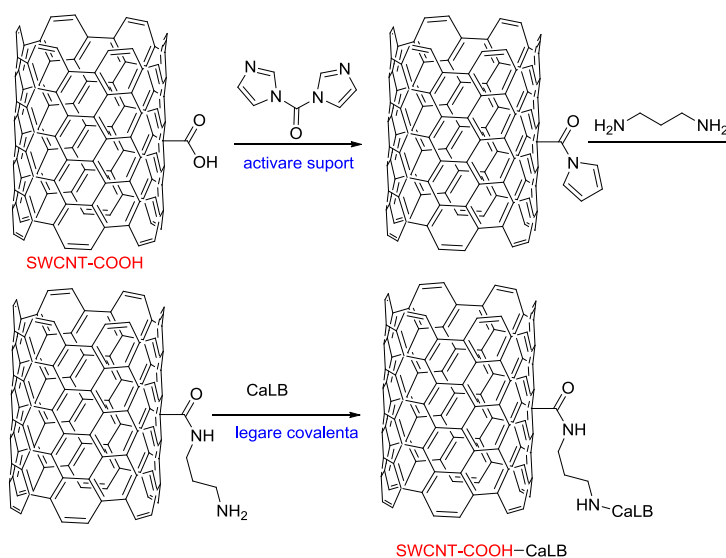


RAPORT ȘTIINȚIFIC
privind implementarea proiectului în anul 2014

OBIECTIVUL 1. 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-COOH). 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 preveni pierderea flexibilității enzimei, care poate duce la scăderea semnificativă sau chiar pierderea activității catalitice, s-a introdus și o grupare distantțoare (*spacer arm*) prin intercalarea 1,3-propilendiaminei între suportul testat și enzimă, prin reacțiile prezentate în următoarea schemă.



Schema 1. Imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxilice. (SWCNT-COOH)

Mod de lucru:

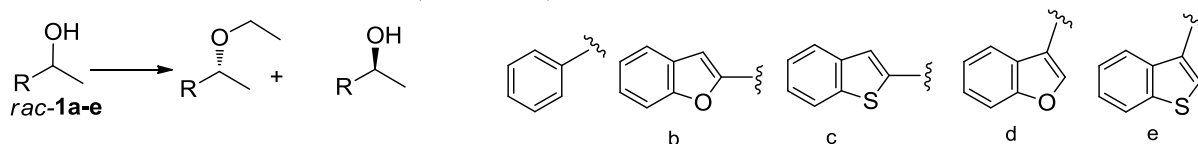
Suportul SWCNT-COOH (40 mg) s-a incubat cu carbonil diimidazol (200 mM) în 5mL CH₂Cl₂ sub agitare la 1350 rpm, peste noapte, la temperatura camerei, cu sonicare ocazională, pentru a evita formarea conglomeratelor de nanotub. După incubare proba a fost filtrată pe membrane și spălată cu CH₂Cl₂. La produsul solid rezultat s-a adăugat propilen-1,3-diamină în apă distilată iar suspensia s-a agitat la temperatura camerei peste noapte cu sonicare 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 (SWCNTCOOH-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 enzimatice a soluției apoase de enzimă înainte și după efectuarea imobilizării, respectiv a apelor de spălare.

Activitatea enzimatică s-a determinat spectrofotometric, utilizând reacția de hidroliză acetatului de *p*-nitrofenil și monitorizarea concentrației de *p*-nitrofenol format, o metodă uzuală.

Testarea enzimei imobilizate în procese de rezoluție cinetică enzimatică a unor alcooli secundari

Preparatul enzimatic obținut a fost testat în rezoluția cinetică a unor alcooli heterociclici racemici *rac-1a-d* (Schema 2)



Schema2. Rezoluția cinetică a alcoolilor racemici mediată de SWCNTCOOH-CALB

Acilarea enzimatică ai 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 promițătoare, prezentate succint în Tabelul 1.

Tabelul 1. Conversia și excesul enantiomerice a reacțiilor catalizate de SwCNT_{COOH}-CALB

Substrat	Timp (h)	c (%)	ee _s	ee _p
<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 SWCNTCOOH-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 (Figura 1).

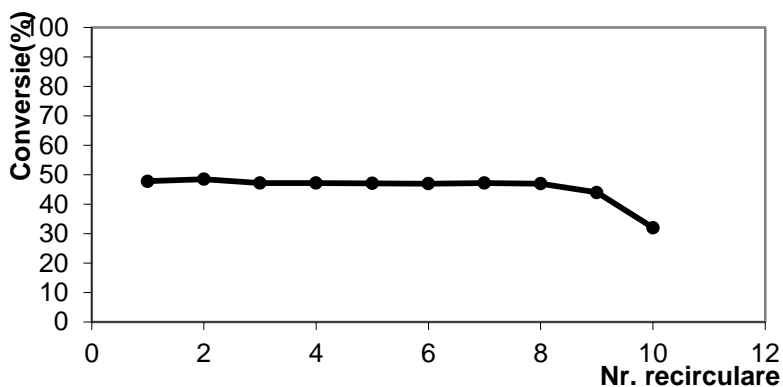


Figura 1. Reutilizarea SWCNTCOOH-CALB

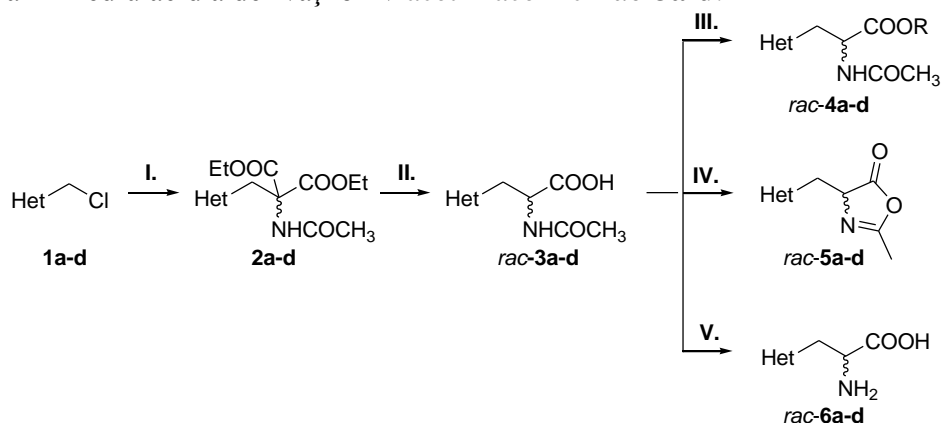
OBIECTIVUL 2. DETERMINAREA AGENTILOR DE RACEMIZARE OPTIMI PENTRU FIECARE TIP DE SUBSTRAT

Activitatea 1. Studiul compușilor acizi și bazici ca agenți de racemizare

A. SINTEZA CHEMOENZIMATICĂ A UNOR L-(2-ARILTIAZOL-4-IL)ALANINE

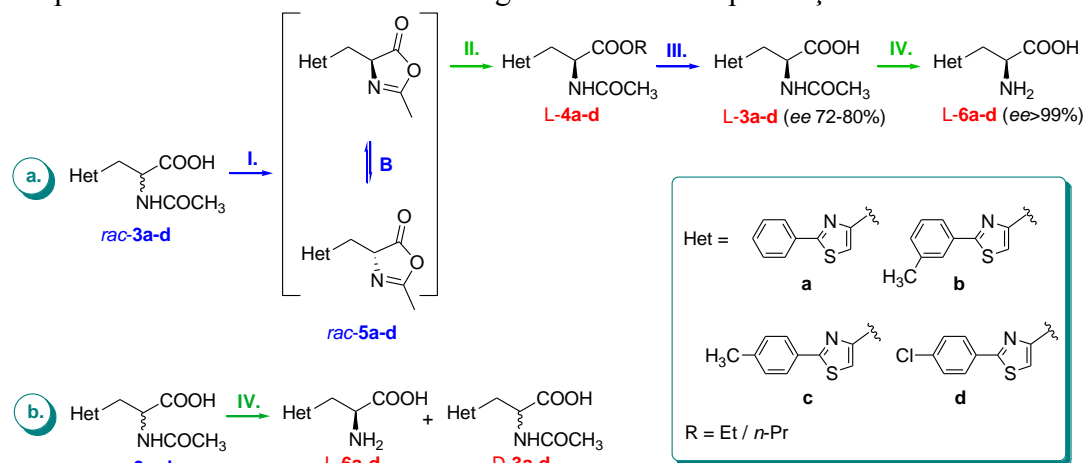
A fost studiată sinteza chemoenzimatică a unor L-(2-ariltiazol-4-il)alanine, pornind de la derivații racemici *N*-acetil corespunzători, prin combinarea a două etape enzimatiche stereoselective: rezoluția cinetică dinamică mediată de lipaze a oxazol-5(4*H*)-onelor urmată de hidroliza catalizată de Acilaza 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 *rac*-**6a-d** și a derivaților acestora este descrisă în **Schema 3**. Derivații 2-aril-4-clorometiltiazolici **1a-d** au fost sintetizați printr-o metodă descrisă anterior în literatură, prin condensarea Hantzsch a diferitelor tioamide cu 1,3-dicloroacetona. Acizii 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici *rac*-**3a-d** au fost obținuți prin cuplarea compușilor halogenați **1a-d** cu esterul dietil-acetamidomalonic, urmată de o etapă de hidroliză bazică și apoi decarboxilare. Esterii *rac*-**4a-d** au fost obținuți prin tratarea *rac*-**3a-d** cu diferiți alcooli (metanol, etanol, *n*-propanol și *n*-butanol) în tetrahidrofuran uscat în prezența carbonildiimidazolului (CDI). Ciclizarea *rac*-**3a-d** în prezență de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimidă (DCC), în diclorometan uscat a condus la obținerea oxazolonei *rac*-**5a-d** corespunzătoare. 2-Ariltiazol-4-il alaninele racemice *rac*-**6a-d** au fost sintetizate prin hidroliza în mediu acid a derivaților *N*-acetil racemici *rac*-**3a-d**.



Schema 3. Sinteza 2-ariltiazol-4-il alaninelor racemice și a derivaților acestora. Reactivi și condiții: I. NaH, $\text{CH}_3\text{CONHCH}(\text{COOEt})_2/\text{DMF}$, 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_2Cl_2 ; V. 18% HCl, reflux, 4h.

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 4a**). Oxazol-5(4*H*)-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 baze 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.



Schema 4. a). Sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor și a derivaților acestora (scară preparativă). Reactivi și condiții: **I.** DCC/CH₂Cl₂, 0°C; **II.** CaL-B, etanol (pentru DKR a *rac-5a-c*) / *n*-Propanol (pentru DKR a *rac-5d*), acetonitril; **III.** Na₂CO₃, H₂O, reflux; **IV.** Acilaza I, pH 7-8. **b).** Rezoluția cinetică enzimatică a *rac-3a-d* mediată de Acilaza 1, pH 7-8.

Inițial s-a studiat procesul de DKR enzimatic al oxazol-5(4*H*)-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 oxazolonic 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. Condițiile de separare și timpii de retenție pentru fiecare compus sunt trecuți în Tabelul 2.

Tabelul 2. Separarea cromatografică a *rac-3-6a-d*

Condiții de separare	RP-HPLC Astec chirobiotic V2, eluent: MeOH:CH ₃ COOH:Et ₃ N 200:0.15:0.15 v/v/v							
Compus	L-3a	D-3a	L-3b	D-3b	L-3c	D-3c	L-3d	D-3d
T _R (min)			4.5	6.0	4.8	6.4		
Condiții de separare	HPLC Chiralpak IC, eluent: <i>n</i> -hexan: 2-propanol 80:20 v/v							
Compus	S-5a	R-5a	S-5b	R-5b	S-5c	R-5c	S-5d	R-5d
T _R (min)	11.2	12.4	11.5	12.6	11.3	12.5	10.2	12.0
Compus	L-4a	D-4a	L-4b	D-4b	L-4c	D-4c	L-4d	D-4d
T _R (min)	29.9 ^a 24.4 ^b 20.3 ^c 19.7 ^d	36.4 ^a 30.2 ^b 25.2 ^c 24.0 ^d	25.0 ^b	29.2 ^b	28.5 ^b	34.0 ^b	28.9 ^a 25.0 ^b 19.0 ^c 18.6 ^d	35.5 ^a 30.0 ^b 23.2 ^c 22.7 ^d
Condiții de separare	RP-HPLC Zwix(+), eluent: MeOH (50mM HCOOH, 25mM dietilamina): acetonitril: H ₂ O 49:49:2 v/v/v							
Compus	<i>rac-3a</i>		<i>rac-3b</i>		<i>rac-3c</i>		<i>rac-3d</i>	
T _R (min)	5.9		4.2		5.2		4.1	
Compus	L-6a	D-6a	L-6b	D-6b	L-6c	D-6c	L-6d	D-6d
R _t (min)	10.9	18.8	9.5	20.2	10.3	21.2		

^aester metilic; ^bester etilic; ^cester *n*-propilic; ^dester *n*-butilic

Într-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 (Tabelul 2): Lipozyme *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 (Tabelul 2, rând 2). Prin urmare, lipaza CaL-B a fost aleasă pentru studiile ulterioare.

Tabelul 2. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a oxazolonei *rac-5a*, în etanol, după 4.5h.

Nr.crt.	Lipază	<i>ee_p</i> %
1.	<i>Candida rugosa</i>	- ¹
2.	AK "Amano"	17.5 ²
3.	<i>Burkholderia cepacia</i>	11.0 ²
4.	Lipaza B din <i>Candida antarctica</i>	72.0
5.	<i>Candida cylindraceae</i>	- ¹
6.	Lipaza F	9.1
7.	Lipozyme <i>Mucor miehei</i>	44.3

¹conversie scăzută; ²selectivitate inversă

Tabelul 3. Excesul enantiomeric al L-2-amino-3-(2-aziridin-4-il)propanoatilor obținuți prin deschiderea inelului oxazolonic al *rac-5a* în prezența lipazei CaL-B folosind diferiți alcooli drept nucleofili, la conversie totală

Nr. crt.	Alcool	Produs	<i>ee</i> %
1.	Metanol	L-3a metil ester	7.6
2.	Etanol	L-3a etil ester	72.0
3.	<i>n</i> -Propanol	L-3a <i>n</i> -propil ester	47.5
4.	<i>n</i> -Butanol	L-3a <i>n</i> -butil ester	35.3

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 (Tabelul 4).

Tabelul 3. Testarea unor solvenți în reacția de alcooliză enantioselectivă a oxazolonei *rac-5a*, în prezență de CaL-B și etanol, după transformarea completă a substratului (6 zile)

Nr. crt.	Solvent	<i>ee_p</i> %
1.	1,4-Dioxan	51.3
2.	Diclorometan ¹	-
3.	Toluen	58.9
4.	Acetonitril	36.7
5.	Tetrahidrofuran	29.2
6.	Dietileter	30.0

¹conversie scăzută

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 (Tabelul 5). Cele mai bune rezultate au fost obținute utilizând acetonitrilul drept solvent (Tabelul 5, rând 4) și etanolul ca și nucleofil (Tabelul 6, rând 2). 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 (Tabelul 6,

rând 5, 6) iar pentru *rac-5d* cele mai bune rezultate au fost obținute folosind *n*-propanol în acetonitril (Tabelul 6, rând 7).

Tabelul 6. Testarea unor solvenți în reacția de alcooliză enantioselectivă a oxazolonei *rac-5a*, în prezență de CaL-B, etanol și catalizator de racemizare (dietilaminoetanol imobilizat)

Nr. crt.	Solvent	<i>ee_p</i> %
1.	1,4-Dioxan	60.4
2.	Diclorometan ¹	-
3.	Toluen	60.6
4.	Acetonitril	80.0
5.	Tetrahidrofuran	64.0 ¹
6.	Dietileter	30.4

¹conversie scăzută

Tabelul 7. 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	<i>ee_p</i> %
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

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 7).

Tabelul 8. Randamente și excese enantiomerice ale procesului de DKR enzimatic al *rac-5a-d*, mediat de CaL-B, în prezență de alcool (3 echiv. etanol sau *n*-propanol) și catalizator de racemizare, în acetonitril.

Nr. crt.	Substrat	Produs	Randament %	<i>ee_p</i> %
1.	<i>rac-5a</i>	L-3a etil ester	79	73.0
2.	<i>rac-5b</i>	L-3b etil ester	81	72.0
3.	<i>rac-5c</i>	L-3c etil ester	77	73.1
4.	<i>rac-5d</i>	L-3d <i>n</i> -propil ester	80	76.0

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 4).

Randamentele globale și rotațiile optice specifice ale L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor sunt trecute în Tabelul 9.

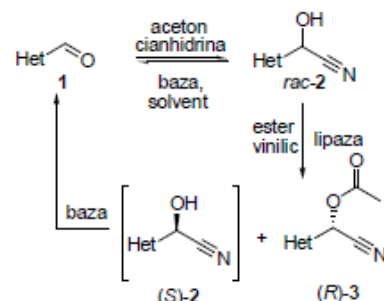
Tabelul 9. Randamente globale și rotații specifice ale L-2-ariltiazol-4-il alaninelor L-6a-d, obținute prin DKR a *rac-5a-d* mediată de CaL-B urmat de hidroliza enantioselectivă a L-3a-d catalizată de Acilaza 1.

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

^a*ee*>99% în toate cazurile

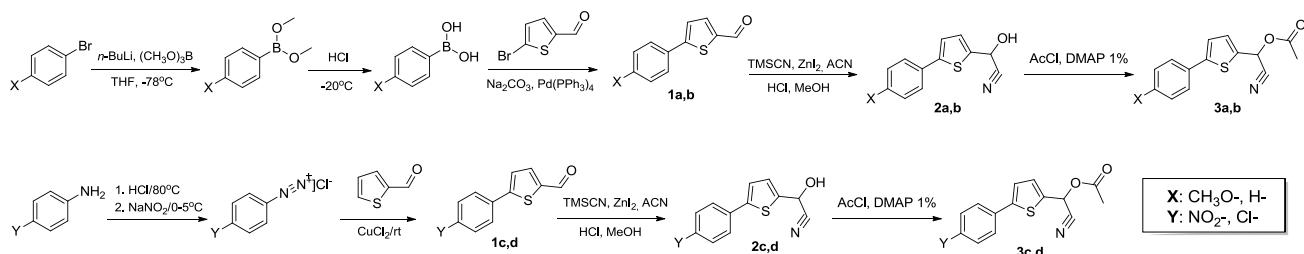
B. REZOLUȚIA CINETICĂ DINAMICĂ MEDIATĂ DE LIPAZE A UNOR FENIL-TIOFENIL-CIANOHRIDRINE

În acest studiu s-a urmărit sinteza unor esteri ai cianohidrinelor cu schelet feniltiofenic de puritate optică ridicată prin intermediul rezoluției cinetice dinamice.



Schema 5. Procesul de DKR a cianohidrinelor studiate

Pentru sinteza aldehydelor feniltiofenice substituie, s-au utilizat două strategii: *p*-nitro- și *p*-cloro-derivatul s-au obținut prin reacția Meerwein (cuplarea sării 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 pe bază de paladiu). Aldehidele astfel obținute au fost transformate în cianohidrinele corespunzătoare cu trimetilsilil cianură în prezență de ZnI₂ în cantitate catalitică. Prin acilare chimică cu clorură de acetyl, în prezență de DMAP, se obțin esterii racemici ai cianohidrinelor (Schema 6).



Schema 6. Sinteza cianohidrinelor feniltiofenice și a derivaților acestora

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 (Tabelul 10).

Tabelul 10. Timpii de retenție ai enantiomerilor 2,3a-d

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

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-hidroxiacetoneitrililor *rac-2a-d* cu acetat de vinil drept donor de acil ireversibil. Inițial, s-au realizat reacțiile la scară analitică folosind *rac-2a* drept compus model. Majoritatea enzimelor testate (CaL-B, AK-sol-gel, CrL) au fost inactice după 3 ore. Lipaza AK (*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 uscați, 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.

Tabelul 11. Acilarea enantioselectivă a *rac-2a* cu vinil acetat mediată de diferite lipaze, în diferiți solvenți

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

Tabelul 12. Acilarea enzimatică a *rac-2a-d* la scară preparativă utilizând condițiile optime identificate la scară analitică

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

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 aldehidele corespunzătoare (**Schema 5**). 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 Al₂O₃ bazic drept agent de racemizare. Efectul temperaturii asupra procesului de DKR a fost de asemenea investigat (Tabelul 13).

Tabelul 13. Efectul temperaturii asupra procesului de DKR a *rac-2a* în prezența acetatului de vinil, Al₂O₃ bazic, în MTBE, mediat de L-AK (după 5 ore)

Nr. crt.	Temperatură (°C)	ee_p (%)	ee_s (%)	<i>c</i> (%)
1	25	89	80	57
2	30	92	87	75
3	40	85	68	77

Condițiile optime identificate pentru DKR a compusului model *rac-2a* au fost aplicate și celorlalte cianhidrine *rac-2b-d* (Tabelul 14).

Tabelul 14. DKR a *rac-2a-d* mediat de L-AK, în prezența acetatului de vinil, a Al₂O₃, în MTBE la 30°C

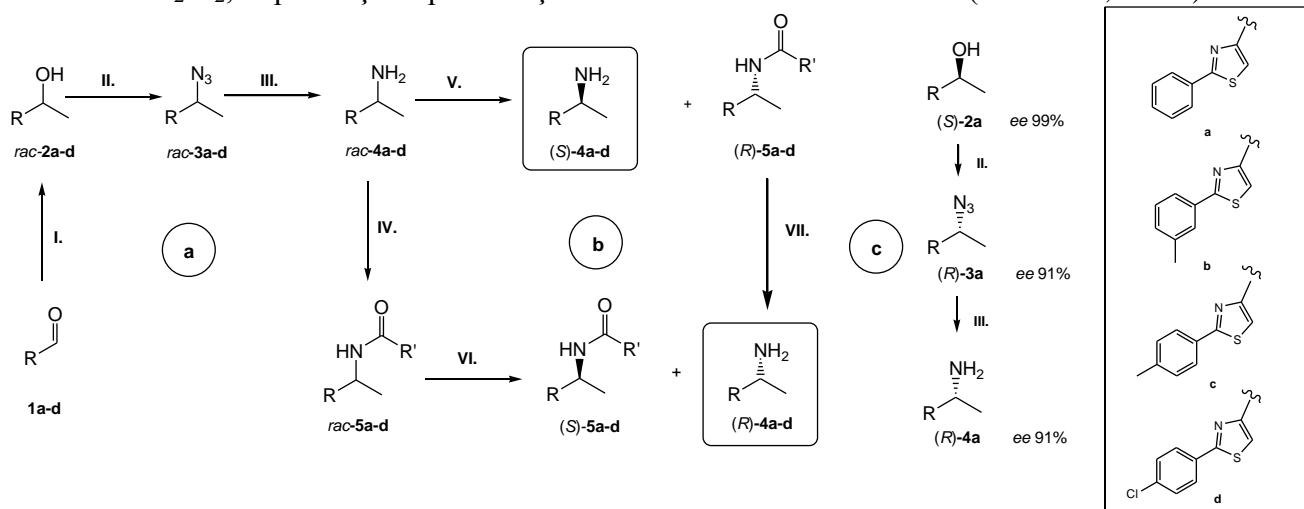
Substrat	Timp (h)	c (%)	ee _p (%)	ee _s (%)
<i>rac-2a</i>	7	99	92	87
<i>rac-2b</i>	8	99	88	85
<i>rac-2c</i>	7	99	91	86
<i>rac-2d</i>	9	99	88	82

Activitatea 2. Studiul catalizatorilor metalici ca agenți de racemizare

A. REZOLUȚIA CINETICĂ DINAMICĂ A UNOR FENIL-TIAZOLIL-ETANAMINE

Studiul efectuat urmărește 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 (Pd/Al₂O₃) 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 CH₂Cl₂, în prezență de piridină și o cantitate catalitică de DMAP (Schema 7, ruta a).



Schema 7. Sinteza 1-(2-feniltiazol-4-il)etanaminelor studiate și a etanacetamidelor corespunzătoare. Reactivi și condiții: **I.** CH₃MgI, dietil eter; **II.** (PhO)₂PON₃/toluen; **III.** Zn/NH₄Cl, H₂O/etanol; **IV.** CH₃(CH₂)₂COCl/DMAP/piridină/DCM; **V.** CaL-B/etil *n*-butirat/ACN, 23 °C; **VI.** CaL-B/H₂O, 45 °C; **VII.** CaL-A/H₂O, 45 °C.

În scopul investigării stereoselectivității reacțiilor în care sunt implicate 1-(2-feniltiazol-4-il)etanaminele chirale *rac-4a-d* și amidele lor *rac-5a-d*, mai întâi s-a stabilit metoda de separare cromatografică a enantiomerilor acestora (Tabelul 15). Pentru aceasta s-au folosit coloane chirale [Chiralcel OJ-H și Chiralpak ZWIX(+)] și faze mobile adecvate.

Tabel 15. Analiza HPLC a compușilor *rac-4,5a-d*

Amine	Condiții	Timp de retenție (min)		Amide	Condiții	Timp de retenție (min)	
		$t_{r(S)}$	$t_{r(R)}$			$t_{r(S)}$	$t_{r(R)}$
4a	70:28:2 ^a	25.3	26.7	5a	85:15 ^c	6.1	7.9
4b	70:28:2 ^a	24.4	26.8	5b	90:10 ^c	6.6	7.9
4c	80:20:2 ^b	9.2	10.0	5c	85:15 ^c	5.8	7.8
4d	90:10:1 ^b	10.7	11.2	5d	90:10 ^c	7.5	8.7

^a raport de ACN:MeOH (50 mM acid formic + 25 mM DEA):H₂O [Chiralpak ZWIX(+), 1.0 mL/min]

^b raport de *n*-hexan:2-propanol:DEA (Chiralcel OJ-H, 0.9 mL/min)

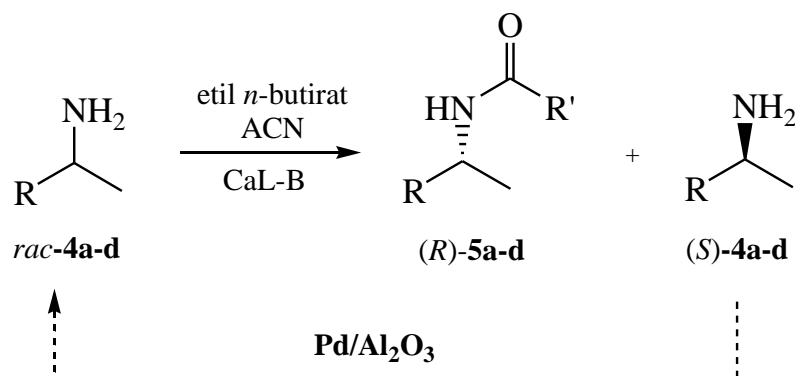
^c raport de *n*-hexan:2-propanol (Chiralcel OJ-H, 1.0 mL/min)

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 *n*-butiratul și etil propionatul. În urma screening-ului efectuat, lipazele CRL, PS și AK pe Celită s-au dovedit a fi inactive 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 etil *n*-butiratul. 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 etil *n*-butirat în ACN uscat în prezența lipazei CaL-B (Tabel 16, rând 3).

Tabel 16. *N*-acilarea compusului model *rac-4a* cu CaL-B la temperatura ambiantă după 16 ore.

Nr. crt.	Donor de acil	Solvent	c (%)	E
1	izopropil <i>n</i> -butirat	toluen	40	$\gg 200$
2	etil <i>n</i> -butirat	toluen	44	$\gg 200$
3	etil <i>n</i>-butirat	ACN	50	$\gg 200$

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 8**). 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 alumina și Pd depus de BaSO₄ în reacția de acilare a *rac-4a* cu etil *n*-butirat, în ACN, în prezența lipazei CaL-B la diferite temperaturi (Tabelul 17).

**Schema 8.** Rezoluția cinetică dinamică a etanaminelor

Tabelul 17. Screening-ul pentru catalizator de racemizare și temperatură optime în procesul de DKR a *rac-4a* cu etil *n*-butirat și CaL-B în ACN

Nr. crt.	Catalizator (5 mol%)	Temperatură (°C)	Timp (h)	<i>c</i> (%)	<i>ee_p</i> (%)
1	Pd/C	25	45	12	91
2		50	30	20	82
3	Pd/Al ₂ O ₃	25	57	54	99
4		50	25	68	99
5	Pd/BaSO ₄	25	77	52	99
6		50	54	57	99

În continuare s-a investigat cantitatea optimă de agent de racemizare (Tabelul 18).

Tabelul 18. DKR a *rac-4a* cu etil *n*-butirat, CaL-B și diferite cantități de Pd/Al₂O₃ în ACN la 50°C după 24 h

Nr. crt.	Pd/Al ₂ O ₃ (mol %)	<i>c</i> (%)	<i>ee_p</i> (%)
1	2.5	46	99
2	5	67	99
3	10	72	99
4	15	75	97

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 7, ruta b).

În acest sens s-au testat activitatea și enantioselectivitatea a 4 preparate enzimatiche 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 (Tabel 19). 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 (Tabel 19, rând 1). 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 (Tabel 19, rând 4). Aminele (*R*)-**4a-d** au putut fi obținute și prin deprotejarea amidelor (*R*)-**5a-d** în apă la 45°C (60 de ore).

Tabel 19. Hidroliza enzimatică a *rac-5a* în apă la scară analitică, după 30 de ore.

Nr. crt.	Enzimă	Temperatură (°C)	<i>c</i> (%)	<i>ee_s</i> (%)	<i>ee_p</i> (%)	<i>E</i>
1	CaL-B (Novozyme 435)	23	28	37	>99	>200
		45	45	80	>99	>200
2	CaL-B (Chiral Vision)	23	39	64	>99	>200
		45	44	78	>99	>200
3	CaL-A liberă	23	14	3	18	1
		45	31	9	20	2
4	CaL-A pe Celită	23	55	5	4	1
		45	75	18	6	1

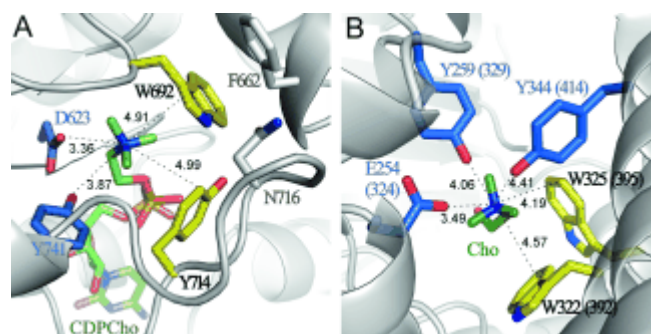
Condițiile optime găsite pentru rezoluțiile cinetice enzimatiche ale *rac-4a* și *rac-5a* au fost aplicate în continuare și celorlalte substraturi *rac-4,5b-d*. Configurația absolută a feniltiazolil-etanaminelor optic pure a fost determinată sintetizând amina (*R*)-**4a** pornind de la alcoolul (*S*)-**2a** (de configurație cunoscută, **Schema 7, ruta c**) și comparând semnele rotațiilor specifice ale etanaminelor obținute prin aceste două metode. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 20**.

Tabelul 20. DKR și KR a *rac*-**4,5a-d** la scară preparativă

Compus	η (%) ^a	<i>ee</i> (%)	$[\alpha]_D^{25}$	<i>E</i>	Compus	η (%) ^a	<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	

Activitatea 3. 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 cation-electroni π . 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 2).

**Figura 2.** Coordinarea colinei la situsul activ al PfCCT și PfCK

Ca exemplu, activitatea enzimatică și capacitatea de legare a ligandului pentru enzimele mutante obținute sunt prezentate în Figura 3 și Tabelul 2.

Tabelul 2. Caracterizarea cinetică a mutațiilor PfCCT MΔK

Enzimă	k_{cat} [s ⁻¹]	$K_{M,CTP}$ [μM]	$K_{M,ChoP}$ [mM]	rel. $k_{cat}/K_{M,CTP}$	rel. $k_{cat}/K_{M,ChoP}$
MΔK ^[a]	1.45±0.05	168±17	1.8±1.1	1	1
MΔK ^{Y714F}	0.21±0.01	580±60	10.2±1.1	0.042	0.026
MΔK ^{W692F}	0.13±0.03	890±380	7.5±2.4	0.018	0.022
MΔK ^{W692Y}	0.03±0.003	191±64	1.3±0.2	0.017	0.029
MΔK ^{D623N}	0.006±0.001	460±190	13.1±3.1	0.0015	0.00057
MΔK ^{Y741F}	0.019±0.002	790±180	8.5±2.0	0.0028	0.0028
MΔK ^{W692A}	6×10 ⁻⁴	ND ^[b]	ND ^[b]	ND ^[b]	ND ^[b]

^a Valori din literatură; ^b Nu au putut fi determinate

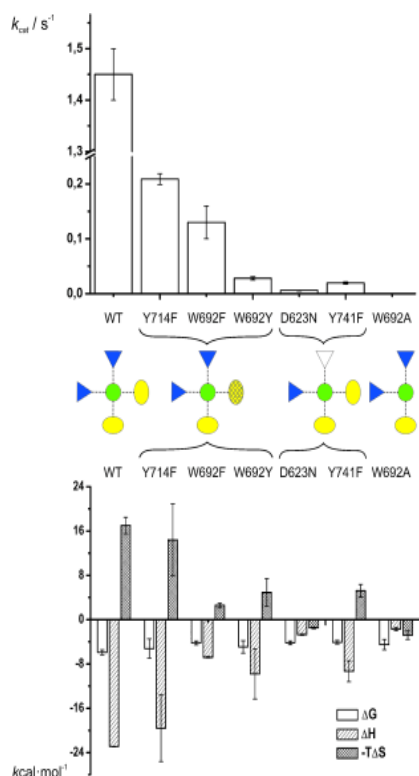


Figura 3. Efectul mutațiilor asupra activității enzimatică și capacității de legare a ligandului a PfCCT ΔAK

Rezultatele obținute indică faptul că înlocuirea resturilor de aminoacizi încărcate electric cu unele fără sarcină conduce la scăderea eficienței actului catalitic, datorată unei coordonări alterate a colinei.

În concluzie 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 enzyme (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.

REZULTATELE OBȚINUTE ÎN ACEST AN S-AU CONCRETIZAT PRIN PUBLICAREA A DOUĂ ARTICOLE ȘI TREI PREZENTĂRI ORALE SAU POSTERE LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE. CONSIDERĂM CĂ ACTIVITĂȚILE PROPUSE AU FOST REALIZATE ȘI OBIECTIVELE AFERENTE ETAPEI 2014 AU FOST ATINSE ÎN TOTALITATE.

Prof. Dr. Ing.
Florin Dan IRIMIE