

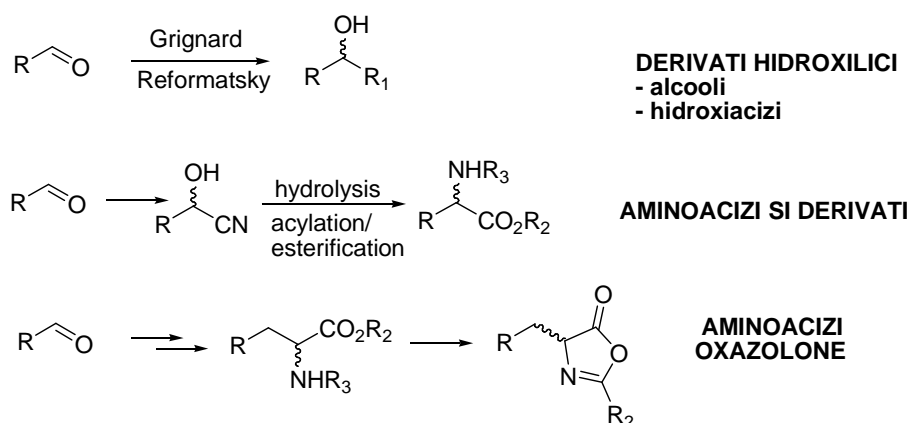
Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada octombrie – decembrie 2011

PROCESE BIOORGANICE STEREOSELECTIVE CONTINUE DE REZOLUTIE CINETICA DINAMICA

Obiectivul 1. Etapa 1. Sinteza chimica a unor compusi racemici

Compusii organici racemici care vor fi utilizati ca si substraturi ale bioproseselor 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)aromatice. Acestea au fost transformate in compusi cu functiuni hidroxilice (alcooli secundari prin reactii Grignard sau cu acetaldehida si compusi organoliti si β -hidroxiesteri respectiv β -hidroxiacizi prin reactie Reformatsky), aminoacizi si derivati functionali ai acestora, respectiv oxazolone, toti racemici, prin reactiile prezentate in Schema 1.



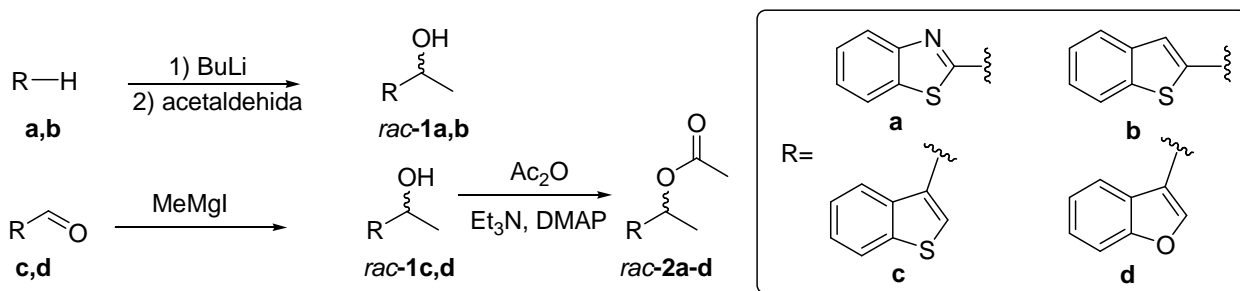
Schema 1. Sinteza substraturilor racemice pornind de la aldehide

Obiectivul 1. Etapa 2. Dezvoltarea metodelor analitice de separare a enantiomerilor

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).

A. SINTEZA SI SEPARAREA ENANTIOMERILOR HETEROARIL ETANOLILOR SI ACETATILOR CORESPUNZATORI RACEMICI

1-(benzo[d]tiazol-2-il)etanolul (*rac-1a*) si 1-(benzo[b]tiofen-2-il)etanolul (*rac-2b*) au fost obtinuti din compusi heteroaromatice nesubstituiti corespunzatori, prin litierie selectiva la pozitia 2 cu *n*-butil litiu in tetrahidrofuran la -78°C si reactie cu acetaldehida. Pentru obtinerea alcoolilor *rac-1c,d* aldehidele corespunzatoare servesc ca materiale de pornire. Ele au fost transformate cu iodura de metil magneziu in produse doriti. Heteroarilii acetatii racemici au fost sintetizati printr-o acilare chimica cu anhidrida acetica in prezenta de Et_3N si o cantitate catalitica de DMAP (Schema 2).



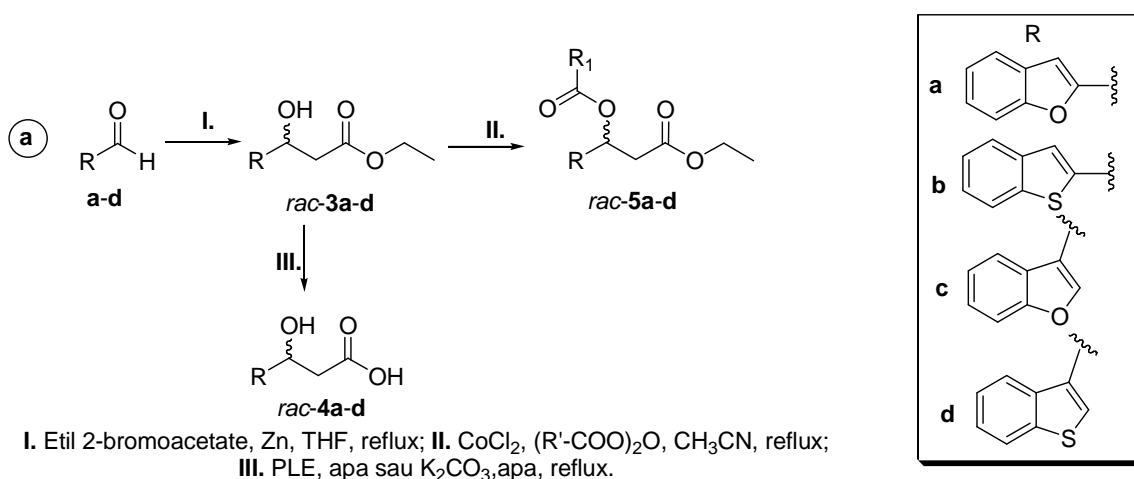
Schema 2. Sinteza chimica a alcoolilor racemici si a derivatilor O-acetilati ai acestora

Analiza gascromatografica a fost realizata pe un cromatograf Konik HRGC 4000 B (gaz purtator N₂; head pressure: 60 psi, injector: 250°C; FID detector: 250°C) cu o coloana chirala Astec de β-cyclodextrina dimetilata (30 m × 0.25 mm, No. 777023 G0507-30).

Tabelul 1. Timpii de retentie ai enantiomerilor alcoolilor si acetatilor la separarea GC

Compus	1a	2a	1b	2b	1c	2c	1d	2d
Timp de retentie	44.89	22.3	12.48	9.79	23.3	14.41	14.6	7.94
(min)	51.82	23.57	12.92	10.19	24.73	16.32	15.46	8.23

B. SINTEZA SI SEPARAREA ENANTIOMERILOR β-HIDROXIESTERILOR PRIN REACTIE REFORMATSKY SI A β-HIDROXIACIZILOR



Schema 3. Sinteza β-hidroxiesterilor si acizilor racemici prin reactie Reformatsky urmata de hidroliza

Prin reactia Reformatsky a alchidelor corespunzatoare cu bromoacetat de etil si zinc au fost preparati benzofuranil- si benzo[*b*]tiofenil-3-hidroxiopropanoatii de etil racemici in pozitia 2 si 3 a inelului heterociclic (*rac-3a-d*). Pentru acilarea gruparii hidroxicice s-a utilizat anhidrida acida si clorura de cobalt ca si catalizator preparandu-se diesterii *rac-5a-d*, iar prin hidroliza gruparii esterice in mediu bazic sau enzimatic, cu esteraza din ficatul porcine, s-au obtinut si β-hidroxiacizii *rac-4a-d* (Schema 3).

Tabelul 2. Timpii de retentie ai enantiomerilor of *rac-3-5a-d*.

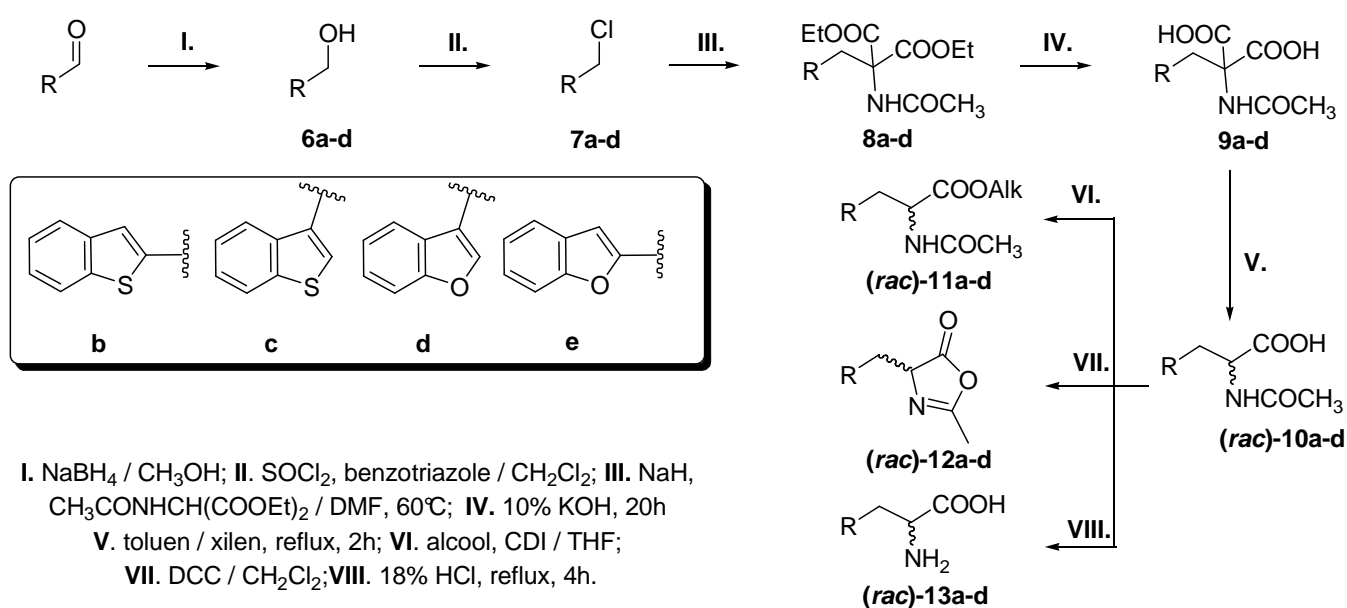
Compus	R. t. (min)	Compus	R. t. (min)	Compus	R. t. (min)
(<i>S</i>)-3a	28.6	(<i>S</i>)-5a	15.3	(<i>S</i>)-4a	9.4
(<i>R</i>)-3a	27.1	(<i>R</i>)-5a	14.5	(<i>R</i>)-4a	8.2
(<i>S</i>)-3b	35.9	(<i>S</i>)-5b	21.9	(<i>S</i>)-4b	10.5
(<i>R</i>)-3b	38.1	(<i>R</i>)-5b	27.8	(<i>R</i>)-4b	9.2
(<i>S</i>)-3c	10.5	(<i>S</i>)-5c	7.7	(<i>S</i>)-4c	9.8
(<i>R</i>)-3c	11.7	(<i>R</i>)-5c	8.1	(<i>R</i>)-4c	8.9
(<i>S</i>)-3d	11.3	(<i>S</i>)-5d	8.2	(<i>S</i>)-4d	10.4
(<i>R</i>)-3d	13.3	(<i>R</i>)-5d	8.7	(<i>R</i>)-4d	10

enantiomerilor hidroxiacizilor *rac-4a-d* s-a realizat pe un tandem de 2 coloane Astec: Chirobiotic-Tag si Chirobiotic-R (4.6×250 mm) cu un amestec de metanol si tampon TEAA (pH 4.1), 98:2 (v/v) ca eluent. Pentru separarea compusilor mono- si diesterici *rac-3,5a-b* s-a utilizat tandemul Chiralpak IA si OJ (4.6×250 mm) iar pentru *rac-3,5c-d* coloana

Chiralpak IC (4.6x250 mm) cu un amestec de hexane si 2-propanol, 90:10 (v/v) ca eluent toate la un debit de 1 mL/min (Tabelul 2).

C. Sinteza benzofuranil- si benzo[b]tiofenil-alaninelor racemice si a derivatilor acestora

Aldehidele au fost materii de pornire pentru sinteza aminoacizilor racemici si a derivatilor acestora (Schema 4). Aldehidele au fost transformate in derivati clorometilenici **7a-d** *via* alcoolilor corespunzatori **6a-d**. Alcoolii au fost sintetizati prin reducerea aldehydelor cu NaBH₄ in metanol, in timp ce compusii halogenati au fost obtinuti cu clorura de tionil in diclorometan in prezenta de 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazolului. Mai departe, cuplarea compusilor halogenati **7a-d** cu dietil-2-acetamido-malonat de dietil permite obtinerea derivatilor de dietil-2-acetamido-2-((heteroaril)metil)malonat **8a-d**. Printr-o hidroliza bazica blanda a dietil esterilor formati se obtin 2-acetamido-2-((heteroaril)metil)malonic acizii corespunzatori **9a-d**, care mai departe au fost decarboxilati prin fierbere in toluen sau xilen cu formarea N-acetilaminoacizilor racemici *rac*-**10a-d**. In ultima etapa, acizii 2-acetamido-3-(heteroaril)propanoici *rac*-**10a-d** au fost transformati chimic in esterii 2-acetamido-3-(heteroaril)propanoici racemici *rac*-**11a-d** cu diversi alcooli in THF in prezenta carbonil diimidazolului, respectiv in 4-((heteroaril)-metil)-2-metiloxazol-5(4*H*)-onele racemice corespunzatoare (*rac*)-**12a-d** in prezenta de diciclohexil carbodiimida (DCC) in diclorometan; hidroliza gruparilor N-acetil din *rac*-**10a-d** in mediu acid a permis sinteza aminoacizilor analogi de fenilalanina racemici, *rac*-**13a-d** izolati prin precipitare la punctul izoelectric.



Schema 4. Sinteza heteroaril alaninelor si a derivatiilor acestora

Tabelul 3. Timpii de terentie ai enantiomerilor **10-13a-d**.

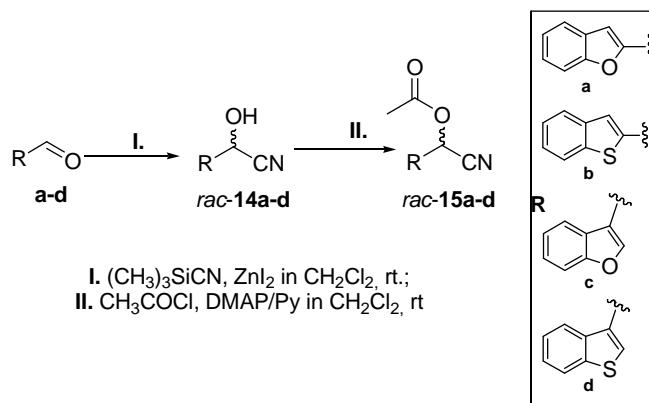
R. t. (min.)							
L-10a	D-10a	L-10b	D-10b	L-10c	D-10c	L-10d	D-10d
2.8	11.6	2.9	8.7	2.8	11.0	3.0	13.1
D-11a	L-11a	D-11b	L-11b	D-11c	L-11c	D-11d	L-11d
12.5 ^a	14.4 ^a	12.0 ^a	13.6 ^a	8.1 ^a	10.9 ^a	12.0 ^a	15.0 ^a
10.4 ^b	12.2 ^b	9.3 ^b	12.3 ^b	11.2 ^b	12.9 ^b	10.5 ^b	13.5 ^b
10.6 ^c	12.6 ^c	11.5 ^c	15.8 ^c	11.5 ^c	13.0 ^c	10.7 ^c	14.0 ^c
9.5 ^d	11.0 ^d	10.2 ^d	13.2 ^d	11.2 ^d	12.9 ^d	9.4 ^d	11.8 ^d
12a		12b		12c		12d	
8.9	12.3	11.3	11.5	7.5	8.1	8.2	9.0
L-13a	D-13a	L-13b	D-13b	L-13c	D-13c	L-13d	D-13d
8.8	14.9	10.1	15.2	8.9	13.5	10.5	15.7

^a ester metilic; ^b ester etilic; ^c ester propilic; ^d ester butilic

Analiza HPLC a fost realizata cu un cromatograf HP 1200 cu coloana Astec Chirobiotic-Tag (4.6×250 mm) si un amestec de metanol si tampon TEAA (pH 4.1), 80:20 (v/v) ca eluent pentru separarea enantiomerilor **10,13 a-d**, respectiv o coloana Chiralpak IA (4.6×250 mm) si un amestec de *n*-hexane si 2-propanol, 90:10 (v/v) ca eluent pentru **11-12a-d**, ambele la un debit de 1 mL/min.

D. Sinteza cianohidrinelor heterocicliceracemice și a derivațiilor 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 ZnI₂ anhidru, în diclorometan. Prin acilarea chimică a cianohidrinelor racemice cu clorură de acetyl în prezență de Py/DMAP au fost obținuți acetatii racemici ai cianohidrinelor, *rac*-**15a-d** (Schema 5).



Schema 5. Sinteza cianohidrinelor racemice și a acetatilor acestora

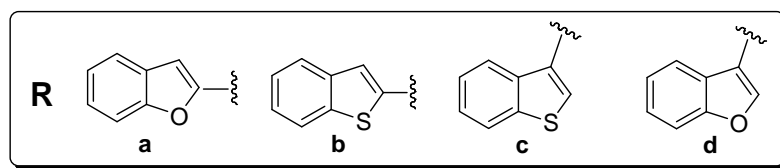
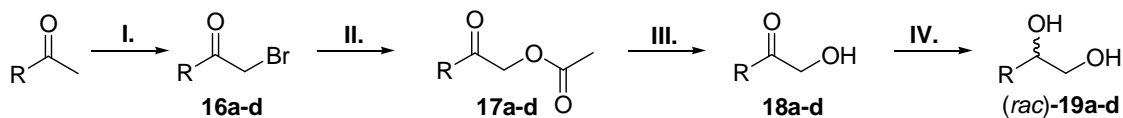
Analiza HPLC a fost realizata cu un cromatograf HP 1200 cu o coloana Chiralpak IA (4.6×250 mm) si un amestec de *n*-hexan si 2-propanol, 95:5 si 96:4 (v/v) ca eluent pentru **14-15a**, respectiv **14-15c**, cu o coloana Chiralpak IB (4.6×250 mm) si un amestec de *n*-hexan si 2-propanol, 91:10 (v/v) pentru **14-15d** sau cu o coloana Chiralcel OJ-H si un amestec de *n*-hexan si 2-propanol, 70:30 (v/v) ca eluent pentru **14-15b**, toate la un debit de 1 mL/min.

Tabelul 4. Timpii de retentie ai enantiomerilor **14-15a-d**

Compus	<i>t_R</i> (min)	Compus	<i>t_R</i> (min)
(<i>R</i>)- 14a	16.9	(<i>R</i>)- 15a	7.9
(<i>S</i>)- 14a	18.9	(<i>S</i>)- 15a	8.4
(<i>R</i>)- 14b	17.9	(<i>R</i>)- 15b	12.8
(<i>S</i>)- 14b	25.9	(<i>S</i>)- 15b	10.1
(<i>R</i>)- 14c	21.8	(<i>R</i>)- 15c	8.4
(<i>S</i>)- 14c	17.6	(<i>S</i>)- 15c	9.1
(<i>R</i>)- 14d	11.8	(<i>R</i>)- 15d	8.4
(<i>S</i>)- 14d	14.3	(<i>S</i>)- 15d	8.9

E. Sinteza heteroaril-etandiolilor racemici printr-o metodologie chemoenzimatica

Pentru obtinerea heteroariletandiolilor a fost utilizata o metodologie chemoenzimatica dezvoltata de noi, care utilizeaza metilcetonele aromatice (heteroariletanone) ca si materie prima. Astfel, heteroaril etanonele au fost α-bromurate cu tribromura de piridiniu in acid acetic glacial. α-Bromocetonele **16a-d** au fost mai departe transformate cantitativ in α-acetoximetilcetonele **17a-d** cu acetat de sodiu in dioxan uscat folosind eterul coroana 18C6 ca si catalizator de transfer interfazic. Printr-o etanoliza enzimatica a α-acetoximetilcetonele **17a-d** se obtine cu randamente excelente α-hidroximetil cetonele **18a-d**. In final acesti compusi au fost transformati cu borohidruza de sodiu in heteroaril-etandiolii racemici (*rac*-**12a-d**) (Schema 6).



I. $\text{CuBr}_2 / \text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, reflux; I. tribromura de piridiniu / CH_3COOH , 50°C ; II. $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$, 18C6 / dioxan, reflux;
 III. Novozym 435 / EtOH; IV. NaBH_4 / MeOH;

Schema 6. Sinteza chemoenzimatica a heteroaril-etandiolilor racemici (*rac*)-12a-d

In acest caz la analiza HPLC realizata cu acelasi aparat s-a utilizat o coloana Chiralpak IB (0.46cm×25cm) si un amestec de *n*-hexane si 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.

Tabelul 5. Timpii de retentie ai celor doi enantiomeri ai etandiolilor **19a-d**.

Entry	19	Timp de retentie enatiomer S	Timp de retentie enatiomer R
1	a	11.5	15.0
2	b	29.5	31.6
3	c	16.7	13.9
4	d	24.4	22.3

Director proiect,
