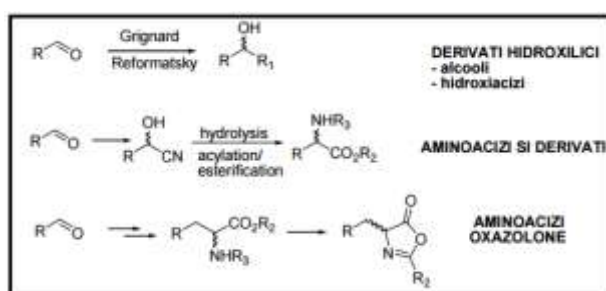


# RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL (2011-2016)

## PROCESE BIOORGANICE STEREOSELECTIVE CONTINUE DE REZOLUȚIE CINETICĂ DINAMICĂ

### ETAPA I-2011: Sinteza chimică a unor compuși racemici și dezvoltarea metodelor analitice de separare a enantiomerilor

Compușii organici racemici care vor fi utilizați ca substraturi ale bioprocurelor ce urmează a fi realizate au fost preparați prin metodologii sintetice descrise în literatură, unele dezvoltate chiar de către colectivul nostru, folosind ca și compuși de pornire aldehidele (hetero)aromate. Acestea au fost transformate în compuși cu funcțiuni hidroxilice (alcooli secundari prin reacții Grignard sau cu acetaldehida și compuși organoliti și  $\beta$ -hidroxiesteri respectiv  $\beta$ -hidroxiacizi prin reacție Reformatsky), aminoacizi și derivați funcționali ai acestora, respectiv oxazolone, toți racemici, prin reacțiile prezentate în Schema 1.

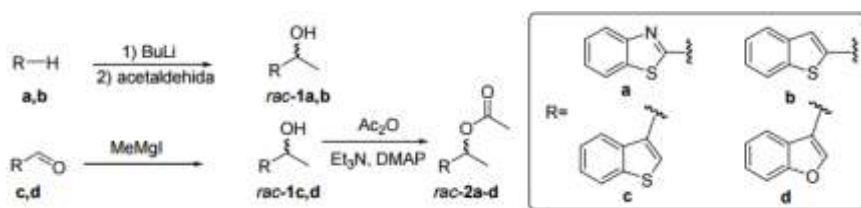


Schema 1. Sinteza substraturilor racemice pornind de la aldehide

Pentru a investiga stereoselectivitatea proceselor catalizate de lipaze este necesară determinarea prealabilă a condițiilor de separare cromatografică chirală a enantiomerilor, atât pentru substrat cât și pentru produs. În funcție de structura acestora au fost utilizate cromatografia de gaze sau cea de lichide de înaltă performanță, prin folosirea coloanelor cromatografice adecvate cu faza staționară chirală. În toate situațiile s-au determinat condițiile optime de realizare a separărilor cromatografice ale celor doi enantiomeri (base line separation).

#### A. Sinteza și separarea enantiomerilor heteroaril etanolilor și acetaților corespunzători racemici

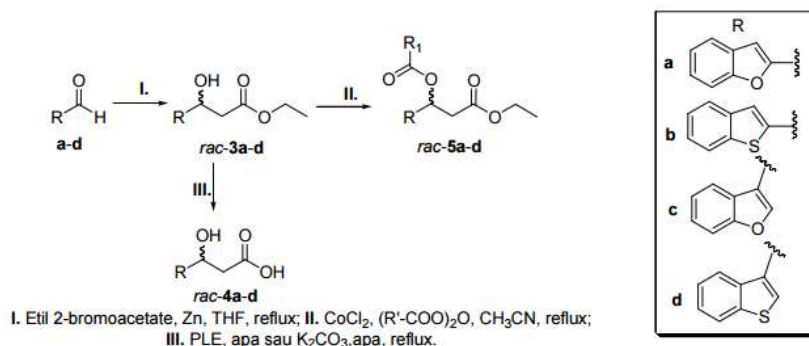
1-(benzo[d]tiazol-2-il)etanolul (*rac-1a*) și 1-(benzo[b]tiofen-2-il)etanolul (*rac-2b*) au fost obținuți din compușii heteroaromatici nesubstituiți corespunzători, prin litere selectivă la poziția 2 cu *n*-butil litiu în tetrahidrofuran la  $-78^\circ\text{C}$  și reacție cu acetaldehida. Pentru obținerea alcoolilor *rac-1c,d* aldehidele corespunzătoare servesc ca materiale de pornire. Ele au fost transformate cu iodura de metil magneziu în produșii doriți. Heteroaril acetații racemici au fost sintetizați print-o acilare chimică cu anhidrida acetică în prezența de  $\text{Et}_3\text{N}$  și o cantitate catalitică de DMAP (Schema 2). Analiza gazcromatografică a fost realizată pe un cromatograf Konik HRGC 4000 B (gaz purtător  $\text{N}_2$ ; head pressure: 60 psi, injector:  $250^\circ\text{C}$ ; FID detector:  $250^\circ\text{C}$ ) cu o coloană chirală Astec de  $\beta$ -cyclodextrină dimetilată ( $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ , No. 777023 G0507-30).



Schema 2. Sinteza chimică a alcoolilor racemici și a derivaților *O*-acetilați ai acestora

## B. Sinteza și separarea enantiomerilor $\beta$ -hidroxiesterilor și a $\beta$ -hidroxiacizilor prin reacție Reformatsky

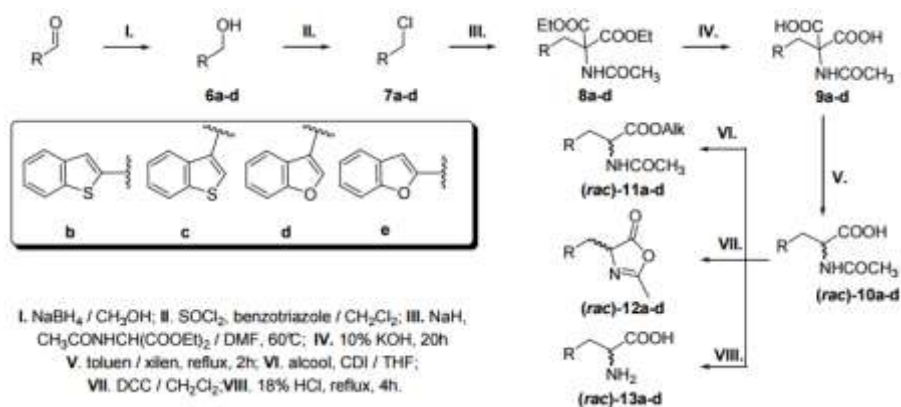
Prin reacția Reformatsky a aldehydelor corespunzătoare cu bromoacetat de etil și zinc au fost preparați benzofuranil- și benzo[*b*]tiofenil-3-hidroxiopropanoatii de etil racemici în poziția 2 și 3 a inelului heterociclic (*rac-3a-d*). Pentru acilarea grupării hidroxilice s-a utilizat anhidrida acidăși clorura de cobalt ca și catalizator, preparându-se diesterii *rac-5a-d*, iar prin hidroliza grupării esterice în mediu bazic sau enzimatic, cu esteraza din ficatul porcine, s-au obținut și  $\beta$ -hidroxiacizii *rac-4a-d* (Schema 3). Separarea enantiomerilor hidroxiacizilor *rac-4a-d* s-a realizat pe un tandem de 2 coloane Astec: Chirobiotic-Tag și Chirobiotic-R (4.6×250 mm) cu un amestec de metanol și tampon TEAA (pH 4.1), 98:2 (v/v) ca eluent. Pentru separarea compușilor mono- și diesterici *rac-3,5a-b* s-a utilizat tandemul Chiralpak IA și OJ (4.6×250 mm), iar pentru *rac-3,5c-d* coloana Chiralpak IC (4.6×250 mm) cu un amestec de hexan și 2-propanol, 90:10 (v/v) ca eluent toate la un debit de 1 mL/min.



Schema 3. Sinteza  $\beta$ -hidroxiesterilor și acizilor racemici prin reacție Reformatsky urmată de hidroliză

## C. Sinteza benzofuranil- și benzo[*b*]tiofenil-alaninelor racemice și a derivaților acestora

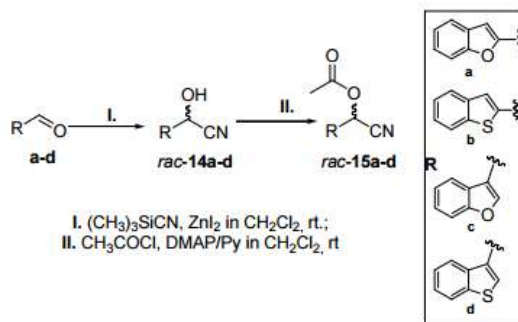
Aldehidele au fost materii de pornire pentru sinteza aminoacizilor racemici și a derivaților acestora (Schema 4). Aldehidele au fost transformate în derivați clorometilenici **7a-d** prin intermediul alcoolilor corespunzatori **6a-d**. Alcoolii au fost sintetizați prin reducerea aldehydelor cu NaBH<sub>4</sub> în metanol, în timp ce compușii halogenați au fost obținuți cu clorură de tionil în diclorometan în prezența 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazolului. Mai departe, cuplarea compușilor halogenați **7a-d** cu dietil-2-acetamidomalonat de dietil permite obținerea derivaților de dietil-2-acetamido-2-((heteroaril)metil)malonat **8a-d**. Printr-o hidroliză bazică blândă a dietil esterilor formați se obțin acizii 2-acetamido-2-((heteroaril)metil)malonici corespunzători **9a-d**, care mai departe au fost decarboxilați prin fierbere în toluen sau xilen cu formarea N-acetilaminoacizilor racemici *rac-10a-d*. În ultima etapă acizii 2-acetamido-3-(heteroaril)propanoici *rac-10a-d* au fost transformați chimic în esterii 2-acetamido-3-(heteroaril)propanoici racemici *rac-11a-d* cu diverși alcooli în THF în prezența carbonil diimidazolului, respectiv în 4-((heteroaril)-metil)-2-metiloxazol-5(4*H*)-onele racemice corespunzătoare *rac-12a-d* în prezența de dicitlohexilcarbodiimidă (DCC) în diclorometan; hidroliza grupărilor N-acetil din *rac-10a-d* în mediu acid a permis sinteza aminoacizilor analogi de fenilalanină racemici, *rac-13a-d* izolați prin precipitare la punctul izoelectric. Analiza HPLC a fost realizată cu un cromatograf HP 1200 cu coloana Astec Chirobiotic-Tag (4.6×250 mm) și un amestec de metanol și tampon TEAA (pH 4.1), 80:20 (v/v) ca eluent pentru separarea enantiomerilor **10,13a-d**, respectiv o coloana Chiralpak IA (4.6×250 mm) și un amestec de n-hexan și 2-propanol, 90:10 (v/v) ca eluent pentru **11-12a-d**, ambele la un debit de 1 mL/min.



Schema 4. Sinteza heteroaril alaninelor și a derivaților acestora

#### D. Sinteza cianohidrinelor heterocicliceracemice și a derivaților lor acetilați

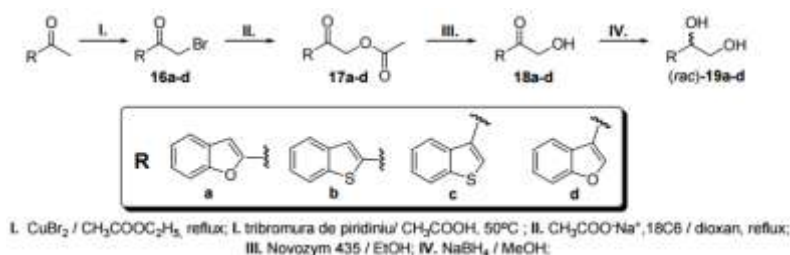
Sinteza cianohidrinelor racemice *rac*-**14a-d** din aldehidele corespunzătoare a fost realizată cu cianură de trimetil silil în prezența unei cantități catalitice de  $\text{ZnI}_2$  anhidru, în diclorometan. Prin acilarea chimică a cianohidrinelor racemice cu clorură de acetil în prezență de Py/DMAP au fost obținuți acetatii racemici ai cianohidrinelor, *rac*-**15a-d** (Schema 5). Analiza HPLC a fost realizată cu un cromatograf HP 1200 cu o coloana Chiralpak IA ( $4.6 \times 250$  mm) și un amestec de n-hexan și 2-propanol, 95:5 și 96:4 (v/v) ca eluent pentru **14-15a**, respectiv **14-15c**, cu o coloana Chiralpak IB ( $4.6 \times 250$  mm) și un amestec de n-hexan și 2-propanol, 91:10 (v/v) pentru **14-15d** sau cu o coloană Chiralcel OJ-H și un amestec de n-hexan și 2-propanol, 70:30 (v/v) ca eluent pentru **14-15b**, toate la un debit de 1 mL/min.



Schema 5. Sinteza cianohidrinelor racemice și a acetatilor acestora

#### E. Sinteza heteroaril-etandiolilor racemici printr-o metodologie chemoenzimatică

Pentru obținerea heteroariletandiolilor a fost utilizată o metodologie chemoenzimatică dezvoltată de noi, care utilizează metilcetonele aromatice (heteroariletanone) ca și materie primă. Astfel, heteroaril etanonele au fost  $\alpha$ - bromurate cu tribromură de piridiniu în acid acetic glacial.  $\alpha$ -Bromocetonele **16a-d** au fost mai departe transformate cantitativ în  $\alpha$ -acetoximetilcetonele **17a-d** cu acetat de sodiu în dioxan uscat folosind eterul coroana 18C6 ca și catalizator de transfer interfazic. Printr-o etanoliză enzimatică a  $\alpha$ -acetoximetilcetonele **17a-d** se obține cu randamente excelente  $\alpha$ -hidroximetil cetonele **18a-d**. În final acești compuși au fost transformați cu borohidruță de sodiu în heteroaril-etandiolii racemici (*rac*-**12a-d**) (Schema 6).



Schema 6. Sinteza chemoenzimatică a heteroaril-etandiolilor racemici *rac-12a-d*

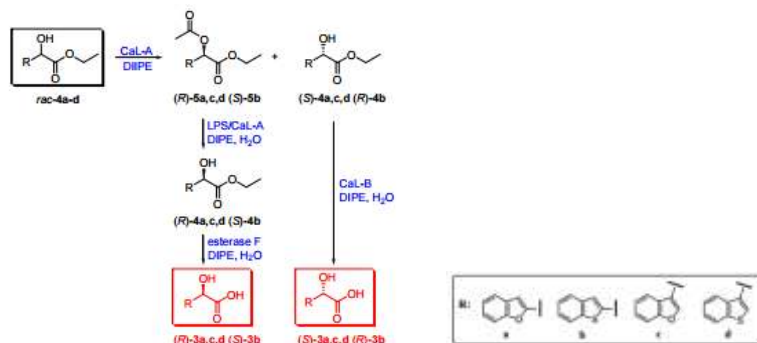
În acest caz s-a utilizat o coloană Chiralpak IB (0.46cm×25cm) și un amestec de n-hexanși 2-propanol, 90:10 (v/v) ca eluent pentru separarea enantiomerilor **19 a,c** respectiv 95:5 (v/v) pentru enantiomerii **19b,d** la un debit de 1 mL/min.

## ETAPA II- 2012: Investigarea proceselor de rezoluție ale unor racemați prin rezoluție cinetică enzimatică (EKR).

Au fost realizate EKR ale unor compuși heterociclici chirali

### A. REZOLUȚIA $\alpha$ -HIDROXIACIZILOR HETEROCICLICI

A fost studiată sinteza unor acizi 2-heteroaril-2-hidroxiaceticici de înaltă enantiopuritate (ee 99%), pornind de la esterii etilici ai acizilor 2-benzofuranil- și 2-benzo[b]tiofenil-2-hidroxiaceticici racemici. Sinteza derivaților esterici s-a realizat prin intermediul cianohidrinelor (Schema 7). Prin hidroliza cianohidrinelor s-au obținut acizii 2-heteroaril-2-hidroxiaceticici, *rac-3a-d*, care prin esterificare ulterioară au fost transformați în 2-heteroaril-hidroxiacetații de etil racemici *rac-4a-d*. 2-Acetoxy-heteroaril-2-acetații de etil racemici, *rac-5a-d*, au fost obținuți prin acilarea chimică a *rac-4a-d*.



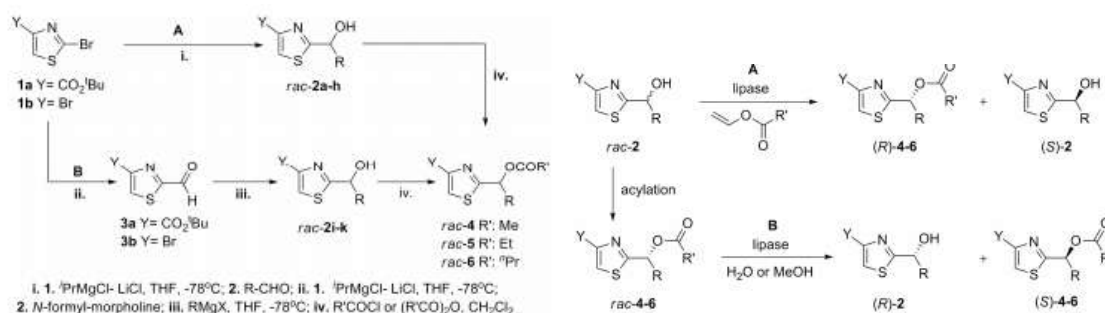
Schema 7. Obținerea  $\alpha$ -hidroxiacizilor prin EKR

Sinteza enantioselectivă mediată de lipaze a  $\alpha$ -hidroxiacizilor presupune *O*-acilarea  $\alpha$ -hidroxiacizilor *rac-3a-d*, respectiv hidroliza enantioselectivă a  $\alpha$ -hidroxiesterilor *rac-4a-d* și a diesterilor *rac-5a-d*. Configurația absolută a  $\alpha$ -hidroxiacizilor optici puri a fost determinată prin sinteza lor din (*R*)- și (*S*)-cianohidrinele corespunzătoare (cu configurație cunoscută) și compararea semnelor rotațiilor specifice ale  $\alpha$ -hidroxiacizilor obținuți prin aceste două metode. Folosind *rac-4a* ca și compus model, a fost optimizată acilarea enzimatică cu acetat de vinil atât ca agent de acilare cât și ca solvent, în prezența mai multor enzime, dintre care CaL-A a avut selectivitatea și activitatea cea mai bună. Dintre solvenții testați (polari, nepolari, aromatici și alifatici), cel mai eficient a fost DIPE. Deoarece lipazele își mențin enantiopreferința în reacțiile de hidroliză sau alcooliză, diesterii *rac-5a-d* au fost testați în acest scop. În timp ce alcooliza s-a dovedit a fi ineficientă, pentru reacțiile de hidroliză s-au găsit condițiile optime. După determinarea condițiilor optime pentru fiecare tip de reacție enzimatică, a fost realizată sinteza preparativă a acizilor (*R*)- și (*S*)-2-benzofuranil- și 2-benzo[b]tiofenil-2-aceticici de înaltă enantiopuritate (Schema 7) prin *O*-acilarea enzimatică mediată de CaL-A în DIPE a hidroxiesterilor

*rac-4a-d*, obținând (*R*)-**5a,c,d**/*(S)*-**5b** și (*S*)-**4a,c,d**/*(R)*-**4b**, urmată de hidroliza (*S*)-**4a,c,d**/*(R)*-**4b** în prezență de CaL-B (*S*)-selectivă în amestec DIPE-apă până la (*S*)-**3a,c,d**/*(R)*-**3b** corespunzători. Diesterii (*R*)-**5a,c,d**/*(S)*-**5b** au fost supuși hidrolizei mediate de LPS sau CaL-A cu formarea (*R*)-**4a,c,d**/*(S)*-**4b**, care au fost ulterior hidrolizați în prezența esterazei F (*R*)-selectivă la (*R*)-**3a,c,d**/*(S)*-**3b** corespunzători.<sup>1</sup>

## B. REZOLUȚIA UNOR ALCOOLI TIAZOLICI

Studiul a urmărit sinteza unor derivați de 4-carboxi- și 4-bromo-2-hidroxiimetiltiazol prin rezoluție cinetică mediată de enzime.<sup>2</sup> Studiul s-a realizat în două etape: sinteza chimică a 2-hidroxiimetiltiazolilor, respectiv rezoluția cinetică a substraturilor racemice mediată de hidrolaze, care include acilarea enantioselectivă a alcoolilor secundari *rac-2a-k* și hidroliza/metanoliza enantioselectivă a esterilor corespunzători *rac-4-6* (Schema 8).



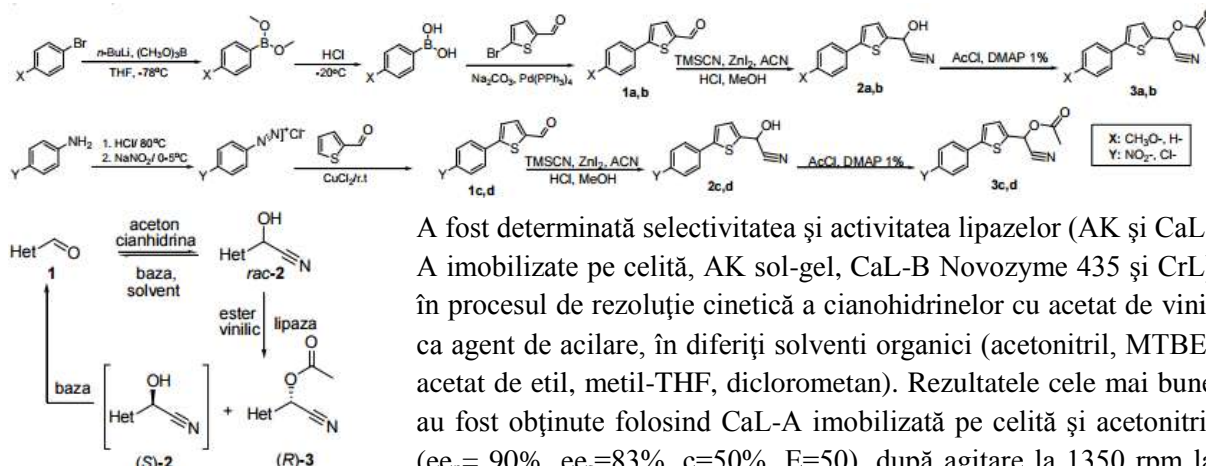
Schema 8. Rezoluție cinetică enzimatică a derivaților tiazolici

Pornind de la substraturile racemice, s-a realizat rezoluția cinetică asistată de hidrolaze în vederea obținerii alcoolilor enantiomeric puri. Mai întâi a fost testată o gamă largă de hidrolaze în reacția de acilare respectiv hidroliză/metanoliză: CaL A, CaL B, CRL, CCL, LPS, LAK, Lipaza F, PPL, PLE, Acylaza I, Penicilin G amidaza, Proteinaza 2A din *Aspergillus oryzae*, Proteaza PS din *Aspergillus meleus* și drojdia de bere. Drept agenți de acilare au fost testați acetatul-, propionatul- și butanoatul de vinil. Lipazele A și B din *Candida antarctica* (CaL A și CaL B) s-au dovedit a fi eficiente pentru *O*-acilarea enantioselectivă a alcoolilor *rac-2a-k* (Schema 8, A). În ceea ce privește hidroliza/metanoliza enantioselectivă a esterilor racemici *rac-4-6*, esteraza PLE și lipaza din *Candida rugosa* (CRL) au condus la cele mai bune rezultate (Schema 8, B). Dintre solvenții organici testați, polari și apolari, DIPE și MTBE s-au dovedit cei mai potriviți pentru ambele metode. Excesele enantiomeric și conversiile au fost determinate cu ajutorul HPLC folosind coloane chirale, iar configurația absolută prin derivatizarea substanțelor cu acizi Mosher și analiza diastereomerilor formați prin rezonanță magnetică nucleară.

## C. REZOLUTIA UNOR FENIL-TIOFENIL-CIANOHRIDRINE

Studiul are drept scop final sinteza unor esteri ai cianohidrinelor feniltiofenice de înaltă enantiopuritate folosind rezoluția cinetică dinamică (DKR). Metoda combină formarea *in situ*, catalizată de baze, a cianohidrinelor racemice pornind de la aldehydele corespunzătoare cu rezoluția cinetică *in situ* catalizată de lipaze și cu racemizarea *in situ* a enantiomerului mai puțin reactiv al cianohidrinei, catalizată de baze, permițând obținerea produsului optic pur pornind de la aldehydă, într-un singur vas de reacție (one-pot synthesis). Pentru sinteza aldehydelor feniltiofenice substituie, s-au utilizat două metode: p-nitro- și p-cloro-derivatul s-au obținut prin reacția Meerwein (cuplarea sari de diazoniu a anilinei substituie cu tiofen-2-carbaldehida în prezența clorurii de Cu), iar derivatul nesubstituit la nucleul aromatic și p-metoxi-derivatul au fost sintetizați prin reacția Suzuki (cuplarea grupării fenil, activată cu acizi boronici, cu 5-bromotiofen-2-carbadehida, în prezența unui catalizator de paladiu). Această metodă, spre deosebire de metoda Meerwein, are avantajul stereoselectivității reacției. Tiofen-2-carbaldehida fiind activată în poziția 5, cuplarea se face numai în poziția respectivă, în timp ce în

cazul nitro- și cloderivatului sarea de diazoniu poate să atace tiofen-2-carbaldehidă atât în poziția 5, cât și în poziția 3. Astfel se obțin izomeri de poziție, a caror separare ridică probleme. Aldehidele astfel obținute au fost transformate în cianohidrinele corespunzătoare cu trimetilsilil cianura în prezență de ZnI<sub>2</sub> în cantitate catalitică. Prin acilare chimică cu clorură de acetil, în prezență de DMAP, se obțin esterii racemici ai cianohidrinelor (Schema 9).



A fost determinată selectivitatea și activitatea lipazelor (AK și CaL-A imobilizate pe celită, AK sol-gel, CaL-B Novozyme 435 și CrL) în procesul de rezoluție cinetică a cianohidrinelor cu acetat de vinil ca agent de acilare, în diferiți solvenți organici (acetonitril, MTBE, acetat de etil, metil-THF, diclorometan). Rezultatele cele mai bune au fost obținute folosind CaL-A imobilizată pe celită și acetonitril ( $ee_p = 90\%$ ,  $ee_s = 83\%$ ,  $c = 50\%$ ,  $E = 50$ ), după agitare la 1350 rpm la 25°C timp de 3 ore.

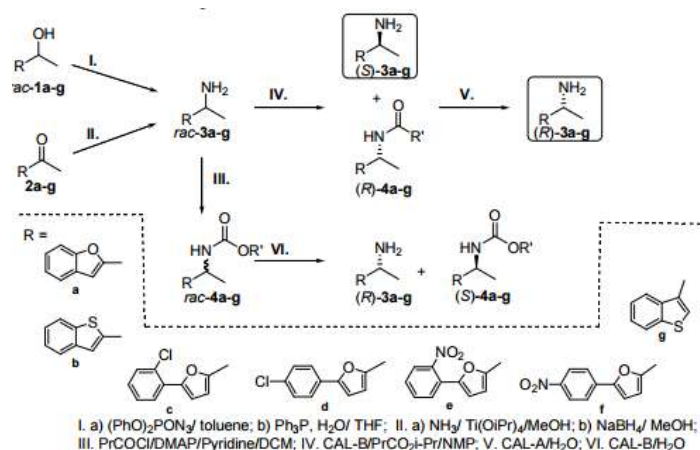
Schema 9. Sinteza și DKR a cianohidrinelor studiate

Dupa realizarea EKR, au fost efectuate și studii preliminare pentru procesul de rezoluție cinetică dinamică (DKR) din etapa următoare. DKR necesită prezența unei baze care să catalizeze aditia acidului cianhidric (generat *in situ* din aceton cianhidrină) la aldehydă, astfel că inițial am testat numeroase rășini bazice (Amberlit 400, IR4B, IRA 904, DMAP imobilizat) și amine organice solubile (dietilamina, trietilamina, difenilamina, *N,N*-dimetilanelina, DMAP, diizopropilamina, piridina), care fie au fost inactive, fie prea puternice, catalizând inclusiv acilarea chimică în absența enzimelor, sau inactivarea acestora. Trietilamina (0,01M) a dat rezultate promițătoare; totuși viteza racemizării cianohidrinei este mai mică decât viteza reacției de esterificare catalizată de enzimă. În continuare, ne-am propus să optimizăm metoda găsită, fie prin testarea unor aditivi pentru DKR, fie prin variația temperaturii de reacție.

#### D. REZOLUȚIA UNOR HETEROARILETANAMINE

S-a urmărit obținerea enantiomerilor unor benzofuran-, benzotiofen- și fenilfuraniletanamine printr-o metodologie chemoenzimatică (Schema 7).<sup>3</sup> Etapa stereoselectivă este un proces de EKR a aminelor racemice *rac*-**3a-g**. În această etapă au apărut două probleme: solubilitatea redusă a compușilor studiați în solvenți organici, respective instabilitatea heterociclorilor în etapa de hidroliza a amidelor (*R*)-**4a-g** pentru obținerea aminelor (*R*)-**3a-g**, care necesită în general mediu acid sau bazic și temperaturi ridicate. Aceste probleme au fost rezolvate prin utilizarea unor cosolvenți polari în etapa de EKR (NMP, *N*-metilpirolidona) și hidroliza enzimatică nestereoselectivă cu CAL A a amidelor (*R*)-**4a-g**. Astfel, ambii enantiomeri ai etanaminelor cu structura amintită au fost obținuți prin *N*-acilare enantioselectivă cu butanoat de izopropil ca și agent de acilare și solvent, mediate de Novozym 435, prin utilizarea NMP ca și cosolvent; la conversii de 50% (dupa 3-4 ore) s-au obținut ambii produși cu  $ee > 97\%$  ( $E > 200$ ). Reacția de deprotecare a butanamidelor (*R*)-**4a-g** și *rac*-**4a-g** în apă s-a realizat tot enzimatic, cu CAL-A-CLEA, cu randamente de 96-99%.





Schema 10. Sinteza și rezoluția cinetică enzimatică a heteroaril-etanaminelor heterociclice

### Procese biocatalitice cu enzime “anti-Kazlauskas”

Principalul dezavantaj al DKR cu lipaze este faptul că majoritatea acestora prezintă R-enantioselectivitate și astfel permite obținerea unui singur enantiomer din amestecul racemic. În scopul obținerii enantiomerului opus, care se impune în anumite situații, ne-am propus să studiem posibilitățile de a obține și utiliza în procesele de DKR studiate enzime cu selectivitate opusă, S-enantioselective, cunoscute și ca enzime “anti-Kazlauskas”. Cea mai des întâlnită enzima din această clasă este lipaza F, de aceea ne-am îndreptat atenția asupra ei.

În scopul obținerii lipazei F s-a realizat fermentația unor culturi de *Mucor hiemalis*, cunoscute pentru capacitatea lor de a produce lipaza F. Au fost parcurși în această etapă următorii pași: 1. Optimizarea procesului de creștere celulară (mediu de cultură, temperatură, pH, durată) 2. Izolarea și purificarea enzimei prin metodele clasice: a. Purificarea grosieră prin precipitare cu sulfat de amoniu sau acetonă; b. Purificarea avansată prin metode cromatografice (cromatografie de excluziune sterică, hidrofobă și pe schimbători de ioni); 3. Caracterizarea lipazei izolate, respectiv: a. determinarea omogenității prin SDS-PAGE; b. determinarea activității enzimatice prin metoda hidrolizei esterilor p-nitro-fenolului; 4. Testarea potențialului biocatalitic al lipazei obținute în procesele de rezoluție cinetică. Rezultatele obținute până în acest moment au demonstrat că cel mai eficient preparat enzimatic obținut este produsul brut obținut prin precipitare cu acetonă (raport 1:5, v/v) după răcire la 4°C timp de 12 h. Acesta prezintă o activitate enzimatică relativ ridicată și o stabilitate îndelungată. Orice încercare de purificare prin cromatografie a preparatului enzimatic brut a condus la obținerea unor soluții cu activitate enzimatică mai redusă și cu stabilitate diminuată, astfel încât cheltuielile implicate de o purificare avansată nu se justifică. Testarea pudrei acetonică pe câteva substraturi model arată însă că, deși lipaza izolată prezintă enantioselectivitatea opusă dorită, respectiv S, aceasta este totuși modestă (ee 55-82%) iar activitatea enzimatică redusă (conversii de maxim 10% după 12 ore) și în concluzie utilizarea ei în procese de EKR sau DKR nu este avantajoasă din punct de vedere economic.

### 2013: Dezvoltarea unor metode de imobilizare a lipazelor pentru aplicații în regim continuu

Obiectivul major al acestei etape îl reprezintă obținerea unor biocatalizatori, enzime imobilizate, capabile să realizeze transformările urmărite (rezoluția enzimatică cinetică dinamică- **DKR**) în condiții avantajoase din punct de vedere economic, pretabile la transpunerea la scară mare în bioreactoare cu funcționare continuă. Ca element de noutate

menționăm de la început imobilizarea unor lipaze pe nanotuburi de carbon, caracterizarea acestor noi biocatalizatori și testarea lor în procese de rezoluție cinetică enzimatică- **EKR**.

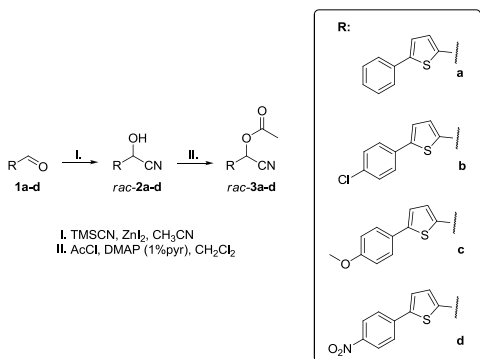
În scopul realizării DKR este necesară și determinarea condițiilor optime pentru racemizarea *in situ* a substratului, după ce procesul de EKR a fost optimizat. Procesul studiat a fost transformarea unor cianohidrine din seria 5-feniltiofenului.

Cianohidrinele optic active sunt intermediari versatili pentru sinteza unei varietăți mari de compuși valoroși, cum ar fi: aminoacizii, hidroxiacizii, etc. În acest scop au fost dezvoltate o gamă variată de metode de sinteză chimică și enzimatică. Deosebit de atractive sunt în acest context metodele enzimatică deoarece ele permit obținerea unor enantioselectivități superioare, chiar și prin utilizarea unor preparate enzimatică disponibile comercial la prețuri accesibile.

Metodele enzimatică pot fi sistematizate în următoarele trei categorii:

1. adiția HCN la aldehide în prezența oxinitrilazelor ca și catalizatori chirali;
2. rezoluția cinetică enzimatică a cianohidrinelor racemice mediata de lipaze;
3. rezoluția cinetică dinamică a cianohidrinelor racemice.

În scopul elaborării unui proces eficient de rezoluție cinetică dinamică este necesar să fie îndeplinite următoarele criterii: 1. Rezoluția cinetică să fie foarte selectivă ( $E > 20$ ), iar condițiile de lucru să asigure ireversibilitatea reacției; 2. racemizarea să fie rapidă, de cel puțin 10 ori mai rapidă decât reacția enzimatică de transformare a enantiomerului mai puțin reactiv; 3. Catalizatorul bazic să nu reacționeze cu produsul reacției enzimatică; 4. Racemizarea să poată fi realizată în condițiile reacției enzimatică.



Schema 11. Sinteza cianohidrinelor și acetatilor racemici

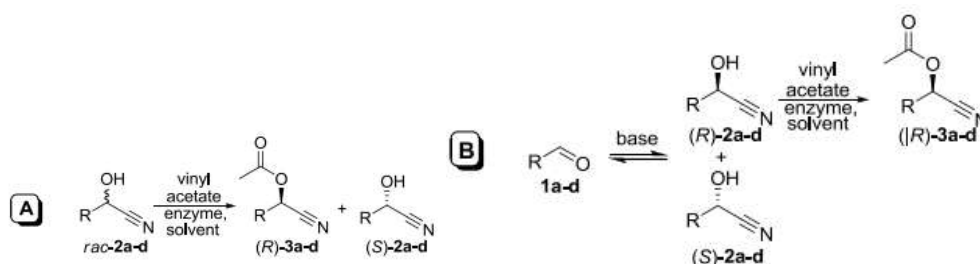
În cazul studiat, realizarea sintezei cianohidrinei în condiții bazice este un avantaj deoarece permite îndeplinirea tuturor acestor condiții. În schema 11 este prezentată sinteza cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* studiate din aldehidele corespunzătoare **1a-d** și acilarea lor la acetatii racemici *rac-3a-d*.

Au fost testate mai multe lipaze disponibile comercial pentru EKR a cianohidrinelor. Cea mai bună enantioselectivitate s-a obținut cu lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B, Novozym 435), din *Pseudomonas fluorescens* (AK) adsorbită pe Celită (ee<sub>p</sub> = 98% și ee<sub>s</sub> = 72% la c = 42% după 3 h, în MTBE). La utilizarea lipazei A din *Candida antarctica* imobilizată pe celită reacția a fost rapidă și selectivitatea relativ bună (ee > 83%) la o conversie de 48% pentru ambii produși.

A fost studiată prepararea acetatului cianohidrinei **3a** din aldehida **1a** și acetoncianohidrină ca sursă de HCN, conform Schemei 12B. Acetatul de vinil a fost un agent de acilare convenabil, deși studiile anterioare au susținut necesitatea folosirii acetatului de izopropanol. O explicație posibilă a eficienței reduse ar putea fi cantitatea de bază utilizată, prezentată deja în literatură pentru cazul mandelonitrilului. Și în cazul nostru, acidul acetic eliberat în reacția de *O*-acilare



datorită apei prezente în enzimă poate neutraliza parțial baza și astfel determină scăderea eficienței procesului de rezoluție cinetică dinamică.



Schema 12. A. Acilarea enzimatică a cianohidrinelor racemice *rac*-**2a-d**; B- sinteza one pot a (*R*)-**3a-d** prin DKR

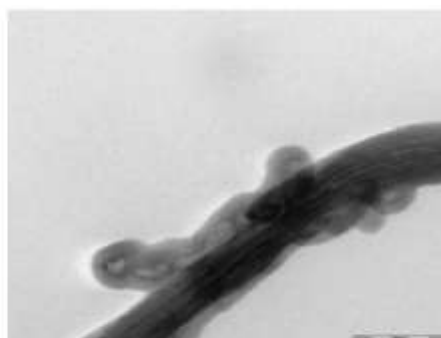
Printre bazele testate care nu au dat rezultate, amintim: sefaroza, difenilamina, *N,N*-dimetilamina, Amberlite IR-4B, urea, guanidina, piridina și silicagelul.

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

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



1. Imaginea TEM a CaL-A imobilizata pe SWCNT



2. Imaginea TEM a L-AK imobilizata pe SWCNT

#### B. Rezoluția cinetică enzimatică a *rac*-**2a-d** cu acetat de vinil și lipazele imobilizate

În soluția *rac*-**2a-d** (2.5 mg) în solventul organic testat se adaugă acetat de vinil (4 μL) și lipaza (12.5 mg). După perfectare sub agitare pentru 3 ore la temperatura camerei, probe diluate se analizează pe HPLC.

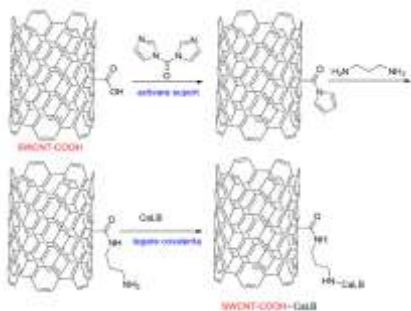
#### C. Rezoluția cinetică dinamică enzimatică a **1a-d**

Aldehida **1a-d** (0.013 mmol, 2.5mg), cianohidrina acetonei (0.065 mmol, 5μL), baza testată și acetatul de vinil (0.052 mmol, 4.9 μL) se amestecă cu CaL-A pe Celită în acetonitril și reacția se perfectează la 25 °C și 1340 rpm. Probele prelevate periodic se analizează cromatografic.

## 2014: DEZVOLTAREA PROCESELOR DE REZOLUȚIE CINETICĂ ENZIMATICĂ DINAMICĂ

### a. Studiul performanțelor enzimelor imobilizate recuperate în vederea recirculării

În studiile efectuate în scopul obținerii unor enzime imobilizate cu o activitate și selectivitate ridicată, care să poată fi recuperate și recirculate de un număr mare de ori cu păstrarea proprietăților catalitice, s-a realizat imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* pe nanotuburi de carbon (Single Wall Carbon NanoTube) funcționalizate cu grupări carboxilice. (SWCNT<sub>COOH</sub>).

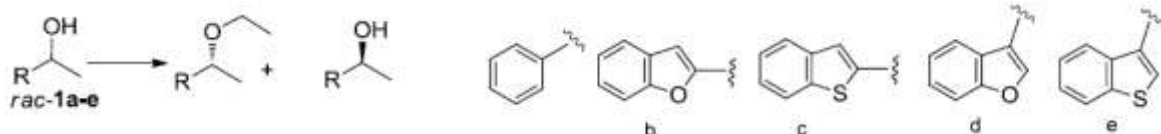


Pentru a fi posibilă legarea unei proteine de grupările funcționale prezente în structura nanomaterialului, se impune o activare prealabilă a funcțiunii carboxilice (cu *N,N'*-carbonildiimidazol) iar pentru a asigura o mobilitate corespunzătoare enzimei și de a se evita interacțiunile neproductive cu suportul, care pot duce la scăderea semnificativă sau chiar pierderea activității catalitice, s-a introdus și o grupare distanțoare (*spacer arm*) prin intercalarea 1,3-propilendiaminei între suportul testat și enzimă, prin reacțiile prezentate în schema 13.

**Schema 13.** Imobilizarea CaL-Bpe pe SWCNT funcționalizate cu grupări carboxilice. (SWCNT-<sub>COOH</sub>)

Suportul SWCNT-<sub>COOH</sub> (40 mg) s-a incubat cu carbonil diimidazol (200 mM) în 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sub agitare la 1350 rpm, peste noapte, la temperatura camerei, cu sonicare ocazională, pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotub. După incubare proba a fost filtrată pe membrane și spălată cu CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La produsul solid rezultat s-a adăugat propilen-1,3-diamină în apă distilată iar suspensia s-a agitat la temperatura camerei peste noapte cu ultrasonare ocazională pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotub. Materialul rezultat după filtrare și spălare cu apă distilată s-a introdus într-o soluție de CaLB (20 mg) în tampon fosfat cu pH 7. Suspensia a fost incubată sub agitare la 1350rpm peste noapte la temperatura camerei, cu sonicare ocazională. După imobilizare, biocatalizatorul rezultat (SWCNT<sub>COOH</sub>-CALB) a fost izolat prin filtrare pe filtru cu membrană și spălat cu apă. Uscarea finală s-a realizat prin liofilizare.

Randamentul de imobilizare s-a calculat prin determinarea activității enzimatică a soluției apoase de enzimă înainte și după efectuarea imobilizării, respectiv a apelor de spălare. 2



**Schema 14.** Rezoluția cinetică a alcoolilor racemici mediată de SWCNT<sub>COOH</sub>-CALB

Acilarea enzimatică a alcoolilor racemici s-a efectuat folosind ca și agent de acilare acetat de vinil, iar ca solvent *n*-octan. Reacțiile au fost perfectate sub agitare la 1350 rpm, la temperatura camerei timp de 24 de ore. Enzima a fost izolată prin filtrare. Excesele enantiomerice și conversiile au fost determinate prin cromatografie de lichide sau gaze,

folosind coloanele chirale adecvate, obținându-se rezultate promițitoare, prezentate succint în Tabelul 1.

**Tabelul 1.** Conversia și excesele enantiomerice a reacțiilor catalizate de SwCNT<sub>COOH</sub>-CALB

Substrat	Timp (h)	c (%)	ee <sub>c</sub>	ee <sub>p</sub>
<i>rac-1a</i>	24	50	95	94
<i>rac-1b</i>	24	45	79	99
<i>rac-1c</i>	24	37	53	92
<i>rac-1d</i>	24	43	70	92
<i>rac-1e</i>	24	26	35	98

### Efectul spacer-ului

Pentru a studia efectul lungimii grupării distanțoare, introdusă în a treia etapă, au fost testate diamine de diferite dimensiuni: 1,3-diaminopropan, 1,7-diaminoheptan respectiv 1,8-diaminooctan. biocatalizatorii obținuți au fost testați în reacții de acilare enzimatică, folosind ca și substrat *rac-1a*, acetatul de vinil ca agent de acilare și *n*-octan ca solvent în prezența de site moleculare. Cele mai bune rezultate s-au obținut când 1,3-diaminopropanul a fost folosit ca spacer-arm.

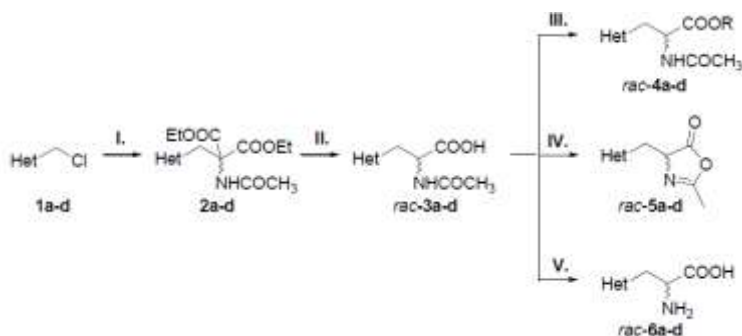
### Reutilizabilitatea SWCNT<sub>COOH</sub>-CALB

Pentru a testa reutilizabilitatea enzimei imobilizate, s-a folosit ca și substrat *rac-1a*, agent de acilare acetat de vinil și solvent octan. Reacțiile au fost perfectate sub agitare la 1350rpm, la temperatura camerei timp de 24 de ore, iar enzima a fost separată prin filtrare. După spălare cu *n*-octan preparatul imobilizat a fost reutilizat în aceleași condiții. În toate cazurile s-au obținut conversii și selectivități ridicate, deci enzima astfel imobilizată a putut fi reutilizată de mai multe ori fără pierderi semnificative ale proprietăților catalitice.

### b. Determinarea agenților de racemizare optimi pentru fiecare tip de substrat Studiul compușilor acizi și bazici ca agenți de racemizare

A fost studiată sinteza chemoenzimatică a unor L-(2-ariltiazol-4-il)alanine, pornind de la derivații racemici *N*-acetil corespunzători, prin combinarea a două etape enzimatiche stereoselective: rezoluția cinetică dinamică mediată de lipaze a oxazol-5(4*H*)-onelor urmată de hidroliza catalizată de Acilaza 1. Această procedură a condus la obținerea aminoacizilor de interes cu randamente bune (55-58%) și enantiopurități foarte ridicate (*ee*>99%).

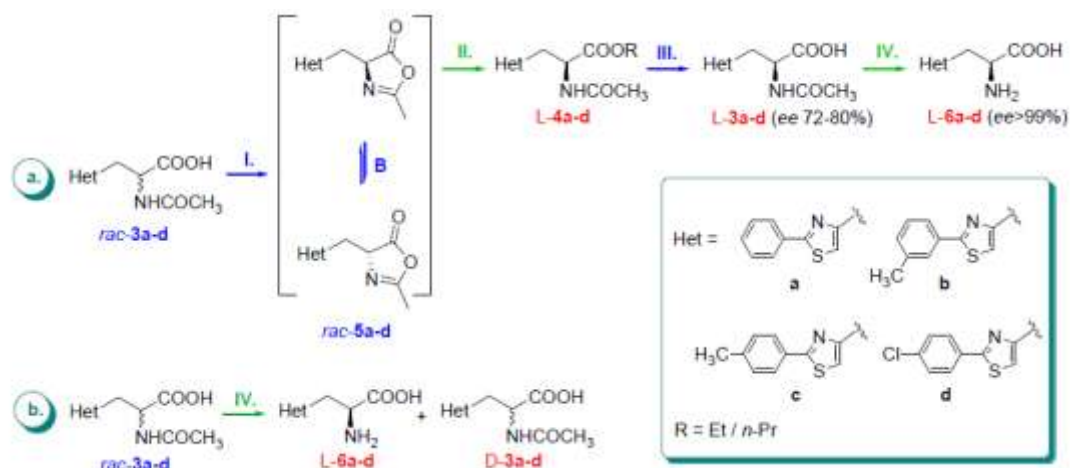
Sinteza 2-ariltiazol-4-il alaninelor și a derivaților acestora este descrisă în Schema 15.



Reactivi și condiții: I. NaH, CH<sub>3</sub>CONHCH(COOEt)<sub>2</sub>/DMF, 60°C; II. a). 10% KOH, reflux, 4h; b). toluen, reflux, 2h; III. Alcool (MeOH, EtOH, *n*-PrOH, *n*-BuOH), CDI/THF; IV. DCC/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; V. 18% HCl, reflux, 4h.

*Schema 15. Sinteza 2-ariltiazol-4-il alaninelor racemice și a derivaților acestora.*

Acizii 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici racemici *rac-3a-d* au fost utilizați ca materii prime pentru sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor (Schema 15a). Oxazol-5(4H)-onele *rac-5a-d* au fost folosite ca substraturi în procesul enzimatic de DKR, în prezența unor alcooli ca și nucleofili. Esterii L-2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici L-4a-d rezultați au fost supuși reacției de hidroliză în condiții bazice blânde, derivații N-acetil astfel obținuți L-3a-d, fiind deprotejați la aminoacizii corespunzători L-6a-d prin hidroliza enantioselectivă a legăturii amidice în prezența Acilazei 1.



Reactivi și condiții: **I.** DCC/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; **II.** CaL-B, etanol (pentru DKR a *rac-5a-c*) / *n*-Propanol (pentru DKR a *rac-5d*), acetonitril; **III.** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, reflux; **IV.** Acilaza I, pH 7-8.

*Schema 16. a).Sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor și a derivaților acestora (scară preparativă). b). Rezoluția cinetică enzimatică a rac-3a-d*

Inițial s-a studiat procesul de DKR enzimatic al oxazol-5(4H)-onelor *rac-5a-d*. Pentru identificarea condițiilor optime în care acesta decurge s-au testat o serie de enzime, nucleofili, solvenți și catalizatori de racemizare în reacția de deschidere enantioselectivă a inelului oxazolononic a compusului model *rac-5a*. În scopul investigării stereoselectivității reacțiilor enzimatică s-a realizat separarea cromatografică a enantiomerilor compușilor *rac-3-6a-d* utilizând diferite coloane HPLC chirale și faze mobile adecvate.

Intr-o primă fază a fost investigată alcooliza *rac-5a* în prezența a diferite lipaze și alcooli. Dintre lipazele testate doar două au prezentat rezultate satisfăcătoare: Lipozyme din *Mucor miehei* a prezentat stereoselectivitate moderată (44.3% ee) iar CaL-B (Novozyme 435) a manifestat enantioselectivitate mai ridicată (72% ee) când s-a utilizat etanolul drept nucleofil. Prin urmare, lipaza CaL-B a fost aleasă pentru studiile ulterioare. În continuare, s-au testat diverși solvenți întrucât este cunoscut faptul ca aceștia pot influența semnificativ stereoselectivitatea reacțiilor enzimatică. S-a observat o viteză de racemizare scăzută ceea ce a condus la scăderea semnificativă a enantiopurității produșilor DKR.

S-a urmărit creșterea vitezei de racemizare a procesului prin utilizarea unor catalizatori bazici de racemizare. Trietilamina și piridina s-au dovedit a fi ineficiente în procesul studiat, de aceea s-a decis utilizarea unui catalizator bazic imobilizat, evitând astfel alterarea situsului activ al enzimei de către acesta. Dietilaminoetanolul imobilizat pe nanotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxil a condus la creșterea vitezei de racemizare

fără a afecta stereoselectivitatea reacției. Astfel, s-a studiat procesul de DKR a *rac-5a* mediat de CaL-B în prezența agentului de racemizare și în diferiți solvenți, în unele cazuri observându-se creșterea enantiopurității produșilor. Cele mai bune rezultate au fost obținute utilizând acetonitrilul drept solvent și etanolul ca și nucleofil. Având aceste condiții optime identificate pentru DKR a compusului model *rac-5a*, s-a realizat DKR și pentru celelalte substraturi, *rac-5b-d*. Rezultate similare au fost obținute pentru oxazolonele *rac-5b,c* când s-au utilizat etanolul și acetonitrilul iar pentru *rac-5d* cele mai bune rezultate au fost obținute folosind *n*-propanol în acetonitril.

Folosind condițiile optime identificate la scară analitică s-a realizat apoi DKR a *rac-5a-d* la scară preparativă, produșii *L-4a-d* au fost obținuți cu randamente bune (77-81%) și excese enantiomerice ridicate (73-76%) (Tabelul 2).

**Tabelul 2.** Rezoluția cinetică dinamică a *rac-5a-d* mediată de CaL-B, în prezență de acetonitril, diferiți alcooli și dietilaminoetanol imobilizat (scară analitică)

Nr. crt.	Substrat	Alcool	Produs	ee <sub>n</sub> %
1.	<i>rac-5a</i>	Metanol	L-3a metil ester	70.2
2.	<i>rac-5a</i>	Etanol	L-3a etil ester	80.0
3.	<i>rac-5a</i>	<i>n</i> -Propanol	L-3a <i>n</i> -propil ester	76.2
4.	<i>rac-5a</i>	<i>n</i> -Butanol	L-3a <i>n</i> -butil ester	58.0
5.	<i>rac-5b</i>	Etanol	L-3b etil ester	78.3
6.	<i>rac-5c</i>	Etanol	L-3c etil ester	78.1
7.	<i>rac-5d</i>	<i>n</i> -Propanol	L-3d <i>n</i> -propil ester	80.1

Produșii DKR cu enantiopuritate ridicată *L-4a-d* au fost în continuare supuși reacțiilor de hidroliză chimică bazică fără a fi afectată enantiopuritatea acestora (verificat prin HPLC). În scopul creșterii enantiopurității compușilor finali, derivații *N*-acetil *L-3a-d* au fost supuși unei etape de hidroliză enzimatică enantioselectivă în prezența Acilazei 1 obținându-se astfel heteroaril-alaninele *L-6a-d* în formă enantiopură (ee>99%) (Schema 15b). Randamentele globale și rotațiile optice specifice ale *L*-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor sunt prezentate în Tabelul 3.

**Tabelul 3.** Randamente globale și rotații specifice ale *L*-2-ariltiazol-4-il alaninelor *L-6a-d*, obținute prin DKR a *rac-5a-d* mediată de CaL-B urmat de hidroliza enantioselectivă a *L-3a-d* catalizată de Acilaza 1.

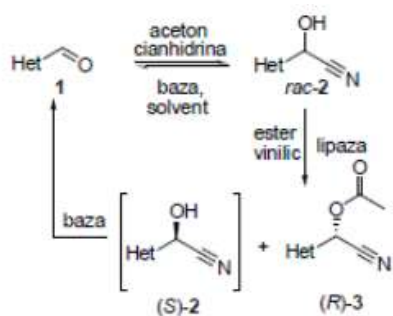
Nr. crt.	Produs <sup>a</sup>	Randament global (%)	[α] <sub>D</sub> <sup>28</sup>
1.	L-6a	56	-0.20 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 5mg/mL)
2.	L-6b	58	-0.26 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 5mg/mL)
3.	L-6c	55	-0.27 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 5mg/mL)
4.	L-6d	57	-0.07 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 1mg/mL)

<sup>a</sup>ee>99% în toate cazurile

**B. REZOLUȚIA CINETICĂ DINAMICĂ MEDIATĂ DE LIPAZE A UNOR FENILTIOFENIL-CIANOHRIDRINE** În acest studiu s-a urmărit sinteza unor esteri ai cianohidrinelor cu schelet feniltiofenic de puritate optică ridicată prin intermediul rezoluției cinetice dinamice. Pentru a investiga stereoselectivitatea reacțiilor în care sunt implicați 2-



hidroxi-2-(5-feniltiofen-2-il)acetonitrilii și esterii acestora, inițial s-a stabilit metoda de separare cromatografică a enantiomerilor acestora.



Schema 17. Procesul de DKR a *rac-2a* drept compus model. Majoritatea cianohidrinelor studiate

În scopul obținerii cianohidrinelor și a esterilor acestora cu purități optice ridicate s-au testat o serie de lipaze comerciale în diferiți solvenți organici în reacția de acilare enantioselectivă a *rac-2*-heteroaril-2-hidroxi-acetonitrililor *rac-2a-d* cu acetat de vinil drept donor de acil ireversibil. Inițial, s-au realizat reacțiile la scară analitică folosind enzimelor testate (CaL-B, AK-sol-gel, CrL) au fost inactive după 3 ore.

Lipaza AK (din *Pseudomonas fluorescens*) imobilizată pe Celită a prezentat enantioselectivitate și activitate bune ( $ee_p = 98\%$  și  $ee_s = 72\%$  la  $c = 42\%$  după 3 h, în MTBE) dar utilizând lipaza CaL-A (*Candida antarctica*) imobilizată pe Celită atât activitatea cât și enantioselectivitatea au fost îmbunătățite ( $ee > 83\%$  pentru ambii produși de reacție la  $c = 48\%$ ). Raportul optim substrat/biocatalizator identificat este 1:5 (w/w). S-au testat o serie de solvenți organici anhidriificați, acilarea selectivă a *rac-2a* cu acetat de vinil în prezența lipazei L-AK decurgând cel mai bine în MTBE (Tabelul 11). Au fost investigați de asemenea și diferiți agenți de acilare. Etil-metoxiacetatul, etil-etoxiacetatul și vinil pivaloatul s-au dovedit a fi inactivi pentru biotransformarea studiată. La utilizarea izopropenil-acetatului în ACN nu s-au observat modificări semnificative ale activității sau stereoselectivității reacției ( $ee_p = 81\%$  la  $c = 20\%$  după 42 h) față de cazul când s-a folosit acetat de vinil.

În continuare, pornind de la condițiile optime identificate pentru rezoluția cinetică a *rac-2a-d*, s-a studiat rezoluția cinetică enzimatică dinamică a acestora. În acest sens au fost testate o varietate de baze drept agenți de racemizare in situ a enantiomerului mai puțin reactiv. Metoda exploatează natura reversibilă a reacției de formare a cianohidrinelor (catalizată de o bază) din aldehydele corespunzătoare. Dintre bazele testate (trietilamina, dietilamina, dietanolamina, diizopropilamina, *N,N*-dimetilamina, difenilamina, uree, piridină, guanidină, Amberlit-IR-4B) rezultate promițătoare au fost obținute când s-a utilizat  $Al_2O_3$  bazic drept agent de racemizare.

Condițiile optime identificate pentru DKR a compusului model *rac-2a* au fost aplicate și celorlalte cianohidrine *rac-2b-d* (Tabelul 4).

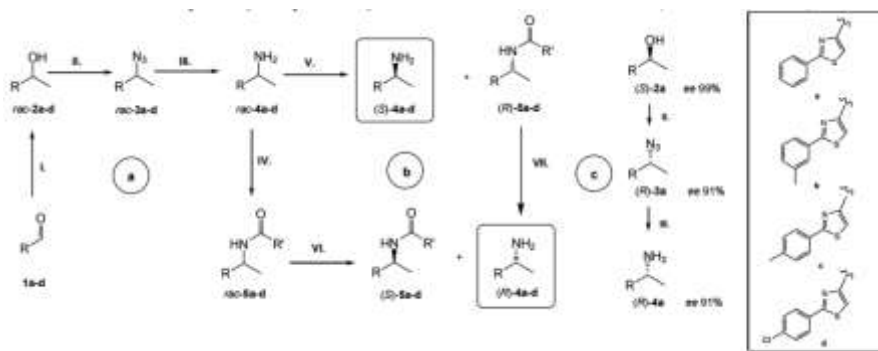
**Tabelul 4.** DKR a *rac-2a-d* mediat de L-AK, în prezența acetatului de vinil, a  $Al_2O_3$ . în MTBE la 30°C

Substrat	Timp (h)	$c$ (%)	$ee_p$ (%)	$ee_s$ (%)
<i>rac-2a</i>	7	99	92	87
<i>rac-2b</i>	8	99	88	85
<i>rac-2c</i>	7	99	91	86
<i>rac-2d</i>	9	99	88	82



### c. Studiul catalizatorilor metalici ca agenți de racemizare

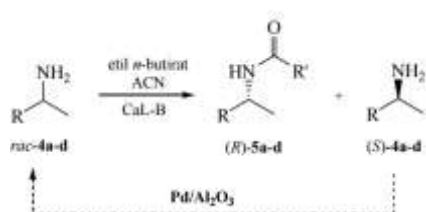
A. REZOLUȚIA CINETICĂ DINAMICĂ A UNOR FENIL-TIAZOLILETANAMINE  
 Studiul efectuat a urmărit sinteza unor fenil-tiazolil-etanamine de înaltă puritate optică printr-o procedură chemoenzimatică. Astfel, s-a dezvoltat o procedură enzimatică nouă utilizând lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată (Novozyme 435) în rezoluția cinetică a etanaminelor *rac-4a-d* prin reacția de *N*-acilare și în rezoluția cinetică a etanamidelor corespunzătoare *rac-5a-d* prin reacția de hidroliză. Totodată, s-a studiat și rezoluția cinetică dinamică a heteroaril-etanaminelor prin cuplarea lipazei CaL-B cu un catalizator metalic de racemizare ( $\text{Pd}/\text{Al}_2\text{O}_3$ ) în reacția de *N*-acilare selectivă. S-a studiat sinteza aminelor *rac-4a-d* pornind de la aldehidele corespunzătoare **1a-d** urmărind metodele descrise în literatura de specialitate. Astfel, etanolii racemici *rac-2a-d* obținuți prin reacția Grignard au fost transformați în aminele *rac-4a-d* prin intermediul azidelor *rac-3a-d*. Amidele *rac-5a-d* au fost sintetizate prin acilare chimică cu clorură de butiril în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , în prezență de piridină și o cantitate catalitică de DMAP (Schema 18, ruta a)



Reactivi și condiții: I.  $\text{CH}_3\text{MgI}$ , dietil eter; II.  $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$ /toluen; III.  $\text{Zn}/\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{etanol}$ ; IV.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COCl}/\text{DMAP}/\text{piridină}/\text{DCM}$ ; V.  $\text{CaL-B}/\text{etil n-butirat}/\text{ACN}$ ,  $23^\circ\text{C}$ ; VI.  $\text{CaL-B}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $45^\circ\text{C}$ ; VII.  $\text{CaLA}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $45^\circ\text{C}$ .

Schema 18. Sinteza 1-(2-feniltiazol-4-il)etanaminelor studiate și a etanacetamidelor corespunzătoare.

În scopul determinării condițiilor optime de reacție care să conducă la obținerea enantiomerilor de puritate optică ridicată și cu conversii mari, s-au testat o serie de lipaze comerciale în diferiți solvenți organici în reacția de *N*-acilare enantioselectivă a compusului model *rac-4a*, folosind drept donori de grupare acil acetatul de etil, izopropil butiratul, etil nbutiratul și etil propionatul. În urma screening-ului efectuat, lipazele CRL, PS și AK pe Celită s-au dovedit a fi inactivate din punct de vedere catalitic chiar și după 28 de ore, în toate cazurile investigate, în timp ce lipaza CaL-A, fie nu a prezentat activitate catalitică, fie a manifestat selectivitate redusă în MTBE în reacțiile de acilare cu izopropil butiratul și cu *n*-butirat de etil. Cea mai ridicată enantioselectivitate ( $E \gg 200$ ) și reactivitate ( $c = 50\%$ ) s-a obținut după 16 ore în reacția de *N*-acilare a *rac-4a* cu *n*-butirat de etil în ACN uscat în prezența lipazei CaL-B. Utilizând condițiile optime determinate pentru rezoluția cinetică enzimatică a feniltiazolil-etanaminelor de interes s-au investigat condițiile care conduc la racemizarea in situ a enantiomerului mai puțin reactiv în scopul realizării unei DKR (Schema 20). Literatura de specialitate prezintă procese de DKR a aminelor care utilizează cu succes catalizatori pe bază de Pd în etapa de racemizare. Astfel, s-au testat trei catalizatori: Pd depus pe cărbune, Pd depus pe alumină și Pd depus de  $\text{BaSO}_4$  în reacția de acilare a *rac-4a* cu *n*-butirat de etil, în ACN, în prezența lipazei CaL-B la diferite temperaturi.



Schema 19. Rezoluția cinetică dinamică a etanaminelor

În scopul obținerii celorlalți enantiomeri [(*S*)-enantiomerii] ai 1-(2-feniltiazol-4- il)etanaminelor s-a studiat rezoluția cinetică enzimatică a *rac*-5a-d (Schema 18, ruta b). În acest sens s-au testat activitatea și enantioselectivitatea a 4 preparate enzimatică de CaL-A și CaL-B în reacția de hidroliză a compusului model *rac*-5a. Reacțiile la scară analitică s-au realizat în apă, la temperatura camerei (23°C) și la 45°C.

Toate reacțiile de hidroliză mediate de CaL-B s-au dovedit a fi înalt enantioselective, cea mai bună activitate atingându-se cu Novozyme 435 la 45°C. Lipaza CaL-A (sub formă liberă și imobilizată pe Celită) s-a dovedit a fi activă din punct de vedere catalitic dar neselectivă pentru biotransformarea studiată. În ceea ce privește reactivitatea, CaL-A imobilizată pe Celită, în reacția realizată la 45°C a dat cele mai bune rezultate. Aminele (*R*)-4a-d au putut fi obținute și prin deprotejarea amidelor (*R*)-5a-d în apă la 45°C (60 de ore). Condițiile optime găsite pentru rezoluțiile cinetice enzimatică ale *rac*-4a și *rac*-5a au fost aplicate în continuare și celorlalte substraturi *rac*-4,5b-d. Configurația absolută a feniltiazolil-etanaminelor optice pure a fost determinată sintetizând amina (*R*)-4a pornind de la alcoolul (*S*)-2a (de configurație cunoscută, Schema 18, ruta c) și comparând semnele rotațiilor specifice ale etanaminelor obținute prin aceste două metode. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5.<sup>4</sup>

Tabelul 5. DKR și KR a *rac*-4,5a-d la scară preparativă

Compus	$\eta$ (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> (%)	$[\alpha]_D^{25}$	<i>E</i>	Compus	$\eta$ (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> (%)	$[\alpha]_D^{25}$	<i>E</i>
( <i>S</i> )-4a	97	> 99	-6.2	» 200	( <i>R</i> )-4a	96	> 99	+6.4	» 200
( <i>R</i> )-5a	97	> 99	+175.9		( <i>S</i> )-5a	96	> 99	-176.4	
( <i>S</i> )-4b	95	> 99	-8.4	» 200	( <i>R</i> )-4b	93	> 99	+8.5	» 200
( <i>R</i> )-5b	95	> 99	+164.2		( <i>S</i> )-5b	93	98	-164.8	
( <i>S</i> )-4c	93	> 99	-18.3	» 200	( <i>R</i> )-4c	94	> 99	+18.8	» 200
( <i>R</i> )-5c	96	> 99	+148.8		( <i>S</i> )-5c	96	96	-147.4	
( <i>S</i> )-4d	93	82	-11.0	125	( <i>R</i> )-4d	91	98	+10.8	> 200
( <i>R</i> )-5d	93	96	+151.2		( <i>S</i> )-5d	95	94	-149.7	

## ASPECTE ALE UNOR MECANISME DE CATALIZĂ ENZIMATICĂ PENTRU TRANSFORMAREA SUBSTRATURILOR SĂRURI CUATERNARE DE AMONIU

Pentru a investiga rolul unor resturi de aminoacizi (încărcați cu sarcină electrică și aromatici) în legarea liganzilor și mecanismul de acțiune al unor enzime implicate în biosinteza fosfolipidelor (fosfocolin-citidiltransferaza și colin-kinaza din *Plasmodium falciparum*) s-au realizat o serie de mutații punctiforme în scopul modulării caracterului resturilor aromatice și a celor încărcate electric, care influențează interacțiunile de tip cationelectroni  $\pi$ . Comparând structurile cuaternare ale situsurilor de legare a sărurilor cuaternare de amoniu s-a evidențiat un model de interacțiune de tip “composite aromatic box” pentru situsul de recunoaștere a enzimei, bine diferențiat de modelul de interacțiune tip “aromatic box” pentru situsul de recunoaștere a receptorilor (Figura 1)

Studiul efectuat a permis identificarea unei arhitecturi generale pentru situsul activ al enzimelor care catalizează transformarea substraturilor pe bază de săruri cuaternare de amoniu, aceasta purtând numele de “composite aromatic box”. Este evidențiat rolul important în atașarea liganzilor dar și în actul catalitic, atât a resturilor de aminoacizi purtând sarcină electrică cât și a celor aromatici în cazul a două enzime (PfCK și PfCCT) și este oferită o imagine generală asupra modelului de interacțiune de

tip “composite aromatic box” din enzime. Importanța acestuia constă în faptul că multe din enzimele care au liganzi pe bază de săruri cuaternare de amoniu joacă roluri esențiale în procese metabolice (biosinteza lipidelor, metabolismul neurotransmițătorilor) sau în anumite boli infecțioase.<sup>5</sup>

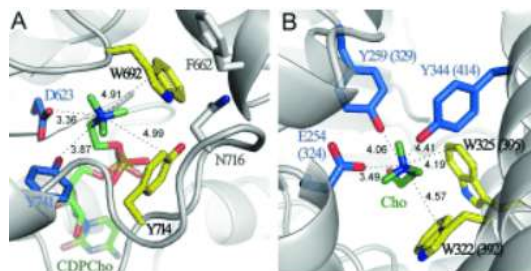


Figura 1. Coordinarea colinei la situsul activ al PfCCT și PfCK

## 2015: OPTIMIZAREA PROCESULUI DE REZOLUTIE CINETICA DINAMICA (DKR) IN REACTOARE DISCONTINUE

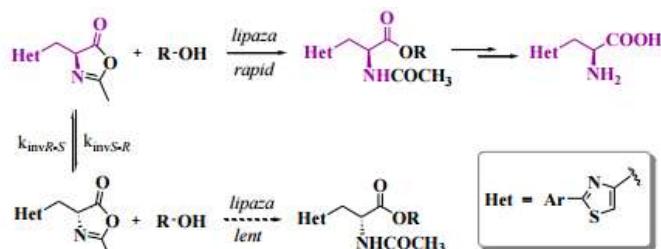
Principalele obiective ale acestei etape au fost optimizarea catalizatorilor de racemizare pentru procesele de DKR și realizarea acestora în reactoare discontinue. Cercetarile efectuate în această etapă au fost concretizate în elaborarea unei metodologii pentru: SINTEZA CHEMOENZIMATICĂ A UNOR L- $\alpha$ -AMINOACIZI TIAZOLICI PRIN PROCESE DE DKR ENZIMATICĂ.

Aminoacizii naturali și non-naturali în forma enantiopură și-au găsit aplicații în domenii variate, de la domeniul medical sau cosmetic până la cel agro-industrial. Datorită reactivității grupelor funcționale prezente, aminoacizii pot fi utilizați ca intermediari în sinteza analogilor de produși naturali, de exemplu prin integrarea aminoacizilor non-naturali în peptide biologice active, se pot obține noi analogi peptidici cu activități, stabilități metabolice sau profile farmacologice superioare. Analogii aromatici ai aminoacizilor proteinogenici, în special  $\alpha$ -arilalaninele, se regăsesc în structura unor agenți terapeutici, nu doar individual (L-DOPA, L-metildopa) ci și integrați în structuri mai complexe, cum ar fi cazul medicamentului nafarelin, ce conține un rest de L- $\alpha$ -2-naftilalanină. Nucleul tiazolic se regăsește în structura unor peptide de origine naturală, ca bleomicinele (antibiotice glicopeptidice anticanceroase), nociaticinele, epotilonele, aeruginazolii și tiazomicinele (noi clase de antibiotice tiopeptidice ciclice). Potențialul biologic al acestui sistem heterociclic este exploatat în design-ul unor noi compuși biologic activi, unii dintre ei fiind introduși în terapie.  $\alpha$ -Aminoacizii derivați de 2-feniltiazol prezintă potențial ca extinsă este benefică pentru interacțiunea cu receptorii  $\pi$ - $\pi$ sintoni chirali mai ales atunci când o conjugare farmacologici. O serie de L- $\alpha$ -2-ariltiazol-4-il-alanine au fost deja integrate în structura unor noi analogi de melanotropină. Relativ recent a fost realizată sinteza chimică asimetrică a unor 2-ariltiazol-4-il-alanine cu configurație L. Aminoacizii obținuți au fost integrați în secvența peptidică a neurotensinei, pentru obținerea unor noi analogi de neurotensină cu proprietăți analgezice. Având în vedere potențialul chimic și biologic mai sus amintit al aminoacizilor chirali derivați de 2-feniltiazol, ne-am propus elaborarea unei metode chemoenzimatice eficiente pentru obținerea unor L- $\alpha$ -2-ariltiazol-4-il-alanine cu enantiopurități mari. Dintre metodele enzimatice de obținere a aminoacizilor chirali, cea mai larg utilizată este rezoluția amestecurilor racemice utilizând enzime hidrolitice din clasa proteazelor, esterazelor, lipazelor.

Față de rezoluția cinetică clasică, rezoluția cinetică dinamică (DKR) implică transformarea enantioselectivă a unui enantiomer simultan cu racemizarea enantiomerului rămas netransformat, ducând la obținerea produsului dorit cu randamente de peste 50%. Una dintre metodele de obținere a  $\alpha$ -aminoacizilor optic activi este rezoluția cinetică dinamică mediată de lipaze a derivaților de oxazol-5(4H)-onă, sub acțiunea alcoolilor ca agenți nucleofili. În acest studiu, s-a urmărit elaborarea unei metode chemoenzimatice bazate pe procese de rezoluție cinetică, clasică și dinamică, pentru obținerea

L- $\alpha$ -aminoacizilor derivați de 2-feniltiazol. Reacțiile enzimatic investigate au fost optimizate în vederea obținerii produșilor cu randamente și cu enantiopurități cât mai mari.

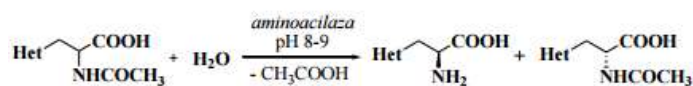
A fost studiată sinteza chemoenzimatică a unor L- $\alpha$ -2-ariltiazol-4-il alanine, pornind de la aminoacizii racemici N-acetilați corespunzători, prin intermediul oxazol-5(4H)-onelor tiazolice, obținute printr-o reacție de ciclizare. Etapa cheie în sinteza stereoselectivă este rezoluția cinetică dinamică a oxazol-5(4H)-onelor tiazolice, printr-o reacție de deschidere de ciclu enantioselectivă, utilizând alcooli alifatici ca nucleofili, sub acțiunea catalitică a lipazelor (Schema 20).



Schema 20. Hidroliza enzimatică enantioselectivă a N-acetil- $\alpha$ -aminoacizilor tiazolici

Principalele cerințe pentru ca această metodă să fie eficientă sunt: capacitatea lipazei de a accepta și de a transforma în mod stereoselectiv substratul respectiv, capacitatea substratului netransformat de a se racemiza cu o viteză suficient de mare, precum și proprietatea oxazolonei-substrat de a rezista la atacul alcoolului nucleofil fără participarea enzimei. Alcooliza neenzimatică ar putea duce la o deschidere de ciclu neselectivă și implicit la scăderea enantiopurității produsului de rezoluție.

În vederea creșterii vitezei de racemizare a oxazolonei, se poate apela la catalizatori bazici sau acizi. Ca în orice rezoluție cinetică dinamică enzimatică, limitările acestei metode sunt determinate de găsirea condițiilor în care enzima și catalizatorul de racemizare să funcționeze împreună eficient. Cea de-a doua metodă enzimatică aplicată în acest studiu pentru sinteza L- $\alpha$ -2-ariltiazol-4-il-alaninelor a fost hidroliza L-enantioselectivă a N-acetil- $\alpha$ -aminoacizilor tiazolici la nivelul grupei amidă, sub acțiunea catalitică a aminoacilazei I (Schema 21).



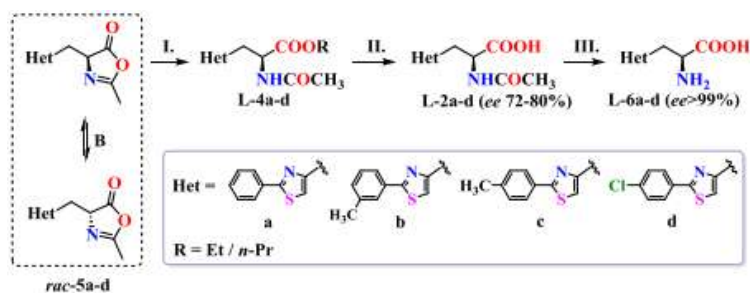
Schema 21. Hidroliza enzimatică enantioselectivă a N-acetil- $\alpha$ -aminoacizilor tiazolici

Reacția de hidroliză enzimatică se desfășoară în mediu apos, în condiții de pH și de temperatură care trebuie bine controlate. Aminoacilazele își pot manifesta activitatea, după caz, la pH de 7-8 sau 8-9 și la temperaturi de 37°C și respectiv 50°C. Deoarece în urma reacției de hidroliză se formează acid acetic, pH-ul mediului de reacție scade în timp și este necesară ajustarea lui la valorile optime pentru performanța enzimei. Cel mai indicat pentru ajustarea pH-ului este hidroxidul de litiu. Deși aminoacilazele prezintă o foarte mare stereoselectivitate în majoritatea cazurilor, uneori chiar L-specificitate de substrat, utilizarea acestora este limitată de anumite dezavantaje, cel mai important fiind reprezentat de solubilitatea scăzută a substraturilor în mediul apos, sensibilitatea enzimei la modificările de pH și la numeroși inhibitori de natură anorganică.

### Sinteza chemoenzimatică stereoselectivă

N-Acetilaminoacizii racemici *rac*-3a-d au fost utilizați ca precursori pentru sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-2-ariltiazol-4-il alaninelor, prin intermediul produșilor de ciclizare, oxazolonele *rac*-5a-d. Prima etapă stereoselectivă a fost rezoluția cinetică dinamică a oxazolonele *rac*-5a-d, sub acțiunea catalitică a lipazelor, cu participarea alcoolilor în reacția de deschidere de ciclu. Acizii L-2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici rezultați, L-2a-d, au fost hidrolizați enzimatic enantioselectiv la nivelul grupei amidă, sub acțiunea catalitică a Acilazei I. Pentru a investiga stereoelectivitatea

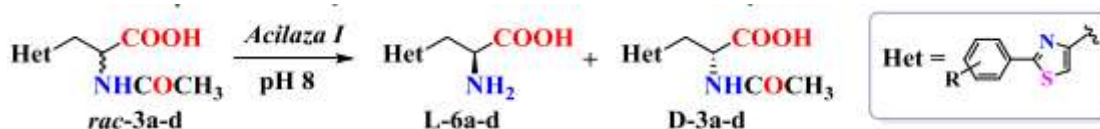
proceselor enzimaticе, a fost necesară stabilirea unor metode analitice de separare a enantiomerilor amestecurilor racemice *rac-3-6a-d*. Au fost utilizate diverse coloane chirale HPLC și RP-HPLC.



Reacțanți și condiții: I. CaL-B, etanol (pentru RCD a *rac-5a-c*) / n-propanol (pentru RCD a *rac-5d*), acetonitril; II.  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}$ , reflux; III. Acilaza I, pH 8.

Schema 22. Sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor și derivaților lor.

În prima etapă a sintezei stereoselective, s-au stabilit condițiile de reacție optime pentru rezoluția cinetică dinamică a oxazol-5(4H)-onelor *rac-5a-d*, catalizată de lipaze. În acest sens, au fost investigate diverse condiții de reacție (enzimă, nucleofil, solvent, catalizator de racemizare) pentru reacția de deschidere de ciclu a oxazol-5(4H)- onelor *rac-5a-d*. Compusul *rac-5a* a fost utilizat ca substrat model pentru optimizarea rezoluției cinetice dinamice enzimaticе. Mai întâi, a fost investigată alcooliza *rac-5a* în prezența a diverse lipaze, în alcool pur. Dintre lipazele testate, doar două au prezentat rezultate promițătoare: Lipaza din *Mucor miehei* a prezentat stereoselectivitate moderată (44.3% ee), iar lipaza B din *Candida antarctica* (Novozyme 435) a prezentat o stereoselectivitate superioară (72% ee), atunci când etanolul a fost utilizat ca nucleofil. De aceea, enzima CaL-B (Novozyme 435) a fost utilizată în experimentele RCD următoare. Producții rezoluției cinetice dinamice L-4a-d au fost hidrolizați la nivelul grupei ester în condiții de reacție slab bazice (în prezența  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Enantipuritatea produșilor de hidroliză nu a fost afectată prin această transformare (verificare prin RP-HPLC). Pentru a crește excesul enantiomeric și pentru a obține produșii finali în forma enantiopură, următoarea etapă a fost hidroliza enantioselectivă la nivelul grupei amidă a N-acetil aminoacizilor L-3a-d, sub acțiunea catalitică a Acilazei I, în mediu apos. Mai întâi, a fost investigată hidroliza enantioselectivă a N-acetil aminoacizilor în formă racemică *rac-3a-d*, sub acțiunea catalitică a Acilazei I. În toate cazurile, reacțiile enzimaticе au decurs enantioselectiv, dar viteza de reacție a fost foarte mică și transformarea substratului s-a oprit la conversii de 25% după 2 săptămâni, deși s-au adăugat în rânduri repetate cantități mari de enzimă în mediul de reacție.



Schema 23. Hidroliza enzimatică enantioselectivă a N-acetil-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor racemice, subacțiunea catalitică a Acilazei I.

Atunci când produșii de rezoluție L-3a-d au fost utilizați ca substrat pentru Acilaza I, viteza de reacție și conversia au crescut considerabil, nemaifiind necesar adaosul suplimentar de enzimă. Pe această cale, s-au obținut aminoacizii tiazolici L-6a-d cu excese enantiomerice de peste 99%. (Fig. 3). 6 Fig. 3. a).Separarea RP-HPLC a enantiomerilor 2-p-toliltiazol-4-il alaninei *rac-6c*. Coloană Zwix(+), eluent: metanol (50mM acid formic, dietilamină 25mM):acetonitril:apă 49:49:2 v/v/v. b).Analiza RP-HPLC a aminoacidului L-6c, obținut prin sinteză chemoenzimatică. L-aminoacizii tiazolici L-6a-d au fost purificați pe o coloană schimbătoare de cationi. Randamentele globale și rotațiile optice specifice ale produșilor sunt menționate în Tabelul 6.



**Tabel 6.** Randamentele globale și rotațiile specifice pentru L-2-ariltiazol-4-il alaninele L-6a-d obținute prin DKR a *rac*-5a-d catalizată de CaL-B urmată de hidroliza enantioselectivă a L-3a-d catalizată de Acilaza I.

Nr. crt.	Produs <sup>a</sup>	Randament global (%)	[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>
1.	L-6a	78	-0.20 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 5mg/mL)
2.	L-6b	77	-0.26 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 5mg/mL)
3.	L-6c	74	-0.27 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 5mg/mL)
4.	L-6d	78	-0.07 (CH <sub>3</sub> COOH, c = 1mg/mL)

*ee* > 99% în toate cazurile

Configurațiile absolute ale 2-ariltiazol-4-il-alaninelor levogire (-)-6a-d au fost stabilite prin compararea rotațiilor optice specifice cu datele din literatură. Deoarece datele din literatură indică faptul că acești aminoacizi tiazolici sunt levogiri în configurația absolută L, s-a stabilit configurația L pentru produșii reacțiilor enzimaticice (-)- **6a-d**.

În concluzie a fost optimizată o metodă chemoenzimatică pentru obținerea unei serii de L-(2-ariltiazol-4-il)alanine în forma enantiopură, pornind de la *N*-acetil aminoacizii corespunzători. Primul selector chiral a fost lipaza B din *Candida antarctica*, într-un proces RCD bazat pe reacția de deschidere stereoselectivă de ciclu a oxazol-5(4*H*)onelor tiazolice în mediu organic, proces prin care s-au obținut L-aminoacizii *N*-acilați și esterificați (*ee* = 78-80%), cu randamente de 93-96%. Produșii de rezoluție cinetică dinamică au fost supuși hidrolizei chimice la grupa ester în condiții slab bazice, urmată de hidroliza enantioselectivă a grupei amidă, catalizată de Acilaza I, în mediu apos. Datorită L-specificității Acilazei I, excesul enantiomeric al produșilor finali a fost crescut la peste 99%. Metoda chemoenzimatică aplicată a fost optimizată și aplicată cu succes pentru obținerea la scară preparativă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor **12a-d** în forma enantiopură, cu randamente globale de 74-78%.<sup>6</sup>

### 2016: Optimizarea procesului de rezoluție cinetică dinamică (DKR) în procese continue

Deoarece biocatalizatorii imobilizați pot fi recirculați și păstrați timp îndelungat și sunt ușor de utilizat, imobilizarea este un domeniu important al bioingineriei. Factorii care determină eficiența biocatalizatorilor sunt: selectivitatea, specificitatea, activitatea catalitică și stabilitatea.<sup>7</sup> Imobilizarea îmbunătățește în general toate aceste proprietăți și permite de asemenea recuperarea și reutilizarea enzimei.<sup>8</sup> Toate metodele de imobilizare au atât avantaje cât și dezavantaje; la alegerea lor este necesară o analiză riguroasă, pe baza structurii substratului transformat și a condițiilor de reacție. Studiile efectuate recent cu biocatalizatori comerciali în formă liofilizată sau imobilizată<sup>9</sup> au aratat că, datorită mării varietăți de substraturi, enzime și condiții, nu există o metodă ideală pentru imobilizarea enzimelor funcționale.

Recuperarea și recircularea enzimelor este adeseori complicată în procesele convenționale, de aceea aplicațiile enzimelor sunt adesea împiedicate de lipsa de stabilitate operațională pe termen lung și dificultatea etapelor de prelucrare.

**Includerea enzimelor în matrici** este una din cele mai generale tehnici de imobilizare. Utilizarea acestei metode nu determină modificări chimice sau structurale ale enzimelor. Mai mult chiar, termostabilitatea și toleranța la solvenți crește în general, dar apare problema *limitărilor difuzionale*.

**Legarea biocatalizatorilor pe suport**<sup>10</sup> este cea mai frecvent utilizată metodă în cazul *suporturilor mezoporoase*, fiind studiată deja atât adsorbția cât și legarea covalentă. Proprietățile biocatalizatorului imobilizat depind de natura grupării și de dimensiunea linker-



ului (în cazul atașării covalente). Suporturile poroase prezintă avantajul unei manipulări și recuperări simple și al unei suprafețe relativ mari însă, prezența porilor mărește limitările difuzionale.

La imobilizarea nanoparticule (NP) barierele difuzionale se minimizează și proteinele sunt disponibile pe o suprafață mare. Suspensia de NP nu sedimentează și se comportă similar unui lichid omogen, de aceea separarea particulelor biocatalitice în vederea recuperării este dificilă.

**Nanotuburile** cu diametre în zona nanometrilor, în special nanotuburile de carbon (CNTs) cu lungimi de ordinul micrometrilor, reprezintă suporturi cu o mare suprafață disponibilă, limitări difuzionale reduse și recuperare simplă. Datorită proprietăților lor mecanice, termice și electrice, dar și a biocompatibilității generale, CNTs sunt utilizate pe scară largă la imobilizarea biomacromoleculor.<sup>11</sup> Aplicațiile biologice ale enzimelor conțin deseori ca etapă cheie imobilizarea enzimelor pe CNTs prin legături covalente sau necovalente.<sup>12</sup>

Glicerol-diglicidileterul (GDE), un bisepoxid, poate fi utilizat nu doar ca și agent de reticulare pentru obținerea unor agregate de enzime reticulate (CLEAs), cât și ca și linker pentru atașarea enzimelor pe suprafața unor CNTs funcționalizate în prealabil cu diamine.

Astfel preparatele enzimatic care constau din particule de dimensiuni micrometrice cu porozitate controlabilă pot fi utilizate ca biocatalizatori în reactoare cu strat fix.

Caracteristicile lipazelor importante din punct de vedere al aplicațiilor industriale (reacții de procesare normale, tehnologii mai ecologice, un număr redus de operații, stabilitate operațională superioară, capacitate de producție mărită și posibilitatea separării și recirculării) sunt în general superioare după imobilizare.

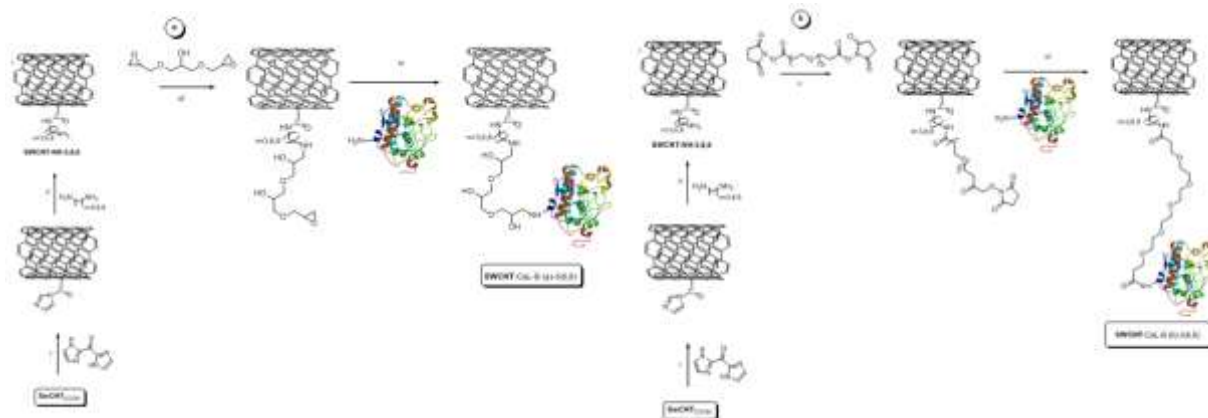
### A: Imobilizarea covalentă a lipazei B din *Candida antarctica* (CaL-B) pe nanotuburi de carbon monostrat funcționalizate cu grupări carboxilice (SWCNT<sub>COOH</sub>)

Au fost aplicate două metode de imobilizare a CaLB pe SWCNT<sub>COOH</sub> (Schema 24):

1. Imobilizarea prin intermediul glicerol-diglicidileterului (GDE), ruta a
2. Imobilizarea prin intermediul bis-succinimidil-poli(etilenglicolului) (BS(PEG)<sub>5</sub>), ruta b

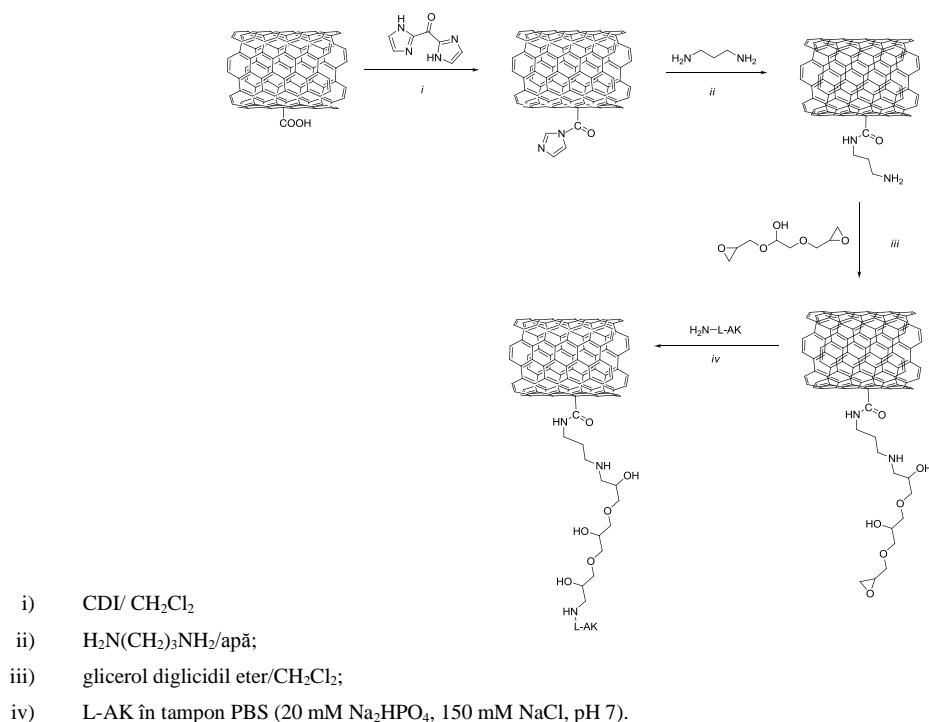
a) i) CDI/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; ii) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>/apă, n=3,6,8; iii) glicerol diglicidil eter/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iv) CaL-B/tampon PBS buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7);

b) i) CDI/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; ii) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>/apă, n=3,6,8; v) BS(PEG)<sub>5</sub>/DMSO; vi) CaL-B/tampon PBS buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 8);



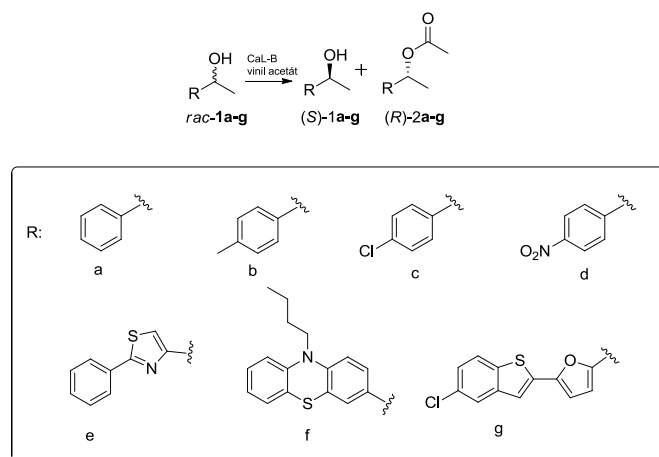
Schema 24. Strategii de imobilizarea CaLB pe SWCNT<sub>COOH</sub>

## B. Imobilizarea covalentă a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK) pe nanotuburi de carbon monostrat funcționalizate cu grupări carboxilice (SWCNT<sub>COOH</sub>)



Schema 25. Strategia de imobilizarea LAK pe SWCNT<sub>COOH</sub>

Preparatele enzimatiche au fost testate apoi în procesul de rezoluție cinetică a unor alcooli secundari chirali (Schema 26), folosind feniletanolul ca substrat model, într-un reactor cu deplasare (Figura 2).



Schema 26. EKR a unor alcooli secundari cu lipaza imobilizată pe SWCNT<sub>COOH</sub>

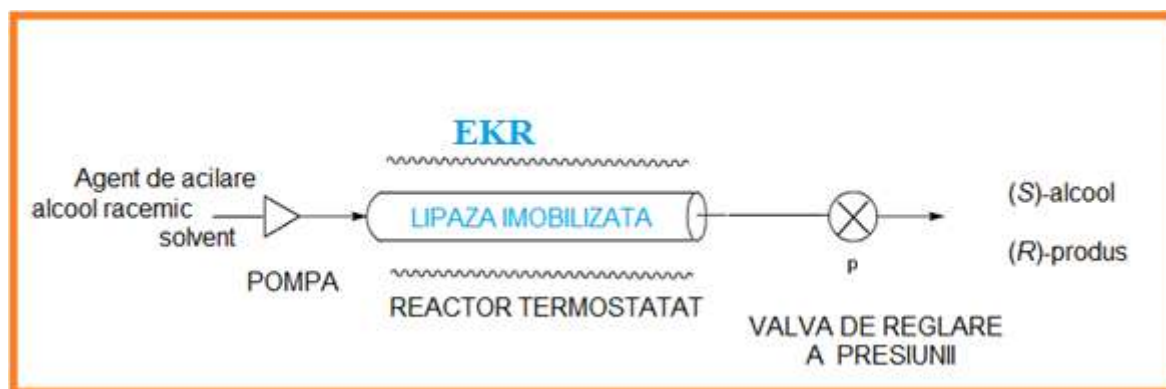


Figura 2. Testarea proceselor enzimatiche in reactoare cu deplasare

### Reacții de acilare enzimatică în reactorul discontinuu

În 500  $\mu\text{L}$  de solvent organic s-a dizolvat 1 mg alcool racemic, s-au adăugat 10  $\mu\text{L}$  de agent de acilare (acetat devinil) și 1 mg de enzimă. Reacția s-a perfectat sub agitare la 1350 rpm la temperatura camerei. Pentru monitorizarea reacției s-a utilizat separarea gaz-cromatografică pe coloana de  $\beta$ -ciclodextrina permetilată în condițiile specifice fiecărui substrat alcoolic sau pe coloană Chiralpak IB prin HPLC.

**Tabelul 6.** Condițiile de separare cromatografică pe coloane chirale

Alcool	Metodă separare	Temperatură ( $^{\circ}\text{C}$ ) sau eluent (hexan:IPA, v/v)	Timp de retenție( min)
<i>rac-2a</i> (R/S)	GC	120	5.5/5.9
<i>rac-1a</i> (S/R)	GC	120	7.4/7.6
<i>rac-2b</i> (R/S)	GC	130	6.1/6.4
<i>rac-1b</i> (R/S)	GC	130	6.5/6.8
<i>rac-2c</i> (S/R)	GC	120-160 (2.6 $^{\circ}$ /min)	9.4/9.8
<i>rac-1c</i> (R/S)	GC	120-160 (2.6 $^{\circ}$ /min)	11.3/11.6
<i>rac-2d</i> (S/R)	HPLC-IB	87:13	8.8/12.4
<i>rac-1d</i> (S/R)	HPLC-IB	87:13	15.4/19.8
<i>rac-2e</i> (R/S)	HPLC-IB	95:5	6.2/6.7
<i>rac-1e</i> (S/R)	HPLC-IB	95:5	11.9/13.8
<i>rac-2f</i> (R/S)	HPLC-IB	90:10	5/5.9
<i>rac-1f</i> (R/S)	HPLC-IB	90:10	9.5/12.9
<i>rac-2g</i> (S/R)	HPLC-IB	95:5 (timp de 8 min), 90:10 (20 de min)	6.2/6.7
<i>rac-1g</i> (S/R)	HPLC-IB	95:5 (timp de 8 min), 90:10 (20 de min)	11.9/13.8

### Determinarea metodei optime de imobilizare

Determinarea activității enzimei imobilizate pe cele două tipuri de nanosuport s-a realizat prin acilarea enzimatică a substratului model, *rac-1a*. Enzima imobilizată pe nanotuburi de carbon prin a doua metoda a fost cel mai eficient catalizator în reacția de acilare a substratului model. În urma efectuării reacției de acilare pe alte două substraturi, *rac-2d,g*, rezultatele au fost în conformitate cu cele observate în cazul substratului model, astfel experimentele următoarele s-au efectuat cu acest preparat enzimatic.

### Efectul încărcării cu enzimă a suportului

Reacția de acilare s-a efectuat cu preparate enzimatiche cu diferite rapoarte suport-enzimă, iar rezultatele au arătat că raportul suport enzimă de 1:2 furnizează cele mai bune rezultate.

**Tabelul7.** Efectul încărcării cu enzimă a suportului asupra activității biocatalizatorului după 30 ore

Suport	Raport suport-enzimă (w/w)	ee <sub>s</sub> (%)	c (%)
SWCNT <sub>COOH</sub>	2 : 1	72	42
	1 : 1	69	41
	1 : 2	71	42
	1 : 5	32	24

### Efectul lungimii linkerului asupra reacției de acilare

Linkerul mai scurt, 1,3-diaminopropan, a furnizat rezultate mai bune, în timp ce folosirea linkerelor mai lungi a avut efect negativ asupra eficacității enzimei.

**Tabelul 8.** Efectul lungimii linkerului asupra reacției de acilare

Linker	Conversie (%)
1,3-diaminopropan	45
1,6-diaminohexanean	31
1,8-diaminooctan	41

### Efectul temperaturii

Prin investigarea efectului temperaturii asupra reacției de acilare a substratului model catalizată de CaL-B imobilizat pe nanotuburi de carbon s-a constatat că temperatura optimă este de 60°C.

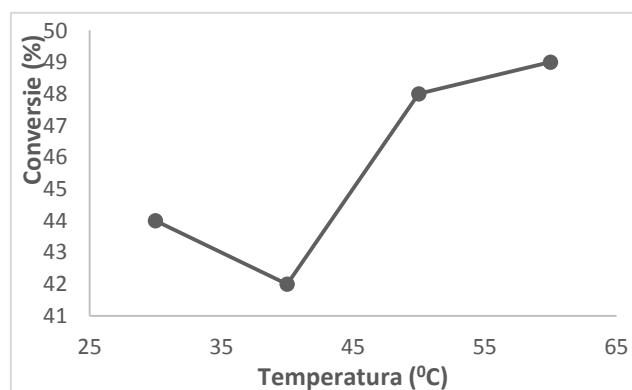


Figura 3 . Efectul temperaturii asupra reacției de acilare a substratului model după 1 oră

### Reutilizabilitatea biocatalizatorului

Reutilizabilitatea lipazelor este un aspect important din cauza costurilor lor ridicate. Reutilizabilitatea enzimei imobilizate s-a testat în reacții batch repetate utilizând condițiile optime. După 10 cicluri activitatea inițială a biocatalizatorului nu s-a modificat semnificativ (Figura 4).

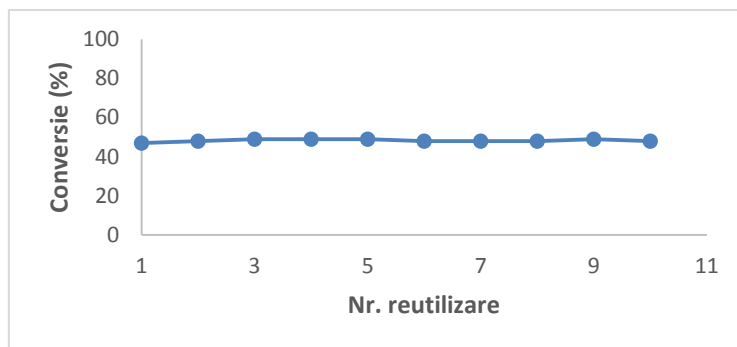


Figura 4. Studiul de reutilizabilitate aenzimei imobilizate

Studiile efectuate determinarea stabilității preparatelor enzimatiche astfel obținute au arătat că enzima păstrează mai mult de 90% din activitatea sa inițială chiar și după 10 cicluri de reacție.

## DETERMINAREA CONDIȚIILOR OPTIME PENTRU DKR ÎN VARIANTE CONTINUE. STUDIUL COMPARATIV AL VARIANTELOR CONTINUE

Pentru optimizarea procesului de DKR în variantă continuă, folosind datele preliminare obținute în prealabil pentru procesul realizat în reactorul discontinuu cu amestecare, respectiv condițiile optime determinate în acest caz, au fost testate diferite configurații în care unitatea de rezoluție enzimatică și cea de racemizare, ambele conținând catalizatorul (enzima și agentul de racemizare) în formă imobilizată, au fost conectate conform Figurilor 5-7. Ambele unități au fost termostatate pentru a obține rezultate reproductibile și pentru a putea efectua un studiu al influenței acestui parametru asupra procesului de DKR.



Ca și reactoare au fost folosite coloane din inox SynBioCart (30 mm×3 mm ID PTFE) în care s-a introdus catalizatorul imobilizat (120 mg CaLB-SWCN<sub>COOH</sub> sau 110 mg baza de racemizare imobilizata) sub forma unui strat fix, folosind ca sistem de etanșare un ansamblu de garnituri din Teflon și site metalice cu porozitate cunoscută care să permită distribuția uniformă a fluxului alimentat

Alimentarea reactorului cu un debit constant de reactanți (0.3 mL/min) se realizează prin intermediul unei pompe cuaternare (modulul de pompa al unui sistem Agilent LC 1150) HPLC, iar presiunea la iesire s-a controlat printr-o valva de reglare.

Pentru elaborarea condițiilor optime de sinteză stereoselectivă în condiții de rezoluție cinetică dinamică (DKR) a compușilor chirali (cianohidrine, aminoacizi și amine heterociclice) în sisteme ce operează cu reactoare tubulare în regim continuu, s-au utilizat trei configurații distincte. Astfel, în sistemul înseriat de reactoare de rezoluție cinetică enzimatică (Figura 5), folosind biocatalizatori imobilizați, cu unități de racemizare ce conțin agenți chimici imobilizați pe suporturi s-a putut determina raportul masic optim între biocatalizatorul imobilizat și agentul de racemizare imobilizat. În prealabil s-a stabilit debitul de operare a unității de rezoluție cinetică astfel ca după atingerea regimului staționar pentru o concentrație de substrat bine definit să se producă rezoluția enantiomerică totală (conversie de 50%, adică transformarea completă a unuia dintre enantiomerii substratului).

În continuare s-a testat procesul de racemizare a substratului remanent enantiopur. Folosind debitul fixat în reactorul de rezoluție, s-a putut determina cantitatea necesară de agent de imobilizare pentru racemizarea completă, astfel după a doua unitate compoziția masei de reacție este de produs enantiopur: substrat racemic, 1:1, M/M.

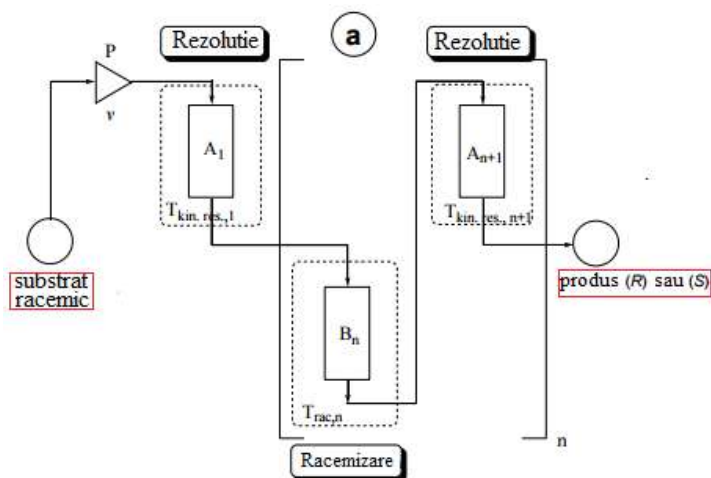


Figura 5. Optimizarea parametrilor procesului de DKR în regim continuu

După același principiu de funcționare, la același debit, a fost determinată încărcătura cu enzimă și agent de racemizare a următoarei unități de rezoluție-racemizare astfel încât să se atingă compoziția masei de reacție de produs enantiopur: substrat racemic, de 3:1, M/M.

Numărul maxim de unități înseriate testate a fost de 3 reactoare de rezoluție și 3 reactoare de racemizare.

Rezultatul experimentelor desfășurate pe cele trei clase de compuși (cianohidrine, amine și aminoacizi heterociclici) au făcut posibilă determinarea raportului masic dintre biocatalizator și agentul de racemizare pentru conducerea eficientă a rezoluțiilor în regim dinamic.

**Tabelul 9.** Parametrii procesului de DKR în regim continuu pentru clasele de compuși țintă

Tip proces	Raport masic biocatalizator suportat/ agent de racemizare pe suport (m/m)
DKR Cianhidrine	CaL-A pe celită/dietil-aminoetanol legat covalent pe nanotuburi de carbon 1:3, m/m
DKR amine	Novozym 435/ Pd pe oxid de aluminiu 1:1, m/m
DKR oxazolone (pt. aminoacizi)	Novozym 435/ dietil-aminoetanol legat covalent pe nanotub de carbon 5:1, m/m

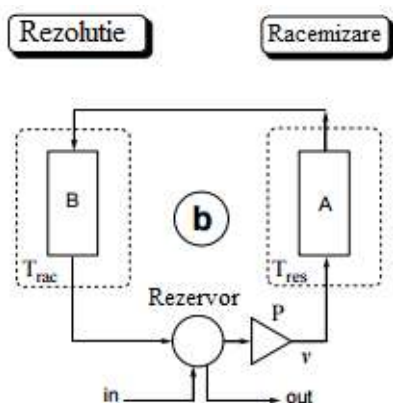


Figura 6. DKR continua în reactoare înseriate

A urmat testarea reacțiilor DKR într-un sistem continuu cu recirculare, utilizând două reactoare (una de rezoluție cinetică enzimatică și una de racemizare) legate în serie (Figura 6). S-a urmărit eficiența parametrilor obținuți anterior în vederea conversiei totale a substraturilor într-un singur enantiomer al produsului astfel încât în timpul procedurii substratul să rămână perfect racemic.



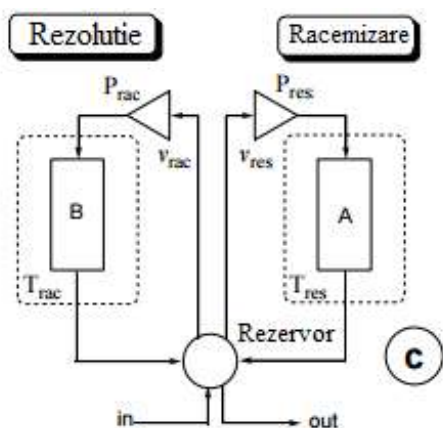
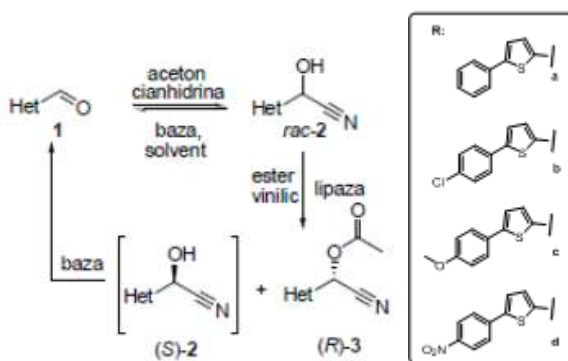


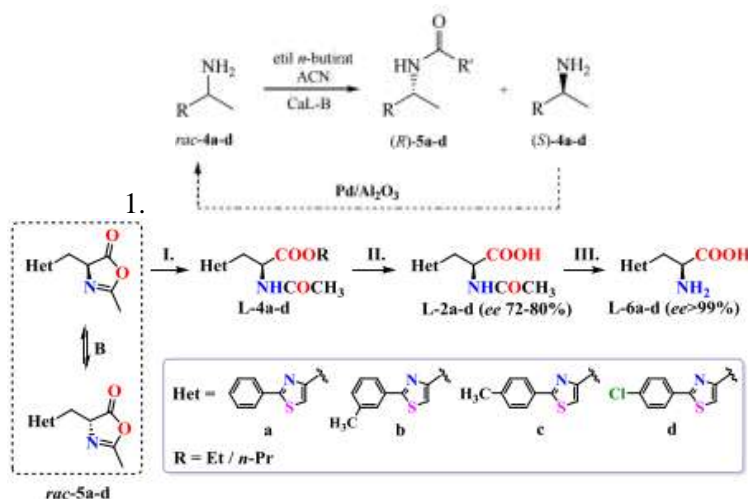
Figura 7. DKR continua în reactoare legate în paralel

Folosind aceste date s-a trecut la testarea DKR pentru toate cele 3 cazuri folosind sisteme cu reactoare legate în paralel (Figura 7) în flux continuu și cu recirculare. În acest caz ambele reactoare (de rezoluție și de racemizare) au avut aceeași încărcătură masică de catalizator (enzima respectiv agent de racemizare). Prin reglarea raportului debitelor pe cele două ramuri ale sistemului s-a realizat operarea eficientă a sistemelor, adică s-a maximizat viteza de rezoluție cinetică enzimatică cu menținerea caracterului racemic al substraturilor în timpul procesului.

Procesele de rezoluție cinetică enzimatică dinamică studiate sunt reprezentate în Schemele 27-28.



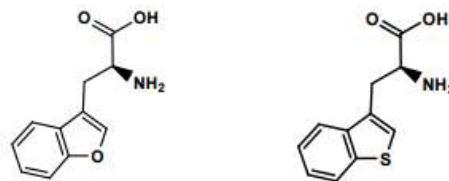
Schema 27. Rezoluția cinetică enzimatică a cianohidrinelor cu schelt feniltiofenic



Schema 28. Rezoluția cinetică enzimatică dinamică a aminelor și aminoacizilor cu schelet feniltiazolic

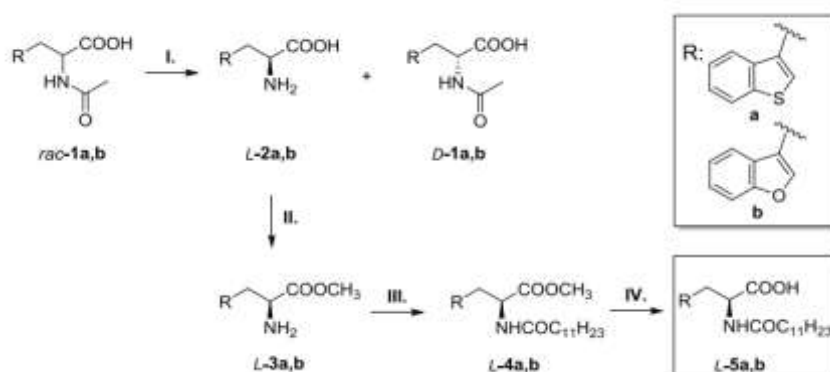
## APLICAȚII ALE BIOCATALIZEI ÎN CERCETAREA FUNDAMENTALĂ

Într-un demers de explicare a procesului de selecție, prin codul genetic al aminoacizilor proteinogeni din rezerva metabolică și din moleculele probiotice, s-au sintetizat doi analogi de L-triptofan respectiv: benzofuranil-alanina și benzotiofenil-alanina în stare liberă, enantiopură și cei doi derivați *N*-acilați, de asemenea în stare enantiopură.<sup>13</sup>



Compușii obținuți au fost utilizați în stabilirea unor corelații între diferențele HOMO – LUMO și reactivitatea acestora; s-a demonstrat că aceste corelații au un rol determinant în procesul de selecție.

*N*-dodecanoil-L-(benzofuran-3-il)alanina (NDo-BFA, L-5b) și *N*-dodecanoil-L-(benzo[*b*]-tiofen-3-il)alanina (NDo-BTA, L-5a) enantiopure au fost sintetizate din aminoacizii nenaturali enantiopuri (L-(benzofuran-3-il)alanina, BFA, L-2b) și L-(benzo[*b*]tiofen-3-il)alanina, BTA, L-2a). Aceștia au fost obținuți la rândul lor prin rezoluția cinetică enzimatică a *N*-acetilaminoacizilor corespunzători racemici mediată de Acilaza I, urmată de separarea lor cromatografică pe o coloană de schimb ionic preparativă (Schema 29).



Schema 29. Sinteza aminoacizilor nenaturali analogi ai triptofanului enantiopuri prin EKR mediată de Acilaza I

### Sinteza L-2-amino-3-(heteroaril)propanoatilor de metil (L-3a,b)

În soluția aminoacidului L-2a,b (~100 mg) în metanol anhidru (15 mL) se adaugă sub argon în picături clorotrimetilsilan proaspăt distilat (2 equivalenti) sub agitare continuă la temperatura camerei. După perfectarea reacției (cca 24 ore, control cromatografic) amestecul de reacție se concentrează la vid și se obține esterul metilic dorit L-3a,b sub forma unui solid alb cu randament de 87 și respectiv 93%.

### Sinteza (L- 3-(heteroaril)-2-dodecanamidopropanoatilor de metil(L-4a,b)

Se adaugă 4-*N,N*-Dimetilaminopiridină în piridină (DMAP, 1%, 2 equiv.) și clorură de dodecanoil (2 equiv.) în soluția esterilor metilici L-3a,b în diclorometan anhidru (15 mL). Reacția se refluxează cca 3 ore pentru perfectare. După răcire la temperatura camerei de extrage succesiv cu HCl 10%, apoi cu soluție Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M și în final cu apă. Stratul organic se usucă pe sulfat de sodiu anhidru, se elimină la vid solventul și din produsul brut rezultat se obține după purificare cromatografică pe silicagel cu diclorometan-metanol 95:5 ca eluent produsul finit, L-4a,b ca semisolid galben cu randament de 76 și 79%.

### Sinteza acizilor (L-3-(heteroaril)-2-dodecanamidopropanoici) L-5a,b.

În soluția intermediarilor anterior obținuți L-4a,b în acetonitril se adaugă o soluție Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M și amestecul se refluxează pentru 2 ore. După răcire la temperatura camerei se adaugă în picături HCl concentrat până la pH 1.5, când precipită produsul. Suspensia se păstrează în frigider 2 h, precipitatul se filtrează și se usucă prin liofilizare obținându-se L-5a,b cu randamente de 88 și 91%.

Pentru confirmarea structurii și purității compușilor L-5a,b s-au înregistrat spectrele <sup>1</sup>H și <sup>13</sup>C-NMR și spectrele de masă. Enantiopuritatea L-2a,b și L-4a,b a fost determinată prin HPLC pe coloane chirale, folosind ca standard compușii racemici.

100 mg *rac*-1a,b s-a suspendat în HCl 10% și după 5 ore de reflux s-a evaporat solventul la vid, reziduul a fost spălat cu eter etilic și apoi uscat, obținându-se *rac*-2a,b sub forma unui solid alb. Din *rac*-2a,b au fost preparați derivații *rac*-4a,b în mod similar.

Pentru separarea enantiomerilor *rac*-2a,b s-a utilizat o coloană Chiralpak ZWIX(+)(250 × 4.0 mm) cu acetonitril:metanol [50 mM acid formic, 25 mM dietilamină]:apă 49:49:2 (v/v/v) ca eluent pentru *rac*-2a, respectiv acetonitril:metanol [50 mM acid formic, 25 mM DEA]:apă 70:28:2 (v/v/v) pentru *rac*-2b (la un debit de 1 mL/min). Pentru separarea *rac*-4a,b s-a utilizat o coloană Chiralpak IA sau IB (250 × 4.6 mm) și hexan:2-propanol 80:20 (v/v) pentru *rac*-4a (flow: 1 mL/min, Chiralpak IA column), respectiv hexan:2-propanol 95:5 (v/v) pentru *rac*-4b ca fază mobilă la un debit de 1 mL/min. S-a demonstrat astfel că transformarea chimică a L-2a,b în L-4a,b nu modifică enantiopuritatea compușilor (*ee* pentru L-4a,b > 99%).

PROF. DR. ING. FLORIN DAN IRIMIE



## Literatura

- <sup>1</sup> 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
- <sup>2</sup> Laura Pop, Pierrick 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
- <sup>3</sup> Jürgen Brem, László-Csaba Bencze, Arto Liljebblad, 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
- <sup>4</sup> A. Radu, M.E. Moisa, M.I. Tosa, N. Dima, V. Zaharia, F.D. Irimie: *Candida antarctica* lipases as versatile catalysts for the synthesis of enantiopure (*R*)- and (*S*)-1-(2-phenylthiazol-4-yl)ethanamines, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* **2014**, *107*, 114-119
- <sup>5</sup> G. N. Nagy, L. Marton, A. Contet, O. Ozohanics, L.M. Ardelean, A. Revesz, K. Vekey, F.D. Irimie, H. Vial, R. Cerdan, B. Vertessy: Composite Aromatic Boxes for Enzymatic Transformations of Quaternary Ammonium Substrate, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13689-13694
- <sup>6</sup> D. Leonte, L. C. Bencze, C. Paizs, M.I. Tosa, V. Zaharia, F.D. Irimie: Heterocyclers 36. Single walled carbon nanotubes bound *N,N*-diethylethanolamine as mild and efficient racemization agent in the enzymatic DKR of 2-arylthiazol-4-yl-alanine, *Molecules*, **2016**, *21(1)*, 25-40
- <sup>7</sup> Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K: Engineering the third wave of Biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185-194.
- <sup>8</sup> Grunwald P (ed): *Industrial Biocatalysis (Pan Stanford Series on Biocatalysis, Vol 1)*. Singapore:Pan Stanford Publishing, **2015**.
- <sup>9</sup> Boros Z, Hornyánszky G, Nagy J, **Poppe L**: From synthetic chemistry and stereoselective biotransformations to enzyme biochemistry – The Bioorganic Chemistry Group at the Budapest University of Technology and Economics. *Per. Polytechn. Chem. Eng.* **2015**, *59(1)*, 59-71.
- <sup>10</sup> Cao L: *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- <sup>11</sup> Pavlidis IV, Vorhaben T, Tsoufis T, Rudolf P, Bornscheuer UT, Gournis D, Stamatis H: Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials, *Biores. Technol.* **2012**, *115*, 164-171.
- <sup>12</sup> Gao Y, Kyratzis I: Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl 3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a Critical Assessment, *Bioconj. Chem.* **2008**, *19*, 1945-1950.
- <sup>13</sup> Matthias Granold, Parvana Hajieva, Monica Tosa, Florin-Dan Irimie, Bernd Moosmann: Chemical reactivity, molecular oxygen and the modern genetic code, *PNAS*, 2016, submitted