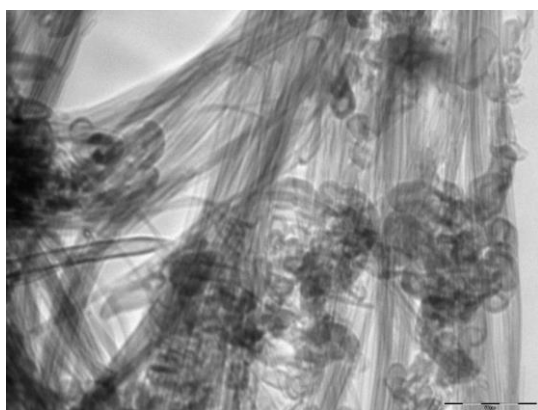
Agent de racemizare	Substrat	Timp (h)	<i>c</i> (%)	ee <sub>P</sub> (%)	ee <sub>S</sub> (%)
2-Dietilaminoetanol	<i>rac</i> - <b>2b</b>	3	43.5	95.6	73.6
	acetilat	17	17.5	37.7	8
	<i>rac</i> - <b>2c</b>		Nici un produs		
	<i>rac</i> - <b>2d</b>	3	60	63.6	95.8
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> bazica		17	65.6	50.6	96.9
	<i>rac</i> - <b>2b</b>	17	3.8	79.3	3.2
	<i>rac</i> - <b>2c</b>		Nici un produs		
Trietilamina	<i>rac</i> - <b>2d</b>	17	46.2	74.7	64.3
	<i>rac</i> - <b>2b</b>	3	48.7	87.9	83.4
		17	47	40	36
	<i>rac</i> - <b>2c</b>	3	46.4	99	86.6
		17	99	0	72
	<i>rac</i> - <b>2d</b>		Produs racemic		



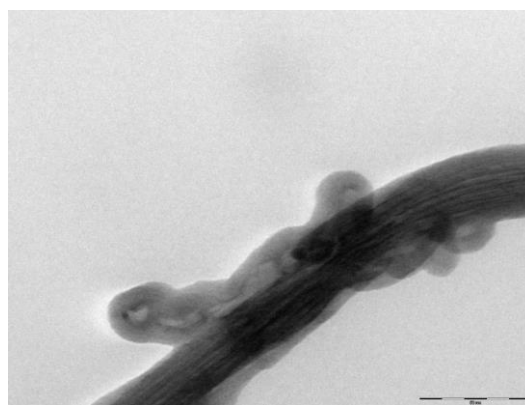
**Schema 2.** A. Acilarea enzimatică a cianohidrinelor racemice *rac-2a-d*; B- sinteza one pot a *(R)-3a-d* prin DKR

#### A. Imobilizarea enzimei pe nanotuburi de carbon

Urmatoarele lipaze: L-AK, CaL-A si CaL-B au fost imobilizate pe nanotuburi de carbon monostrat (SWCNT) prin adaugarea a 50 mg SWCNT, 3 mL tampon fosfat (50mM, pH 7.6) si 100 mg enzima dizolvata intr-un mL tampon identic; amestecurile obtinute au fost ultrasonate pentru 30 minute, apoi agitate 3 ore la 1350 rpm, congelate la -20°C si uscate prin liofilizare.



1. Imaginea TEM a CaL-A imobilizata pe SWCNT



2. Imaginea TEM a L-AK imobilizata pe SWCNT



### *B. Rezolutia cinetica enzimatica a rac-2a-d cu acetat de vinil si lipazele testate*

In solutia rac-2a-d (2.5 mg) in solventul organic testat se adauga acetat de vinil (4 µL) si lipaza (12.5 mg) were added. Dupa perfectare sub agitare pentru 3 ore la temperatura camerei, probe diluate se analizeaza pe HPLC.

### *C. Rezolutia cinetica dinamica enzimatica a 1a-d*

Aldehida 1a-d (0.013 mmol, 2.5mg), cianohidrina acetonei (0.065 mmol, 5µL), baza testata si acetatul de vinil (0.052 mmol, 4.9 µL) se amesteca cu CaL-A pe Celite in acetonitril si reactia se perfecteaza la 25 °C si 1340 rpm. Probele prelevate periodic se analizeaza cromatografic.

PROF. DR. ING. FLORIN DAN IRIMIE

### **Literatura**

- 
- <sup>1</sup> G. Seoane, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 283–304; M. North, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 147–176.
- <sup>2</sup> Warmerdam, E. G. J. C.; van Rijn, R. D.; Brussee, J.; Kruse, C. G.; van der Gen, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1723e1732.
- <sup>3</sup> DeSantis, G.; Zhu, Z.; Greenberg, W. A.; Wong, K.; Chaplin, J.; Hanson, S. R.; Farwell, B.; Nicholson, L. W.; Rand, C. L.; Weiner, D. P.; Robertson, D. E.; Burk, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9024e9025.
- <sup>4</sup> Effenberger, F.; Bohrer, A.; Forster, S. *Future Directions in Biocatalysis*; Matsuda, T., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2007.
- <sup>5</sup>(a) Casas, J.; Najera, C.; Sansano, J. M.; Saa, J. M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10487e10496; (b) Li, Y.; He, B.; Qin, B.; Feng, X.; Zhang, G. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7910-7913.
- <sup>6</sup>(a) Han, S.; Chen, P.; Lin, G.; Huang, H.; Li, Z. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 843-846; (b) Chen, P.; Han, S.; Lin, G.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8251-8253; (c) Kobler, C.; Effenberger, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3731-3742.
- <sup>7</sup> Paizs, C.; Tahtinen, P.; Tosa, M.; Majdik, C.; Irimie, F.-D.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10533-10540.
- <sup>8</sup> Veum, L.; Hanefeld, U. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3707-3709.
- <sup>9</sup>(a) Akai, S.; Tanimoto, K.; Kanao, Y.; Egi, M.; Yamamoto, T.; Kita, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2592-2595; (b) Ko, S.-B.; Baburaj, B.; Kim, M.-J.; Park, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6860-6864.
- <sup>10</sup> Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5643-5649.
- <sup>11</sup> Joly Sukumaran, J., Hanefeld, U. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 530–542.
- <sup>12</sup> Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5643–5649.
- <sup>13</sup> Li, Y.; Straathof, J. J.; Hanefeld, U. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 739–743.