

Raport științific

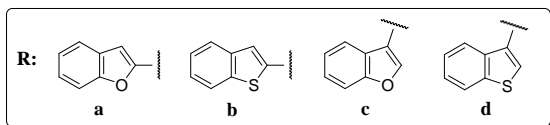
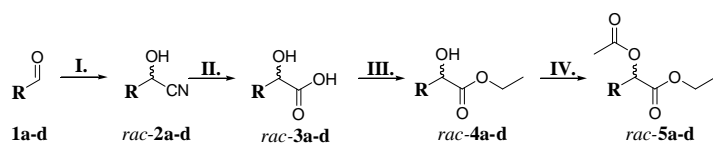
privind implementarea proiectului in anul 2012

PROCESE BIOORGANICE STEREOSELECTIVE CONTINUE DE REZOLUTIE CINETICA DINAMICA

Obiectivul 2. Etapa 1. Investigarea proceselor de rezolutie ale unor racemati prin rezolutie cinetica enzimatica (EKR).
Au fost realizate EKR ale unor compusi organici heterociclici.

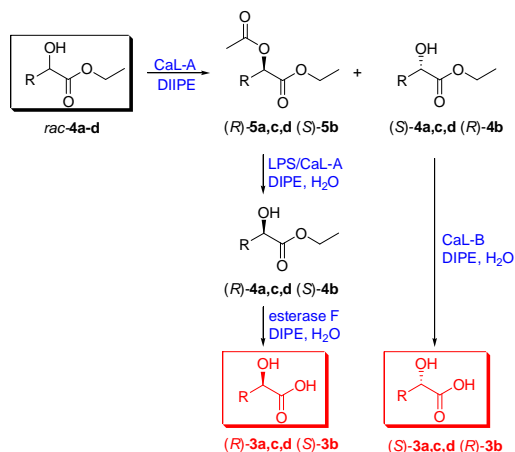
A. REZOLUTIA α -HIDROXIACIZILOR HETEROCICLICI

A fost studiată sinteza unor acizi 2-heteroaril-2-hidroxiacetici de înaltă enantiopuritate (ee 99%), pornind de la esterii etilici ai acizilor 2-benzofuranil- și 2-benzo[*b*]tiofenil-2-hidroxiacetici racemici.¹ Sinteza derivatilor esterici s-a realizat prin intermediul cianohidrinelor (Schema 1). Sinteza cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* presupune reacția aldehidelor heteroaromate corespunzătoare cu trimetilsilil cianură în prezența unei cantități catalitice de iodură de zinc anhidra în diclorometan. Prin hidroliza cianohidrinelor s-au obținut acizii 2-heteroaril-2-hidroxiacetici, *rac-3a-d*, care prin esterificare ulterioară au fost transformați în 2-heteroaril-2-hidroxiacetații de etil racemici *rac-4a-d*. 2-Acetoxi-heteroaril-2-acetații de etil racemici, *rac-5a-d*, au fost obținuți prin acilarea chimică a *rac-4a-d*.



I. 1. TMS-CN, 2. HCl/MeOH; II. HCl conc./1,4-dioxane;
III. Ethanol; IV. AcCl, DMAP 1%

Schema 1. Sinteza compusilor racemici *rac-2-5a-d* implicați în EKR



Schema 2. Obținerea α -hidroxiacizilor prin EKR

Tabelul 1. Sinteza α -hidroxiacizilor **3a-d** enantiopuri

Compus	η (%)	ee [%]	$[\alpha]_D^{25}$ ^a
(<i>R</i>)- 3a	90	99	+26
(<i>S</i>)- 3a	89	99	-27
(<i>R</i>)- 3b	92	99	-26.1
(<i>S</i>)- 3b	94	99	+25
(<i>R</i>)- 3c	91	99	+3
(<i>S</i>)- 3c	90	99	-2.7
(<i>R</i>)- 3d	90	99	+46
(<i>S</i>)- 3d	88	98	-48.3
(<i>R</i>)- 4a	90	95	-38.5
(<i>S</i>)- 4b	96	82	-37.1
(<i>R</i>)- 4c	92	75	-68.5
(<i>R</i>)- 4d	95	98	-103.7
(<i>S</i>)- 5a	86	92	+131.4
(<i>R</i>)- 5b	92	83	+81.3
(<i>S</i>)- 5c	89	93	+80.3
(<i>S</i>)- 5d	93	99	+100.8

Sinteza enantioselectivă mediată de lipaze a α -hidroxiacizilor presupune *O*-acilarea α -hidroxi-acizilor *rac-3a-d*, respectiv hidroliza enantioselectivă a α -hidroxiesterilor *rac-4a-d* și a diesterilor *rac-5a-d*.

Configurația absolută a α -hidroxiacizilor optici puri a fost determinată prin sinteza lor din (*R*)- și (*S*)-cianohidrinele corespunzătoare (cu configurație cunoscută) și compararea semnelor rotațiilor specifice ale α -hidroxiacizilor obținuți prin aceste două metode.

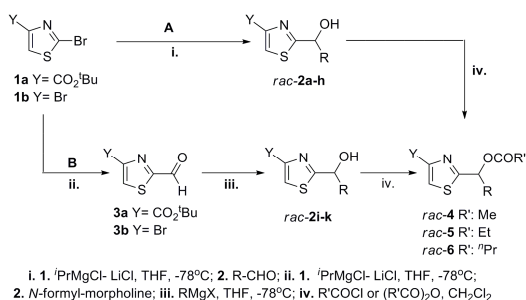
Folosind *rac-4a* ca și compus model, a fost optimizată acilarea enzimatică cu acetat de vinil atât ca agent de acilare cât și ca solvent, în prezența mai multor enzime, dintre care CaL-A a avut selectivitatea și activitatea cele mai bune. Dintre solvenții testați (polari, nepolari, aromatici și alifatici), 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.

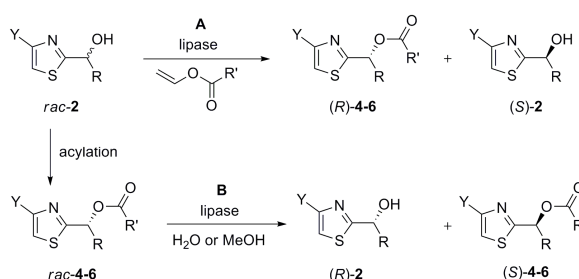
Dupa determinarea condițiilor optime pentru fiecare tip de reacție enzimatică, a fost realizată sinteza preparativă a acizilor (*R*)- și (*S*)-2-benzofuranil- și 2-benzo[*b*]tiofenil-2-acetici de înaltă enantiopuritate (Schema 2) prin *O*-acilarea enzimatică mediată de CaL-A în DIPE a hidroxiesterilor *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 (Tabelul 1).

B. REZOLUTIA UNOR ALCOOLI TIAZOLICI

Studiul a urmărit sinteza unor derivați de 4-carboxi- și 4-bromo-2-hidroxiimetiltiazol prin rezoluție cinetică mediată de enzime.² Studiul s-a realizat în două etape: sinteza chimică a 2- hidroxi-metiltiazolilor (Schema 3), 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 4).



Schema 3. Sinteza chimică a substraturilor tiazolice



Schema 4. Rezoluție cinetică enzimatică a derivatilor tiazolici

Tabelul 2. Acilarea și hidroliza/metanoliza enzimatică a derivatilor tiazolici

Nr.	Substrat	Y	R	Metoda	Timp(h)	ee _s (%)	ee _p (%)	c ^b	Alcool	(%) ^c	Ester	(%) ^c
1	2a	CO ₂ ^t Bu	Me	CaL A, DIPE, VA	2	99	97	51	(<i>S</i>)- 2a	43	(<i>R</i>)- 4a	28
2	4a	CO ₂ ^t Bu	Me	CaL B, DIPE/MeOH.	8	99	99	50	(<i>R</i>)- 2a	31	(<i>S</i>)- 4a	46
3	4b	CO ₂ ^t Bu	^t Bu	PLE, DIPE/PB (1:1)	18	99	94	51	(<i>R</i>)- 2b	48	(<i>S</i>)- 4b	43
4	6c	CO ₂ ^t Bu	^t Bu	CaL B, DIPE/MeOH (1:1)	48	99	99	50	(<i>R</i>)- 2c	43	(<i>S</i>)- 6c	44
5	4d	CO ₂ ^t Bu	ⁿ Octyl	PLE, DIPE/PB (1:1)	10	78	99	44	(<i>R</i>)- 2d	13	(<i>S</i>)- 4d	34
6	4d	CO ₂ ^t Bu	ⁿ Octyl	PLE, DIPE/PB (1:1)	22	88	88	50	(<i>R</i>)- 2d	22	(<i>S</i>)- 4d	33
7	2i	CO ₂ ^t Bu	vinyl	CaL B, DIPE, VA	18	72	98	42	(<i>S</i>)- 2i	46	(<i>R</i>)- 4i	36
8	4i	CO ₂ ^t Bu	vinyl	PLE, DIPE/PB (1:1)	2	84	88	49	(<i>R</i>)- 2i	49	(<i>S</i>)- 4i	46
9	2e	CO ₂ ^t Bu	Ph	CaL A, DIPE, VA	48	93	74	56	(<i>S</i>)- 2e	43	(<i>R</i>)- 4e	31
10	6f	Br	Me	CaL B, DIPE/MeOH	2	99	97	51	(<i>R</i>)- 2f	48	(<i>S</i>)- 6f	49
11	6g	Br	^t Bu	CRL, DIPE/PB (1:2)	57	38	99	28	(<i>R</i>)- 2g	26	(<i>S</i>)- 6g	33
12	5h	Br	^t Bu	CRL, DIPE/PB (1:2)	48	35	99	26	(<i>R</i>)- 2h	17	(<i>S</i>)- 5h	25
13	5h	Br	^t Bu	CRL, DIPE/PB (1:2)	72	72	74	49	(<i>R</i>)- 2h	19	(<i>S</i>)- 5h	16
14	5j	Br	^t Pr	CRL, DIPE/PB (1:2)	24	17	99	15	(<i>R</i>)- 2e	14	(<i>S</i>)- 5j	36
15	5j	Br	^t Pr	CRL, DIPE/PB (1:2)	48	99	80	55	(<i>R</i>)- 2e	36	(<i>S</i>)- 5j	31
16	2k	Br	vinyl	CaL A, DIPE, VA	12	58	83	41	(<i>S</i>)- 2k	41	(<i>R</i>)- 4k	36
17	4k	Br	vinyl	PLE, DIPE/PB (1:1)	2	80	40	67	(<i>R</i>)- 2k	45	(<i>S</i>)- 4k	34

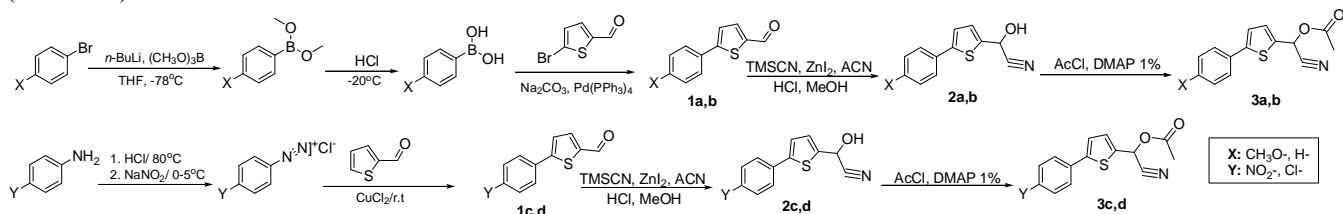
Sinteza chimică presupune transformarea bromoderivatului **1** în alcoolii racemici corespunzători printr-o transformare bazată pe schimb de Br/Mg cu reactivul Knochel, urmată de reacția acestuia cu aldehida corespunzătoare (Schema 3, metoda A), sau prin formilare urmată de reacția Grignard (Schema 3, metoda B). Acilarea chimică s-a realizat folosind clorura acidă sau anhidrida în CH₂Cl₂ în prezența *N,N*-dimetilaminopiridinei (DMAP).

Pornind de la substraturile racemice, s-a încercat rezoluția cinetică mediată 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 4, 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 4, B). Dintre solvenții organici testați, polari și apolari, DIPE și MTBE s-au dovedit cei mai potriviți pentru ambele metode. În Tabelul 2 sunt prezentate rezultatele reacțiilor enzimatiche de *O*-acilare, respectiv de hidroliză/metanoliză. 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.

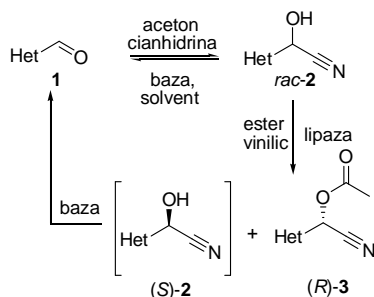
C. REZOLUTIA UNOR FENIL-TIOFENIL-CIANOHRIDRINE

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 aldehidele 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 aldehidelor feniltiofenice substituie, s-au utilizat doua 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 cloroderivatului 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 ZnI₂ în cantitate catalitică. Prin acilare chimică cu clorură de acetil, în prezență de DMAP, se obțin esterii racemici ai cianohidrinelor (Schema 5).



Schema 5. Sinteza cianohidrinelor și derivatilor esterici ai acestora



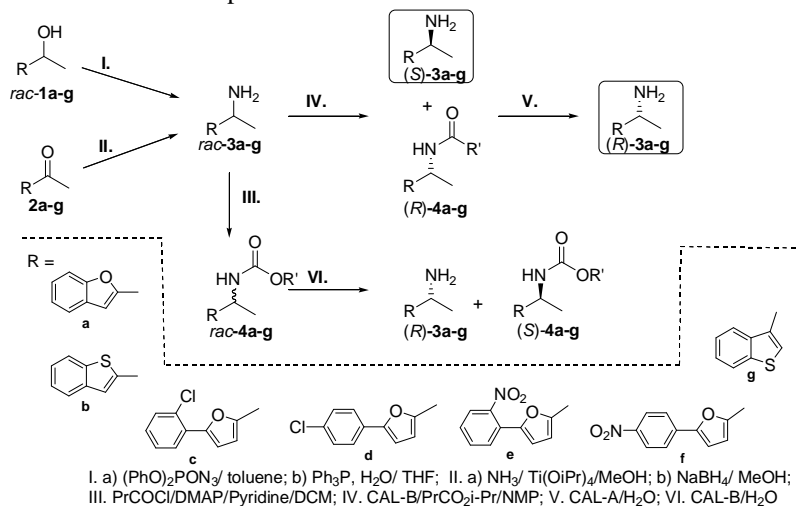
Schema 6. Procesul de DKR a cianohidrinelor studiate

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. După 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 adiția acidului cianhidric (generat *in situ* din aceton cianohidrină) 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*-dimetilnilina, DMAP, diisopropilamina, piridina), care fie au fost fie 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. REZOLUTIA UNOR HETEROARILETANAMINE

S-a urmarit obtinerea enantiomerilor unor benzofuran-, benzotiofen- si fenilfuraniletanamine printr-o metodologie chemoenzimatica (Schema 7).³ Etapa stereoselectiva este un proces de EKR a aminelor racemice *rac*-**3a-g**. In aceasta etapa au aparut doua probleme: solubilitatea redusa a compusilor studiati in solventi organici, respective instabilitatea heterociclurilor in etapa de hidroliza a amidelor (*R*)-**4a-g** pentru obtinerea aminelor (*R*)-**3a-g**, care necesita in general mediu acid sau bazic si temperaturi ridicate.



Schema 7. Sinteza si rezolutia cinetica enzimatica a heteroaril-etanaminelor heterociclice

Aceste probleme au fost rezolvate prin utilizarea unor cosolventi polari in etapa de EKR (NMP, N-metilpirolidona) si hidroliza enzimatica nestereoselectiva cu CAL A a amidelor (*R*)-**4a-g**. Astfel, ambii enantiomeri ai etanaminelor cu structura amintita au fost obtinuti prin *N*-acilare enantioselectiva cu butanoat de izopropil ca si agent de acilare si solvent, mediate de Novozym 435, prin utilizarea NMP ca si cosolvent; la conversii de 50% (dupa 3-4 ore) s-au obtinut ambii produse cu $ee > 97\%$ ($E > 200$). Reactia de deprotezare a butanamidelor (*R*)-**4a-g** si *rac*-**4a-g** in apa s-a realizat tot enzimatic, cu CAL-A-CLEA, cu randamente de 96-99%.

Obiectivul 3. Etapa 1. Procese biocatalitice cu enzime “anti-Kazlauskas”

Principalul dezavantaj al DKR cu lipaze este faptul ca majoritatea acestora prezinta *R*-enantioselectivitate si astfel permite obtinerea unui singur enantiomer din amestecul racemic. In scopul obtinerii enantiomerului opus, care se impune in anumite situatii, ne-am propus sa studiem posibilitatile de a obtine si utiliza in procesele de DKR studiate enzime cu selectivitate opusa, *S*-enantioselective, cunoscute si ca enzime “anti-Kazlauskas”. Cea mai des intalnita enzima din aceasta clasa este lipaza F, de aceea ne-am indreptat atentia asupra ei.

Obiectivul 3. Etapa 2. Obtinerea unor enzime “anti-Kazlauskas” prin fermentatii

In scopul obtinerii lipazei F s-a realizat fermentatia unor culturi de *Mucor hiemalis*, cunoscute pentru capacitatea lor de a produce lipaza F. Au fost parcursi in aceasta etapa urmatoorii pasi:

1. Optimizarea procesului de crestere celulara (mediu de cultura, temperatura, pH, durata)
2. Izolarea si purificarea enzimei prin metodele clasice:
 - a. Purificarea grosiera prin precipitare cu sulfat de amoniu sau acetona;
 - b. Purificarea avansata prin metode cromatografice (cromatografie de excluziune sterica, hidrofoaba si pe schimbatori de ioni);
3. Caracterizarea lipazei izolate, respectiv:
 - a. determinarea omogenitatatii prin SDS-PAGE;
 - b. determinarea activitatii enzimatice prin metoda hidrolizei esterilor *p*-nitro-fenolului;
4. Testarea potentialului biocatalitic al lipazei obtinute in procesele de rezolutie cinetica.

Rezultatele obtinute pana in acest moment au demonstrat ca cel mai eficient preparat enzimatic obtinut este produsul brut obtinut prin precipitare cu acetona (raport 1:5, v/v) dupa racire la 4°C timp de 12 h. Acesta prezinta o activitate enzimatica relativ ridicata si o stabilitate indelungata. Orice incercare de purificare prin cromatografie a preparatului enzimatic brut a condus la obtinerea unor solutii cu activitate enzimatica mai redusa si cu stabilitate diminuata, astfel incat cheltuielile implicate de o purificare avansata nu se justifica. Testarea pudrei acetone pe cateva substraturi model arata insa ca, desi lipaza izolata prezinta enantioselectivitatea opusa dorita, respectiv *S*, aceasta este totusi modesta (ee 55-82%) iar activitatea

enzimatica redusa (conversii de maxim 10% dupa 12 ore) si in concluzie utilizarea ei in procese de EKR sau DKR nu este avantajoasa din punct de vedere economic.

Concluzii

Au fost realizate ambele obiective prevazute pentru anul 2012.

1. Prin rezolutii cinetice enzimaticice a fost realizata sinteza ambilor enantiomeri ai unor compusi organici chirali cu importanta sintetica din clasa:
 - a. α -hidroxiacizilor heterociclici
 - b. alcoolilor tiazolici
 - c. fenil-tiofenil-cianohidrinelor
 - d. heteroaril-etanamineLOR
2. Au fost efectuate studii preliminare pentru realizarea unor procese de rezolutie cinetica enzimatica, prin testarea agentilor bazici capabili sa realizeze racemizarea eficienta *in situ* a fenil-tiofenil cianohidrinelor
3. S-a reusit producerea si izolarea unei lipaze "anti-Kazlauskas", dar performantele catalitice (activitate si selectivitate) sunt modeste, astfel incat utilizarea ei in procese de DKR nu este economic avantajoasa.

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

1. Mara Ana Naghi, László Csaba Bencze, Jürgen Brem, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Monica Ioana Tosa: **Sequential enzymatic procedure for the preparation of enantiomerically pure 2-heteroaryl-2-hydroxyacetic acids** *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 181-187 (IF 2.652)
2. Laura Pop, 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 (IF 2.652)
3. Jürgen Brem, László-Csaba Bencze, Arto Liljebld, Mihaela C. Turcu, Csaba Paizs, Florin-Dan Irimie, Liisa T. Kanerva: **Chemoenzymatic preparation of 1-heteroarylethanamines of low solubility** *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 17, 3288-3294 (IF 3.329)

DIRECTOR PROIECT,
PROF. DR. ING. FLORIN DAN IRIMIE