RAPORT ŞTIINȚIFIC ŞI TEHNIC 2015

Programul: Parteneriate in domenii prioritare, contract nr. 206/01/07.2014
Denumirea programului: Kit inovativ în sinteza compuşilor chimici optic puri prin combinarea biocatalizei cu procesarea prin reacții tip click
Acronim proiect: BIOCLICK

Etapa 2. Dezvoltarea şi optimizarea rezolutiei cinetice enzimatice şi a unui procedeu eficient de imobilizare a enzimelor

Rezumatul etapei

S-au dezvoltat procedee eficiente de stabilizare a lipazelor prin diferite metode de imobilizare și combinații ale acestora (adsorbție, legare covalentă, entrapare în matrici de sol-gel, entrapare combinată cu adsorbție). Preparatele obținute au fost testate cu succes atât pentru substraturi racemice disponibile comercial cât și pe substraturi de tipul heteroaril-etanolilor racemici sintetizate în laborator și caracterizate prin spectrometrie de masă şi spectrometrie de rezonanță magnetică ^{1}H şi ^{13}C, cu potențială activitate biologică. În mod particular, rezultate foarte bune au fost obținute pe substraturile racemice 1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)etan-1-ol şi 1,5-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen cu lipaze din *Candida antarctica* B şi respectiv *Burkholderia cepacia*, imobilizate prin metoda sol-gel. Pentru toate substraturile şi produşii de reacție au fost elaborate metodele de separare şi analiză cromatografică a izomerilor optici ai compuşilor de tip alcooli și esteri.

Preparatele enzimatice obținute prin imobilizare în matrici hibride mezoporoase de tip sol-gel s-au dovedit a fi cele mai eficiente ca activitate şi enantioselectivitate. S-a demonstrat că metoda de imobilizare prin sol-gel poate fi considerată generică, fiind aplicabilă în afară de lipază şi pentru alte enzime prin reglarea fină a condițiilor de imobilizare. Biocatalizatorii obținutî au fost caracterizați morfologic utilizând tehnici instrumentale moderne ca microscopia confocală cu scanare laser (LSCM), microscopia electronică de scanare (SEM) sau microscopia de forță atomică (AFM). Rezultatele indică faptul că enzima este uniform distribuită în matrice, suporturile sintetizate au prezentat nanounități bine-definite, cu dimensiuni uniforme. Studiile de stabilitate operațională a lipazelor în mai multe cicluri de reacție au indicat o activitate remanentă foarte bună a preparatelor, cazurile favorabile fiind cele în care s-au înregistrat pierderi de sub 10% a activității după 10 cicluri de reacție și fără modificări semnificative a enantioselectivității. Această stabilitate excelentă va fi valorificată în experimentele de rezoluție cinetică enzimatică în regim continuu, care urmează să fie realizate în etapa următoare.

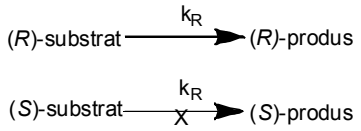
Studiile privind separarea produşilor de reacție prin procedee de tip Click au fost demarate prin sinteza unor agenți de acilare de tipul derivaților propargilici, care vor fi utilizați pentru funcționalizarea specifică a produşilor de reacție în vederea separării lor.

Rezultatele acestei etape au fost diseminate în două lucrări științifice acceptate sau în curs de evaluare la reviste cu factor de impact (ISI), 3 lucrări publicate în reviste indexate în baze de date internaționale (BDI) şi prin prezentarea a 7 lucrări la manifestări ştiințifice de prestigiu (6 la conferințe internaționale), sub formă de prezentări orale sau postere. În concluzie, se poate afirma că toate obiectivele asumate pentru Etapa 2 a proiectului au fost îndeplinite.

Descrierea ştiinţifică şi tehnică

<u>Activitatea 2.1.</u> Studiul rezoluţiei cinetice a amestecurilor racemice

Rezoluţia cinetică enzimatică are la bază vitezele de reacţie diferite a celor doi enantiomeri in prezenta enzimei ca entitate chirală, prezentă în cantităţi catalitice.

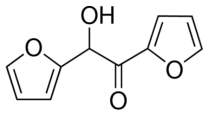


a.

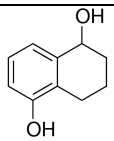
Rezoluţia cinetică enzimatică are loc atunci când cei doi componenţi ai amestecului racemic au comportament cinetic diferit în prezenţa biocatalizatorului ($k_R \neq k_S$), adică unul dintre ei reacţionează cu viteză mult mai mare, iar reacţia este oprită la o conversie între 0 şi 50%. Cazul ideal este cel în care doar unul dintre enantiomeri racemicului se consumă iar celălalt nu. Datorită structurii lor proteice, enzimele au capacitatea de a distinge între cei doi enantiomeri ai amestecului racemic. Parametrul care descrie stereoselectivitatea sau enantioselectivitatea unei reacţii stereoselective se numeşte **raport enantiomeric *E***. Valorile lui *E* sunt definite de raportul constantei de specificitate pentru cei doi enantiomeri. În rezoluţia cinetică, *E* reflectă astfel viteza relativă de reacţie a celor doi enantiomeri şi este o mărime independentă de conversie. Valorile raportului enantiomeric servesc la evaluarea selectivităţii enzimelor: o reacţie pentru care s-a obţinut un raport enantiomeric $E = 1$ este o reacţie neselectivă. Valori ale lui $E>20$ sunt valori minime pentru o rezoluţie acceptabilă.

A fost studiată rezoluţia cinetică enzimatică a unor alcooli alifatici secundari, alcooli aromatici şi alcooli heterociclici chirali, cu diferite lipaze imobilizate prin tehnici de includere in sol-gel, adsorbţie pe Celite, sau combinaţii ale acestor două metode.

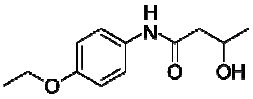
2.1.1. Studiul rezolutiei cinetice a unor alcooli secundari, evaluarea diferitelor lipaze



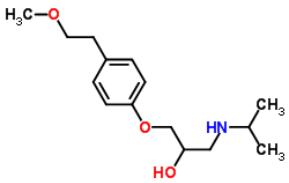
furoin (rac-I)



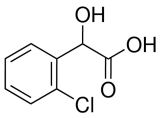
1,5-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahydronaftalen (*rac*-II)



bucetin (*rac*-III)



metoprolol (*rac*-IV)

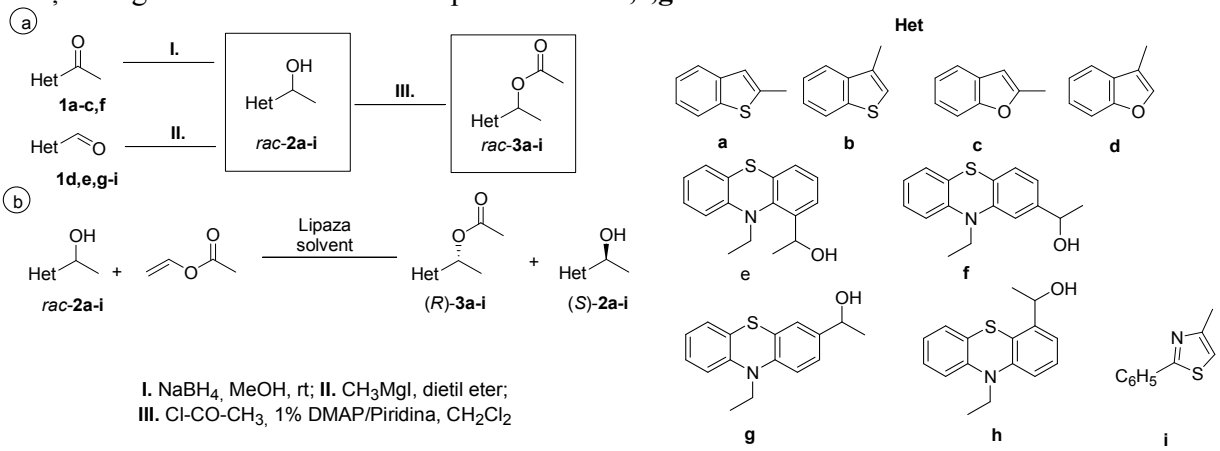


acid 2-cloro mandelic (*rac*-V)

Figura 1. Structurile chimice ale substraturilor comerciale testate

Au fost selectați o serie de alcooli secudari cu potențial rol de intermediari în sinteza unor compuşi biologic activi şi conținând în molecula lor funcțiuni aromatice sau heteroaromatice, disponibili comercial (Figura 1) sau sintetizați în laborator (Schema 1).

Sinteza **substraturilor racemice** s-a realizat folosind metode descrise in literatură (Schema 1a). Heteroaril-etanolii racemici *rac*-**2a-c,f** au fost obținuți pin reducerea chimică cu $NaBH_4$ a heteroaril-metil-cetonelor prochirale **1a-c,f** iar *rac*-**2d,e,g-i** au fost sintetizați prin reacția Grignard[1] a aldehidelor corespunzătoare **1d,e,g-i**.



Schema 1. a) Sinteza chimică a substraturilor racemice; b) Rezoluția cinetică mediată de lipaze a substraturilor racemice

2.1.2. Testarea preparatelor enzimatice imobilizate

În scopul găsirii posibilelor aplicații ale preparatelor enzimatice testate în sinteza bioorganică a unor compuşi heteroaromatici, inițial s-a realizat acilarea enzimatică a substraturilor investigate *rac*-I-V şi *rac*-**2a-i** cu acetat de vinil şi lipazele imobilizate, în absența solventului, reacțiile fiind evaluate prin intermediul conversiei, exceselor enantiomerice şi raportului enantiomeric (Tabelul 1).

Tabelul 1. Reacția de *O*-acilare a *rac*-**2a-i** cu acetat de vinil mediată de lipaze, fără solvent, la temperatura camerei

Nr. crt.	Substrat *rac*-**2a-i**	Biocatalizator optim	Timp (h)	ee_S (%)[a]	ee_P (%)[a]	*c* (%)[a]	*E*
1	*rac*-**2a**	CaLB (toate preparatele)	9.5	>99	>99	50.0	»200
2	*rac*-**2b**	CaL-B 1 ST*	132	81.7	>99	45.0	»200
		CaL-B Celită		82.9	>99	45.3	»200
3	*rac*-**2c**	AK 1 SB	110	84.3	>99	45.7	»200
4	*rac*-**2d**	CaL-B 1 ST*	110	81.8	>99	45.0	»200
		CaL-B Celită	24	96.1	>99	49.0	»200
5	*rac*-**2e**	----					
6	*rac*-**2g**	AK 1 SB	11	89.4	>99	47.2	»200
7	*rac*-**2h**	CaL-B Celită	178	51.9	>99	34.2	»200
8	*rac*-**2i**	CaL-B 2 STC	40	75.3	>99	43.2	»200

Imobilizările lipazelor s-au realizat prin trei metode: adsorbție, entrapare în matrici de sol-gel obținute din precursori silanici binari sau ternari sau prin combinarea celor două tehnici. Acetatul de vinil a fost utilizat ca donor de acil ireversibil. În urma screening-ului realizat, o serie de biocatalizatori au dovedit enantioselectivități ridicate față de substraturile racemice studiate, în special pentru substraturile sintetizate în laborator (*rac*-**2a-i)**. Preparatele de lipaze imobilizate optime pentru fiecare substrat în parte sunt prezentate în Tabelul 1.

Primul substrat testat, *rac*-1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)etan-1-ol *rac*-**2a**, a fost rezolvat cantitativ ($c \cong 50\%$) cu toate preparatele de CaL-B şi aproape toate cele de L-AK. A fost posibilă acilarea acestui substrat cu uşurința, indiferent de tehnica de imobilizare a lipazei dar este important de menționat faptul că eficiența catalitică a tuturor preparatelor imobilizate a fost mai mare decât în cazul enzimei CaL-B native (c=16.5% după 9.5 ore).

Cel mai eficient biocatalizator pentru acetilarea alcoolilor racemici *rac*-**2b,d,i** în ceea ce priveşte stereoselectivitatea s-a dovedit a fi lipaza CaL-B imobilizată prin includere în sol-gel în sistem ternar de precursori silanici cu sau fără adsorbție pe Celită (CaL-B 1 ST şu CaL-B 2 STC), în funcție de structura substratului dar şi preparatul imobilizat doar prin adsorbție a dat rezultate asemănătoare.

Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (Amano L-AK) a dovedit enantioselectivitate mare în cazul rezoluției cinetice enzimatice a *rac*-**2c,** *rac*-**2f** şi *rac*-**2g**, preparatul enzimatic optim fiind obținut prin includere în sol-gel cu sistem binar de precursori silanici (AK 1 SB). Studii anterioare[ii] au afirmat versatilitatea metodei de imobilizare în sol-gel şi posibilitatea ajustării fine a compoziției amestecului binar sau ternar de precursori în scopul obținerii unor activități şi selectivități ridicate dar aceste studii au fost conduse pe alcooli secundari model (1-fenil etanol sau 2-alcanoli). În schimb, studiul de față demonstrează pentru prima dată eficiența acestor preparate care contin lipaze imobilizate în sol-gel cu sistem binar sau ternar în rezoluția cinetică enzimatică a unor alcooli heteroaromatici secundari.

În ceea ce priveşte etanolii cu structură fenotiazinică, inițial s-a studiat rezoluția cinetică enzimatică a *rac*-**2g** utilizând preparatele imobilizate de CaL-B şi L-AK. După identificarea condițiilor optime, acestea au fost testate şi pe ceilalți alcooli fenotiazinici în scopul identificării unei metode generale de rezoluție a întregii serii. În cazul *rac*-**2f** aceste condiții de reacție au condus la rezultate foarte bune, dar pentru *rac*-**2e şi** *rac*-**2h** a fost necesară realizarea unor studii suplimentare.

Pentru *rac*-1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-1-il)ethan-1-ol, *rac*-**2e**, un alcool secundar impedimentat steric, chiar şi preparatele care conțin lipaza A din *C. antarctica* (anterior menționată ca fiind un biocatalizator adecvat pentru acest substrat) [c]s-au dovedit a fi inactive (produsul nu a fost detectat nici după 144 de ore). Rezoluția *rac*-1-(10-etil-10*H*-fenothiazin-4-il)etan-1-olului, *rac*-**2h** a decurs foarte încet în comparație cu toate celelalte substraturi dar stereoselectiv (c= 34.2% după178 h, E>200 cu CaL-B pe Celită). După cum a fost constatat în studii anterioare[b,c] în timpul reacțiilor enzimatice dar mai ales în timpul prelucrării acestora, instabilitatea structurii fenotiazinice a fost observată, în special în cazul *rac*-**2h**.

Deşi lipaza din CAL-B şi-a dovedit superioritatea în cazul substraturilor sintetizate în ceea ce priveşte substraturile comerciale pentru trei dintre acestea valorile conversiilor au depăşit 50%, iar pe baza analizelor HPLC selectivitatea a fost scăzută. Ulterior testării lipazelor din diferite surse microbiene, pentru îmbunătățirea selectivității au fost testați o serie de solvenți şi agenți de acilare. S-a studiat şi influența timpului de reacție, dar indiferent de condițiile de reacție testate selectivitatea nu a fost îmbunătățită.

Rezultate promițătoare din punct de vedere al enantioselectivității (ee>95%) s-a obținut pentru substratul 1,5-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen (Tabelul 2), când s-a utilizat lipaza din *Burkholderia cepacia* imobilizată în matrici de sol-gel obținute utilizând raport ternar echimolar de silani (feniltrimetoxisilan PhTMOS, viniltrimetoxisilan VTMOS şi tetrametoxisilan TMOS).

Tabelul 2. Reacția de *O*-acilare a *rac*-**II** cu acetat de vinil mediată de lipaze imobilizate, în tetrahidrofuran, 40 mg preparat enzimatic, 24h

Lipaza	**Raport molar PhTMOS/VTMOS/TMOS**	**Conversia [%]**	**ee_p [%]**
Burkholderia cepacia	1:1:1	63,39	96,55
	1,6:0,4:1	20,83	17,47
	0,4:1,6:1	3,82	14,73
Pseudomona fluorescens	1:1:1	10,02	1,15
	1,6:0,4:1	n.d.	n.d.
	0,4:1,6:1	13,4	5,06

n.d - nedeterminat

2.1.3. Studiul parametrilor care influențează rezoluția cinetică a alcoolilor secundari.

Întrucât natura solventului poate influența semnificativ activitatea şi selectivitatea unei rezoluții cinetice enzimatice, s-au studiat în continuare reacțiile de acilare enzimatice ale *rac*-**2a-d, f-i şi *rac*-II** cu acetat de vinil şi biocatalizatorii optimi identificați anterior, în prezența unor solvenți organici precum *n*-hexan, toluen, diizopropil eter, metil-*tert*-butil eter, diclorometan şi acetonitril. Utilizând aceiaşi parametri (conversie *c*, excese enantiomerice ee_S, ee_P şi raport enantiomeric *E*), solventul adecvat s-a dovedit a fi *n*-hexan pentru toate substraturile sintetizate (*E* » 200 la *c*≅50% după 1-28 ore, în funcție de substrat, Tabelul 3).

Tabelul 3. Acilarea *rac*-**2a** cu acetat de vinil mediată de lipaze, la temperatura camerei

Nr. crt.	**Substrat** *rac*-**2a-i**	**Biocatalizator**	**Timp (h)**	ee_S **(%)**	ee_P **(%)**	***c* (%)**	***E***
1	*rac*-**2a**	CaL-B 1 SBC	1	>99	>99	50.0	»200
		CaL-B 1 STC		>99	>99	50.0	»200
2	*rac*-**2b**	CaL-B 1 ST*	5	91.9	>99	47.9	»200
		CaL-B Celită		>99	>99	50.0	»200
3	*rac*-**2c**	AK 1 SB	21	85.9	>99	46.2	»200
4	*rac*-**2d**	CaL-B 1 ST*	19	94.1	>99	48.5	»200
		CaL-B Celită	2	91.6	>99	47.8	»200
5	*rac*-**2e**	-					
6	*rac*-**2f**	AK 1 SB	8	>99	>99	50.0	»200
7	*rac*-**2g**	AK 1 SB	9	>99	>99	50.0	»200
8	*rac*-**2h**	CaL-B Celită	27	98.5	>99	49.6	»200
9	*rac*-**2i**	CaL-B 2 STC	28	94.7	>99	48.9	»200

În timp ce selectivitățile s-au menținut ridicate în toate cazurile, prin utilizarea solvenților, *n*-hexan în mod particular, timpii de reacție au fost reduși semnificativ. În cazul *rac*-II enantioselectiviatea a fost favorizată de absența solventului organic (Tabelul 4), valoarea excesului enantiomeric fiind de 100% într-un timp mult mai scurt (4h).

Tabelul 4. Screening-ul de solvent pentru acilarea *rac*-**II** cu acetat de vinil, mediată de lipaze, la 40ºC, 40 mg preparat, 4 h

Solvent	Conversia	ee [%]
-	62.45	100.00
Acetonă	30.16	14.89
MTBE	18.71	3.37
t-Butanol	28.85	17.55
Tetrahidrofuran	28.40	25.23

Activitatea 2.2. Imobilizarea enzimelor, personalizată pentru substraturi specifice. Partea I.

2.2.1. Investigarea diferitelor tehnici de imobilizare: legare covalentă, entrapare, înrețelare

În cadrul acestei activități s-a realizat imobilizarea lipazelor din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS) şi *Candida antarctica* B (C-Lecta), prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxidice și prin înrețelare cu glutaraldehidă. Lipaza din *Candida antarctica* A a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel, folosind metoda sol prepolimer.

A. Imobilizarea prin legare covalentă pe suporturi cu grupări epoxidice

Mod de lucru:

200 mg suport cu grupări epoxidice (Sepabeads-EP) se amestecă cu 11 mg lipază solubilizată în 3 ml soluție tampon fosfat 0.1 M de pH 7.4. Amestecul obținut s-a menținut timp de 24 h la temperatura de 22°C sub agitare la 150 rpm. La sfârșitul reacției preparatul a fost spălat de 2 ori cu 5 ml tampon TRIS de pH=8.0 și în final cu 10 ml hexan. Preparatul enzimatic a fost lăsat 24 ore la temperatura camerei pentru uscare și apoi păstrat la 4°C. Cantitatatea de preparat enzimatic obținut în cazul fiecărei lipaze este prezentată în Tabelul 5.

Tabelul 5. Condiții de imobilizare ale preparatelor obținute prin imobilizarea prin legare covalentă.

Cod preparat enzimatic	Enzima	Cantitate de enzimă introdusă la imobilizare (mg)	Cantitate de preparat enzimatic obținut (mg)
AK8	Amano AK	11,2	91,7
PS8	Amano PS	11,4	100,1
CalB9	Cal-B	11,9	98,7

B. Imobilizarea prin înrețelare cu glutaraldehidă

Mod de lucru:

Peste o soluție de enzimă (200 mg lipază în 2 ml tampon fosfat 0.1 M de pH 7.4) s-a adăugat în picături 8 ml soluție saturată de $(NH_4)_2SO_4$. Amestecul s-a menținut sub agitare (500 rpm) timp de 1 h la 25°C, după care peste precipitatul fomat s-au adăugat 110 µl soluție de glutaraldehidă 50% menținându-se agitarea încă 3 h. Separarea lipazei înrețelate s-a realizat prin centrifugare. Supernatantul a fost decantat și reziduul a fost spălat de 3 ori cu 10 ml tampon TRIS de pH=8.0 și în final cu 10 ml hexan. Preparatul enzimatic a fost lăsat 24 ore la temperatura camerei pentru uscare și apoi păstrat la 4°C.

Tabelul 6. Condiții de imobilizare ale preparatelor obținute prin imobilizarea prin înrețelare cu glutaraldehidă.

Cod preparat enzimatic	Enzima	Cantitate de enzimă introdusă la imobilizare (mg)	Cantitate de preparat enzimatic (mg)
AK9	Amano AK	240,1	72,6
PS9	Amano PS	240,0	217
CalB10	Cal-B	240,3	72,3

C. *Imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel*

Mod de lucru:

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de o oră pe un agitator magnetic a 3 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare, 0,2 ml apă distilată şi 30 µl acid clorhidric 0,04M. Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml soluție de enzimă (120 mg/ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), 200 µl soluție lichid ionic şi 200 µl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic (600 rpm) pentru omogenizare. SOL-ul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml şi s-au mai introdus sub agitare 1,4 ml soluție de lipază şi 100 µl amoniac 25%. Agitarea s-a menținut până când amestecul a gelifiat. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic şi 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore şi la etuva de vid timp de 24 de ore. Cantitățile de preparat enzimatic obținute sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Condiții de imobilizare ale preparatelor obținute prin entrapare în sol-gel.

Cod preparat enzimatic	Silani precursori (raport molar)	Cantitate de preparat enzimatic (mg)
CalA1	OcTMOS:TMOS 1:1	273.2
CalA2	PhTMOS:TMOS 1:1	296.9
CalA3	VTMOS:TMOS 1:1	185.7
CalA4	PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1.6:0.4:1	270.8
CalA5	PhTMOS:VTMOS:TMOS 1.6:0.4:1	280,0

D. Reacţii de acilare enantioselectivă cu lipazele imobilizate

Determinarea activităţii şi enantioselectivităţii preparatelor enzimatice imobilizate, în comparaţie cu lipazele native, s-a realizat pentru reacţia de acilare a unor alcooli secundari (2-hexanol, 2-heptanol şi 2-octanol) cu acetat de vinil în mediu de solvent organic (n-hexan), la 40°C.

Mod de lucru:

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus alcool secundar şi acetat de vinil (raport molare de 1:3), 1 ml solvent organic şi 15 µl n-decan sau n-dodecan (standard intern). La momentul zero al reacţiei s-a introdus 25 mg preparat enzimatic obţinut. Fiola de sticlă conţinând amestecul de reacţie a fost plasată într-o incintă termostatată la 40ºC şi supusă agitării la 300 rotaţii/min. Reacţia a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la 24 de ore de reacţie cu ajutorul unei micropipete. Pe baza analizelor efectuate, prin metoda standardului intern s-au calculat conversia alcoolului C (%), masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate A_{tr} ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$) şi randamentul de regăsire a activităţii enzimatice η_{reg} (%) la 24 de ore de reacţie. Pentru calculul randamentelor de regăsire ale activităţii enzimatice după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleaşi condiţii, în care s-a utilizat 5 mg lipază nativă.
Pe baza datelor din literatură [iii], s-a presupus că lipazele utilizate sunt (*R*)-specifice în reacţia de acilare a alcoolilor secundari testaţi, deci produsul principal a fost considerat a fi (*R*)-esterul. Excesul enantiomeric al produsului ($e.e._P$) a fost calculat pe baza ariei picurilor enantiomerilor. Separarea celor 2 enantiomeri S şi R ai esterului obţinut prin reacţia de transesterificare a alcoolului secundar cu acetat de vinil s-a realizat pe o coloana cromatografică chirală Astec Chiraldex B-PM (30m x 0,25 mm), iar ca fază mobilă s-a utilizat H_2 la un debit de 2 ml/min.

Biocatalizatorii rezultaţi prin legare covalentă respectiv înrețelare au fost testaţi în reacţia de acilarea a doi, respectiv trei alcooli secundari alifatici (2-hexanol, 2-heptanol şi 2-octanol) în mediu de *n*-hexan (24h), iar rezultatele sunt prezentate în Tabelele 8-11.

Acilarea alcoolilor secundari catalizată de lipaze imobilizate prin legare covalentă pe suporturi cu grupări epoxidice

La fel ca în cazul enzimelor native, dintre preparatele imobilizate pe suporturi cu grupări epoxidice, lipaza din *Candida antarctica* B si-a dovedit superioritatea. Valoarea cea mai ridicată a raportului enantiomeric s-a obţinut în cazul 2-hexanolului. Tot în cazul lipazei CalB se observă o creştere semnificativă a randamentului de regăsire a activităţii pentru ambele substraturi testate.

Tabelul 8. Acilarea 2-hexanolului şi 2-heptanolului cu acetat de vinil şi preparate imobilizate prin legare covalentă

Substrat	**2-hexanol**					**2-heptanol**				
Cod preparat enzimatic	**Conv (%)**	**A_{tr} ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)**	**η_{reg} (%)**	**e.e. (%)**	**E**	**Conv (%)**	**A_{tr} ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)**	**η_{reg} (%)**	**e.e. (%)**	**E**
AK nativă	41	1.340	100	74	7	44	1.344	100	76	7
AK8	30	0.195	119	87	14	23	0.126	77	87	14
PS nativă	54	1.761	100	70	6	17	0.444	100	88	16
PS8	26	0.162	81	87	14	24	0.096	190	91	21
CalB nativă	31	0.762	100	96	49	15	0.587	100	96	49
CalB9	42	0.479	522	97	66	59	0.377	533	93	29

Acilarea alcoolilor secundari catalizată de lipaze imobilizate prin înrețelare

Lipazele imobilizate prin înrețelare au fost testate în aceleași condiții de reacție, iar rezultatele prezentate în Tabelul 9 indică o îmbunătățire a selectivității, raportul enantiomeric fiind cu aproximativ 52 % mai mare în cazul 2-hexanolului și 32 % în cazul 2-heptanolului când s-a utilizat lipaza din CalB înrețelată în comparație cu preparatul obținut prin legare covalentă.

Tabelul 9. Acilarea 2-hexanolului și 2-heptanolului cu acetat de vinil și preparate imobilizate prin înrețelare

	2-Hexanol					2-Heptanol				
Cod preparat enzimatic	**Conv (%)**	**A_{tr}** ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)	**η_{reg} (%)**	**e.e. (%)**	**E**	**Conv (%)**	**A_{tr}** ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)	**η_{reg} (%)**	**e.e. (%)**	**E**
AK nativă	41	1.340	100	74	7	44	1.344	100	76	7
AK9	22	0.124	3	69	6	11	0.066	1	74	7
PS nativă	54	1.761	100	70	6	17	0.444	100	88	16
PS9	42	0.258	13	66	5	34	0.078	16	77	8
CalB nativă	31	0.762	100	96	49	15	0.587	100	96	49
CalB10	18	0.121	5	98	126	19	0.080	4	98	93

Acilarea alcoolilor secundari catalizată de lipaze imobilizate prin entrapare în sol-gel

Rezultatele obținute pentru acilarea alcoolilor secundari alifatici utilizând lipaza din *Candida antarctica* A entrapată în matrici de sol-gel indică o creștere a enantioselectivității față de toate cele 3 substraturi când pentru formarea matricii au fost utilizate amestecuri ternare de silani. Dintre amestecurile de silani testate, prezența PhTMOS favorizează creșterea selectivității biocatalizatorului, iar cea mai eficientă combinație de silani precursori s-a dovedit a fi PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1.6:0.4:1.

Tabelul 10. Acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil și preparate imobilizate prin entrapare în sol-gel

	2-hexanol					2-heptanol				
Cod preparat enzimatic	**Conv (%)**	**A_{tr}** ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)	**η_{reg} (%)**	**e.e. (%)**	**E**	**Conv (%)**	**A_{tr}** ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)	**η_{reg} (%)**	**e.e. (%)**	**E**
CalA nativă	53	0.854	100	9	1	17	0.348	100	2	1
CalA1	99	0.710	189	0	1	99	0.726	475	1	1
CalA2	20	0.156	45	94	43	21	0.094	67	93	37
CalA3	26	0.156	28	99	194	16	0.052	23	97	78
CalA4	23	0.146	38	99	259	23	0.082	53	98	168
CalA5	15	0.102	28	99	179	14	0.042	28	97	92

Tabelul 11. Acilarea 2-octanolului cu acetat de vinil şi preparate imobilizate prin entrapare în sol-gel

Cod preparat enzimatic	Conv (%)	A_{tr} ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
CalA nativă	10	**0.490**	100	31	2
CalA1	99	0.865	402	1	1
CalA2	18	0.089	45	71	7
CalA3	10	0.055	18	98	110
CalA4	12	0.083	38	98	114
CalA5	6	0.042	20	98	105

E. Evaluarea posibilităților de extindere a tehnicii de entrapare în sol-gel şi la alte enzime

Pentru a demonstra eficiența metodei de imobilizare prin sol-gel s-a studiat şi imobilizarea β-galactozidazei, folosind un procedeu similar cu cel a lipazelor, cu sistem binar de precursori silanici nealchilați şi alchilați din clasa etoxisilanilor. Experimentele preliminare au demonstrat că cel mai eficient este amestecul binar de precursori silanici alcătuit din tetraetoxi silan/ metiltrietoxisilan (TEOS:MeTEOS). De aceea, s-a studiat influenţa conţinutul relativ al grupării alchil în matricea formată asupra activității preparatelor enzimatice obținute. În acest sens s-au realizat10 preparate enzimatice, prin creşterea treptată a excesului molar relativ de TEOS, în intervalul de la 1:1 la 19:1. Rezultalele activităților determinate pe substratul de p-nitrofenil-β-D-galactopiranozidă (Fig. 2) arată că activitatea enzimei imobilizate a crescut cu creşterea cantității relative de TEOS în amestecul de silani până la raportul molar optim de 7:1. Activitatea a scăzut la raporte mai mari de 7:1, deşi a rămas mai mare decât activitatea preparatului obținut numai cu TEOS folosit ca şi precursor.

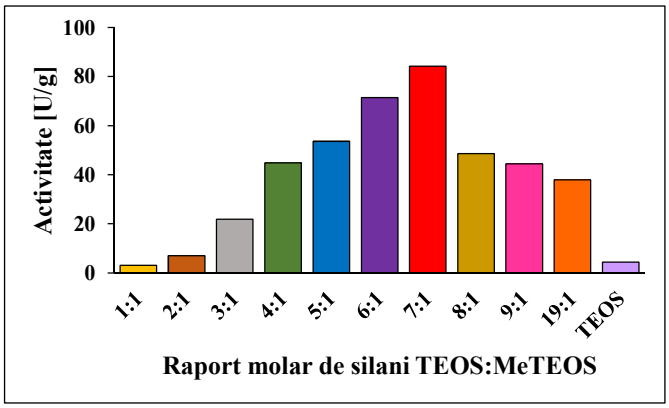


Figura 2. Determinarea raportului optim de silani precursori în cazul imobilizării β-galactozidazei prin metoda sol-gel

Aşadar, un conţinut scăzut de grupări alchil are un rol important în formarea matricei de gel, datorită alungirii lanţului alchil al precursorilor silanici obținându-se o matrice cu pori mai mari, care permite o mai bună stabilitate conformațională a enzimei şi permite accesul

substratului la centrul catalitic. Creşterea conţinutului grupărilor alchil peste o valoare mai mare decât valoarea critică poate împiedica accesul substraturilor solubile în apă la centrul catalitic al enzimei datorită caracterului hidrofob al matricei de sol-gel. Prin urmare, alegerea atentă a precursorilor şi reglajul fin al conţinutului relativ de grupări alchil, care influenţează mărimea porilor a matricei rezultate, a permis selectarea sistemului optim de precursori silanici pentru această enzimă. Cea mai mare valoare de activitate, 84 unităţi/g preparat enzimatic, reprezintă un rezultat foarte bun, care confirmă versatilitatea metodei de imobilizare prin sol-gel şi aplicabilitatea sa la enzime cu caracteristici mult diferite.

2.2.2. Caracterizarea biocatalizatorilor imobilizati

Caracterizarea biocatalizatorilor este extrem de importantă pentru a explica și corela unele dintre principalele proprietăți, cum ar fi activitatea, selectivitatea și stabilitatea. În acest sens s-a realizat caracterizarea structurală a biocatalizatorilor imobilizați prin tehnicile de imobilizare prin entrapare în sol-gel. Pentru caracterizarea biocatalizatorilor s-au utilizat diferite tehnici instrumentale moderne cum sunt: spectroscopia în infraroșu FT-IR, microscopia confocală cu scanare laser (LSCM) microscopia electronică de scanare (SEM) și microscopia de forță atomică (AFM). Analiza prin spectroscopie FT-IR a confirmat prezența grupelor funcționale alchil sau aril ale precursorilor din xerogel, dar localizarea enzimei nu a fost posibilă deoarece banda corespunzătoare grupării amidice din proteină a fost acoperită de alte benzi de vibrație din structura matricii de silice.

Imagistica prin microscopie confocală cu scanare (LSCM) oferă informații importante în ceea ce privește distribuția enzimei în interiorului preparatului sol-gel (Fig. 3). Din imaginile înregistrate s-a observant că, lipaza marcată cu FITC este distribuită în întreaga matrice sol-gel, sugerând o distribuție uniformă a enzimei în preparatele imobilizate.

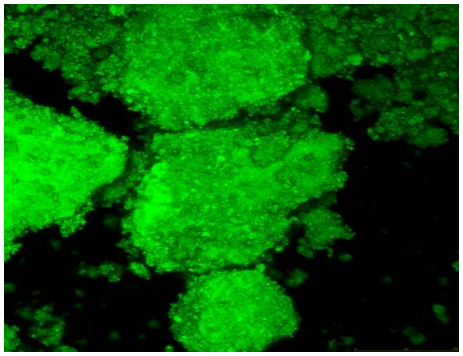
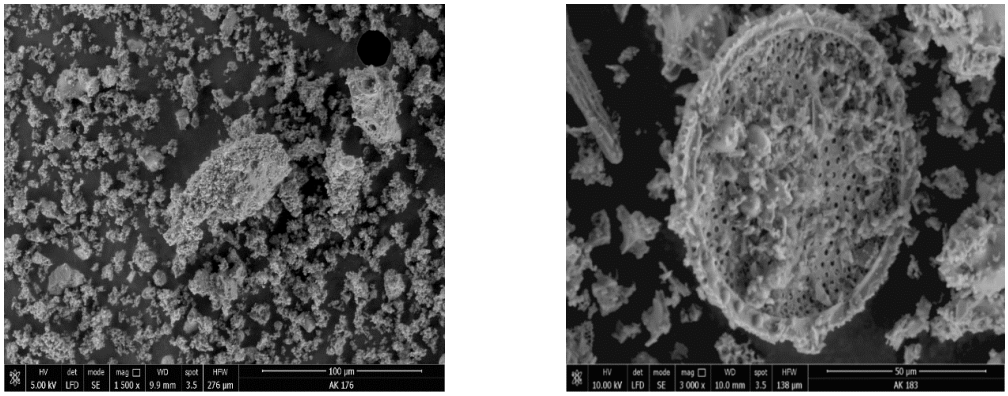


Figura 3. Imaginea fluorescentă a preparatului cu lipaza marcată cu FITC

Studiile SEM au fost realizate pentru a stabili efectul raportului silanilor precursori și al metodei de imobilizare asupra morfologiei materialului sol-gel cu lipază entrapată. Imaginile SEM (Fig. 4) obținute pentru preparatul cu concentrație ridicată a grupărilor fenil (raport molar 1,6:0,4:1 al silanilor precursori) arată o structură poroasă tipică, specifică nanomaterialelor de tip silice. Este observată o structură cu micro-canale pe întreaga suprafață scanată, cu pori ordonați, care este corelată cu cele mai bune valori ale activității de transesterificare. Morfologia biocatalizatorilor obținuți prin metoda combinată a fost complet diferită. Poate fi observat cu ușurință faptul că particulele de xerogel sunt formate atât pe suprafața suportului solid cât și în

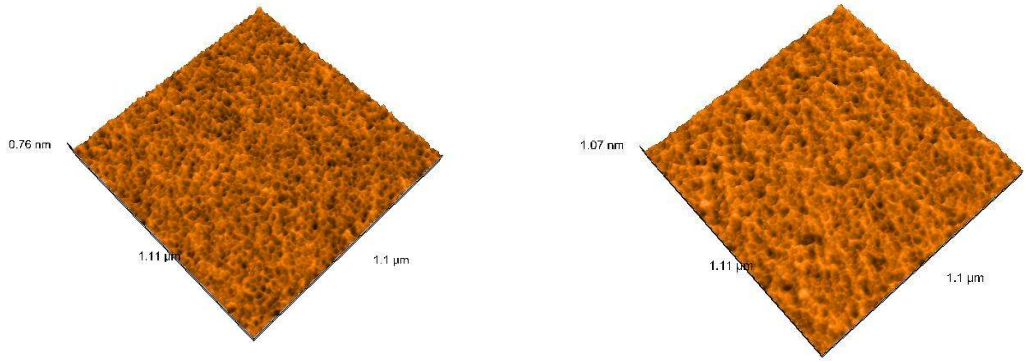
interiorul porilor. Dezvoltarea matricii sol-gel în interiorul porilor suportului poate fi o explicație a ușoarei scăderi a eficienței catalitice.



(a) (b)

Figura 4. Imaginile SEM ale lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin: a) entrapare în sol-gel și b) entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545. Silanii precursori au fost PhTMOS:VTMOS:TMOS în raport molar de 1.6:0.4:1.

Imaginile de microscopie de forță atomică AFM au fost înregistrate pentru a completa analiza SEM și pentru a investiga topografia suprafețelor, deoarece SEM nu oferă informații referitoare la conformația interiorului structurii poroase. AFM oferă imagini tridimensionale ale suprafeței probei și este utilă pentru a caracteriza, la scală nanometrică, atât neomogenitatea și rugozitatea suprafeței, cât și morfologia structurii poroase. Așa cum s-a observant din imaginile AFM (Fig. 5), materialele studiate au prezentat nanounități bine-definite, cu dimensiuni uniforme. Dimensiunea mezoporilor a variat între 2-4 nm pentru toate preparatele testate, în concordanță cu rezultatele obținute la izotermele de adsorbție. În probele testate, nanoparticulele au fost distribuite regulat, astfel că imaginile AFM reiterează rezultatele referitoare la morfologia structurilor obținute prin microscopie SEM și de fluorescență.



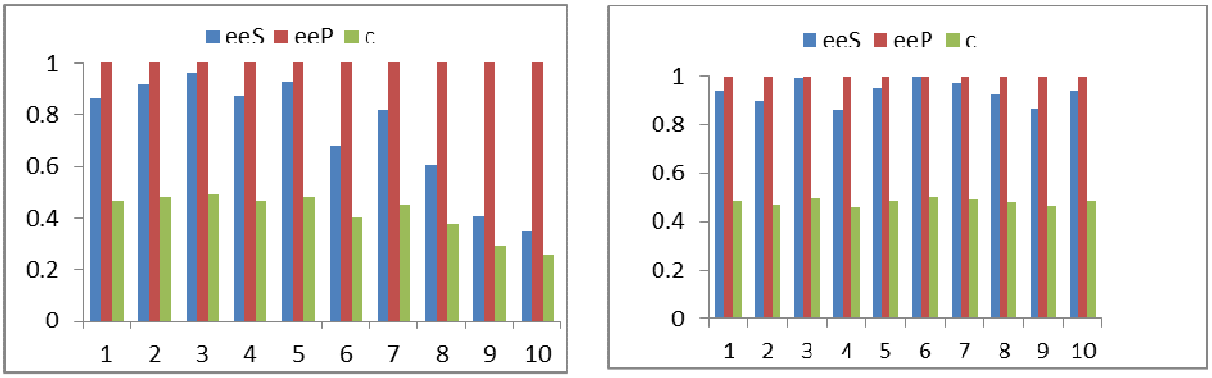
(a) (b)

Figura 5. Imaginile AFM ale lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin: a) entrapare în sol-gel și b) entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545. Silanii precursori au fost PhTMOS:VTMOS:TMOS în raport molar de 1.6:0.4:1.

<u>Activitatea 2.3.</u> Determinarea stabilității operationale a enzimelor imobilizate în condiții de reutilizare multiplă - partea I

2.3.1. Studii preliminare de stabilitate operațională a unor lipaze imobilizate la reutilizare pe substraturi chirale

Eficiența catalitică pe termen lung este o cerință cheie a unui biocatalizator industrial. Lipaza CaL-B imobilizată prin entrapare în sol-gel a manifestat eficiență foarte bună în reutilizare în reacția de acilare a 2-octanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan, demonstrând potențialul semnificativ al acestei tehnici de a furniza catalizatori extrem de eficienți pentru utilizare îndelungată[iib] Totuşi, capacitatea de reutilizare a unui biocatalizator trebuie testată pentru fiecare aplicație individuală întrucât depinde de structura substratului, compoziția şi caracteristicile mediului de reacție şi de parametrii operaționali. Din aceste motive, posibilitatea de reutilizare a preparatelor enzimatice optime a fost investigată în reacțiile de acilare a *rac*-**2a,c,d,g,i** cu acetat de vinil utilizând *n*-hexan ca mediu de reacție (Fig. 6-10). Fiecare reacție a fost repetată cu acelaşi preparat enzimatic de până la 10 ori, fiind lăsate să atingă conversia c~50% sau atâta timp cât preparatul a manifestat activitate şi selectivitate înainte ca biocatalizatorul să fie supus unui alt ciclu de reacție. Între două cicluri, catalizatorul a fost doar spălat cu *n*-hexan anhidru de trei ori şi apoi reutilizat.



A **B**

Figura 6. Capacitatea de reutilizare a biocatalizatorilor selectați în EKR a *rac*-1-(benzo[*b*]tiophen-2-yl)etan-1-olului *rac*-**2a** după 1 oră cu: A) CaL-B 1 (sistem binar + adsorbție pe Celită) şi B) Cal-B pe Celită

După cum se poate observa în Fig. 6A-B, lipazele imobilizate au fost catalizatori eficienți pentru EKR a derivatului benzotiofenic *rac*-**2a** în 10 cicluri consecutive. Lipaza CaL-B adsorbită pe Celită a fost chiar mai eficientă decât preparatul sol-gel cu sistem binar conținând grupări vinil pendante dar mărind timpul de reacție a fost posibil ca acest biocatalizator să realizeze conversia aproape completă a substratului cu enantiopuritate mare şi de aceea reprezintă un candidat puternic pentru operare în bioreactoare în sistem continuu, subiectul viitoarelor studii.

Biocatalizatorul cel mai activ în EKR a *rac*-**2c** a fost obținut de asemenea prin imobilizarea lipazei AK în sol-gel în sistem binar dar conținând grupări octil în locul grupărilor vinil pentru a oferi funcționalitatea organică. În mod evident, afinitatea lipazei imobilizate pentru substratul benzofuranic a fost mai mică în comparație cu derivatul benzotiofenic cu structură similară şi rezultatele recirculării arată o scădere semnificativă a conversiei după doar 3 cicluri de reacție.Totuşi enantiopuritatea produsului s-a menținut ridicată (Fig. 7).

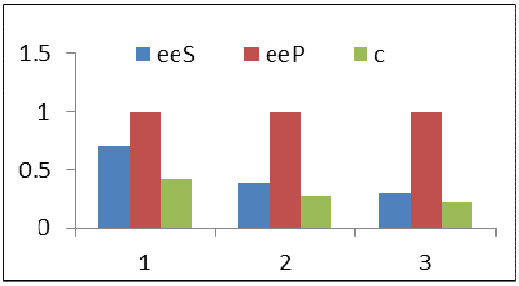


Figura 7. Capacitatea de reutilizare a biocatalizatorului selectat AK 1 SB în EKR a *rac*-1-(benzofuran-2-il)etan-1-olului *rac*-**2c,** după 20 de ore

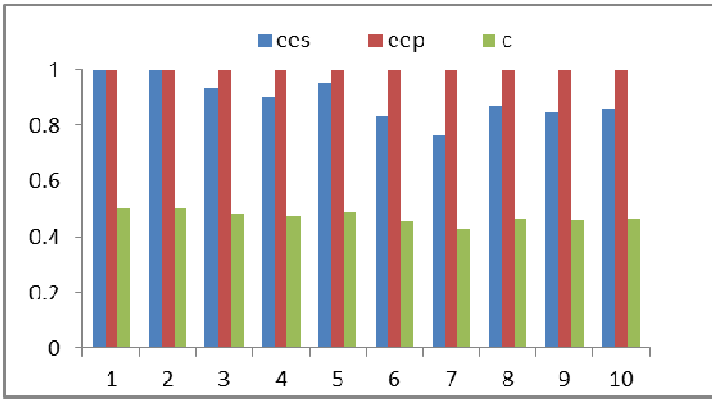


Figura 8. Capacitatea de reutilizare a biocatalizatorului selectat CaL-B 1 ST* în EKR a *rac*-1-(benzofuran-3-il)etan-1-olului *rac*-**2d,** după 21 de ore

Deşi este un izomer de poziție al *rac*-**2c**, *rac*-**2d** este un substrat mult mai adecvat pentru lipaza imobilizată prin includere în sol-gel, CaL-B în acest caz (Fig. 8). Matricea ternară sol-gel a fost obținută din tetrametoxisilan ca precursor al structurii anorganice cu fenil-trimetoxisilan şi metil-trimetoxisilan (în raport molar relativ 4:1) care furnizează grupările funcționale organice pendante materialului hibrid. Prezența unei concentrații relativ mari de grupări fenil a fost benefică pentru eficiența catalitică pe tremen lung a acestui biocatalizator care nu a manifestat o scădere notabilă a conversiei pe parcursul celor 10 cicluri de reacție.

Studiul de reutilizare a confirmat de asemenea că din seria derivaților fenotiazinici *rac*-**2g** este substratul cel mai adecvat pentru EKR în prezența lipazelor imobilizate (Fig. 9). Biocatalizatorul optim care a dovedit selectivitate foarte bună este lipaza AK imobilizată în sol-gel cu sistem binar având conținut ridicat de grupări vinil. Totuşi, utilizarea acestui biocatalizator în cicluri multiple nu a fost atât de eficientă precum în cazul *rac*-**2a,d** deoarece conversia a început să scadă după 5 cicluri de acilare.

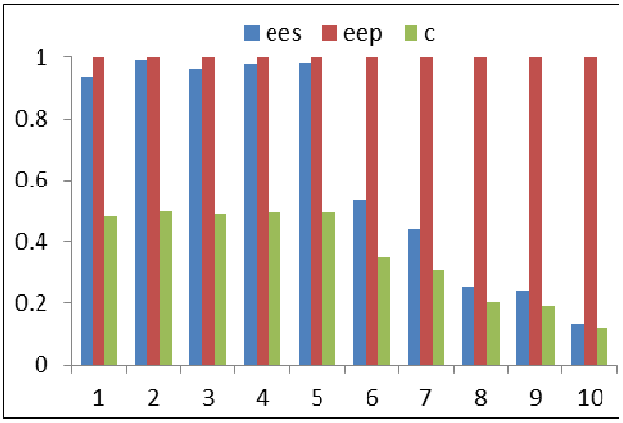


Figura 9. Capacitatea de reutilizare a biocatalizatorului selectat AK 1 SB în EKR a *rac*-1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-3-il)etan-1-olului *rac*-**2g** după 8 ore

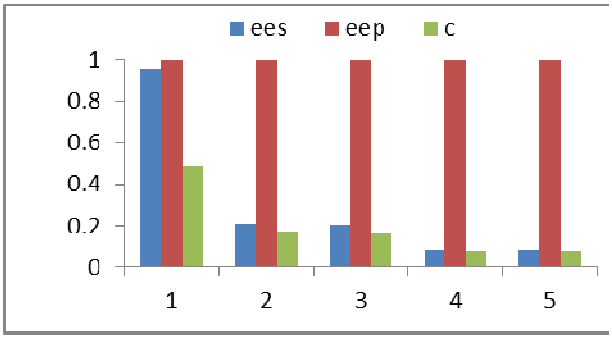


Figura 10. Capacitatea de reutilizare a biocatalizatorului selectat CaL-B 2 STC în EKR a *rac*-1-(2-fenil-tiazol-4-il)-etanolului *rac*-**2i** după 28 de ore

Stabilitatea operațională a biocatalizatorului obținut prin metoda de imobilizare care implică formarea unui sol-prepolimer în cataliză acidă a fost investigat în EKR a derivatului *rac*-**2i**. După cum se poate observa în Fig. 10, acest preparat de CaL-B imobilizată nu a fost adecvat pentru utilizări repetate, totuşi în studiul de identificare a parametrilor optimi de reacție acesta a manifestat activitate şi enantioselectivitate comparabile cu cele ale preparatelor cu performanțe catalitice maxime obținute prin metoda care utilizează NaF ca şi catalizator pentru hidroliză şi policondensare simultane. Cel mai mare dezavantaj constă în scăderea drastică a activității redată prin valorile mici ale conversiei. Probabil că stabilitatea acestui tip de matrice sol-gel nu este atât de bună în condițiile de reacție utilizate.

În cazul derivatului *rac*-II studiul de reutilizare a lipazei din *Burkholderia cepacia* imobilizate în matrici de sol-gel (amestec ternar de silani precursori) s-a realizat în comparație cu enzima nativă. Rezultatele prezentate în Fig. 10 indică o pierdere de sub 10% a activității după 5 cicluri de reacție a preparatului imobilizat în timp ce în cazul enzimei native se observă scăderi mai mari de 25%.

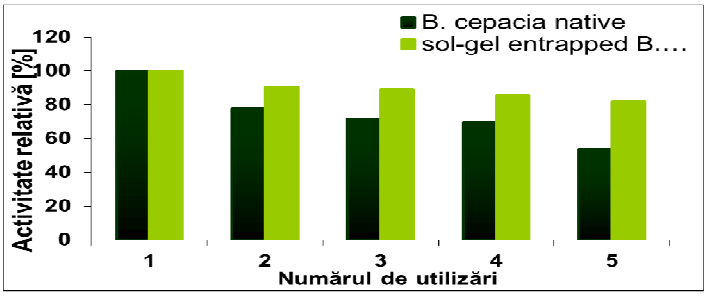
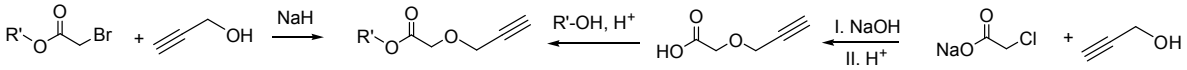


Figura 10. Capacitatea de reutilizare a biocatalizatorului selectat *Burkholderia cepacia* entrapată în matrici de sol-gel (PS 43) în EKR a *rac*-II

<u>Activitatea 2.4.</u> Studiul prelucrării produşilor prin reacții de tip click - Partea I

2.4.1. Sinteza unor derivați propargilici pentru funcționalizarea produşilor de rezoluție cinetică enzmatică

Pentru elaborarea metodei de separare a amestecurilor de reacție prin metodologie tip CLICK in aceasta etapa s-a realizat sinteza unor agenți de acilare propargilici necesari pentru a realiza funcționalizarea adecvată a produşilor rezoluției cinetice enzimatice, esențială pentru separarea acestora. Sinteza acestor agenți de acilare decurge după schema de reacții de mai jos:



Schema 2. Calea de sinteză a esterilor propargilici

Acidul prop-2-iniloxi-acetic este util atât pentru sinteza unor esteri ai acestuia care vor fi testați în etapa EKR cât şi pentru sinteza produşilor O-acilați racemici necesari pentru stabilirea metodelor de separare cromatografică chirală.

Detalii experimentale

Cromatografia în strat subțire (TLC) s-a realizat folosind plăcuțe cromatografice Merck Kieselgel $60F_{254}$, vizualizarea spoturilor realizându-se prin colorare cu soluție etanolică de acid fosfomolibdenic 5% urmată de încălzire. Separările cromatografice la scară preparativă şi purificările produşilor s-au realizat folosind coloane cromatografice de silicagel tip Merck Kieselgel 60 (63-200 μm).

Cromatografia chirală de lichide de înaltă performanță (HPLC, instrument Agilent 1200 Series) şi cea de gaze (GC, instrument Agilent 77890A)au fost utilizate pentru analiza cantitativă a rezoluțiilor cinetice enzimatice prin luarea de probe (50 μL) periodic şi analiza lor prin GC (compuşii *rac*-**2,3a-d**) sau HPLC (compuşii *rac*-**2,3e-i**). Tipul coloanelor chirale folosite pentru separarea enantiomerilor, condițiile de separare şi timpii de retenție pentru fiecare enantiomer în parte sunt prezentate în Tabelul 3. Valoarea raportului enantiomeric s-a determinat cu ajutorul relației de calcul: $E = \ln [(1-c)(1-ee_S)]/\ln[(1-c)(1+ee_S)]$, conversia calculându-se cu relația $c=ee_S/(ee_S+ee_P)$.[iv]

Lipazele A şi B din *Candida antarctica* sub formă de pudre liofilizate au fost achiziționate de la Novozym, Danermarca iar lipaza din *Pseudomonas fluorescens* AK sub formă de pudră a fost obținută de la Amano Pharmaceuticals Co., Ltd., Nagoya, Japonia şi au fost utilizate ca atare în imobilizările efectuate.

Acetatul de vinil şi solvenții de grade ridicate de puritate au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich sau Merck şi păstrați pe sită moleculară (4Å).Alți reactivi au fost cumpărați de la Sigma-Aldrich sau Merck.

În scopul investigării activității şi selectivității preparatelor enzimatice în EKR a heteroaril-etanolilor studiați *rac*-**2a–i**, inițial s-a stabilit metoda de separare cromatografică a enantiomerilor substraturilor şi produşilor racemici, utilizând condiții de separare adecvate şi coloane chirale pentru GC sau HPLC (Tabelul 12).

Tabelul 12. Timpii de retenție ai enantiomerilor *rac*-**2,3a–i** şi condițiile de separare cromatografică

Nr. crt.	Compus	t_R (min)	Metoda de separare cromatografică
1	*rac*-**2a**	36.5/37.3	GC: coloană Astec Chiraldex B-DM
	rac-**3a**	30.0/30.9	140 °C (32 min) - 150 °C (5 °C/min)
2	*rac*-**2b**	37.3/38.6	GC: coloană Astec Chiraldex B-DM
	rac-**3b**	24.6/25.4	140 °C (26 min) - 150 °C (5 °C/min)
3	*rac*-**2c**	21.8/22.2	GC: coloană Astec Chiraldex B-DM
	rac-**3c**	20.1/21.1	130 °C (10 min) - 150 °C (5 °C/min)
4	*rac*-**2d**	23.9/25.0	GC: coloană Astec Chiraldex B-DM, 130 °C
	rac-**3d**	16.2/17.5	
5	*rac*-**2e**	17.8/19.5	HPLC: coloană LiChroCart (*R*,*R*)-Whelk-O1
	rac-**3e**	4.3/5.3	*n*-hexan:2-propanol 99:1, 1 mL/min
6	*rac*-**2f**	17.7/19.9	HPLC: coloană Chiralpak AS-H
	rac-**3f**	8.5/9.4	*n*-hexan:2-propanol 95:5 (10 min) - 90:10, 1 mL/min
7	*rac*-**2g**	16.1/22.4	HPLC: coloană Chiralpak AS-H
	rac-**3g**	7.2/8.7	*n*-hexan:2-propanol 90:10, 1 mL/min
8	*rac*-**2h**	42.5/44.2	HPLC: coloană Chiralpak IC
	rac-**3h**	19.6/28.2	*n*-hexan:2-propanol 99:1 (32 min) - 90:10, 1 mL/min
9	*rac*-**2i**	20.7/22.7	HPLC: coloană Chiralpak IB
	rac-**3i**	7.9/10.1	*n*-hexan:2-propanol 99:1 (11 min) - 90:10, 1 mL/min

Sinteza heteroaril-etanolilor racemici rac-2a-c,f

La o soluție de heteroaril-metil-cetonă **1a-c,f** (1.5 mmol) în metanol uscat (5 mL), se adaugă $NaBH_4$ (1.8 mmol, 68 mg) în porții mici şi amestecul rezultat se lasă la agitat la temperatura camerei. După încheierea reacției (verificat prin TLC), solventul se evaporă la vid. Peste solidul rezultat se adaugă apă distilată (4 mL) şi apoi se ajustează pH-ul la valoarea 2 utilizând o soluție de HCl 10%. În continuare se realizează extracții cu CH_2Cl_2 (3 × 4 mL). Fazele organice colectate sunt anhidrificate cu Na_2SO_4 anhidru iar după filtrare solventul se îndepărtează prin

evaporare la vid. Produşii au fost la final purificaţi prin cromatografie de coloană pe silicagel utilizând CH_2Cl_2 ca eluent obţinându-se sub forma unor semi-solide galbene (*rac*-**2b,c,f**) şi solid alb (*rac*-**2a**). Randamente: 86-92%.

Sinteza heteroaril-etanolilor racemici rac-2d,e,g-i

Una din aldehidele **1d,e,g-i** (2 mmol) dizolvată în dietil eter (3 mL) se adaugă la o soluţie răcită pe gheaţă a reactivului Grignard obţinut prin tratarea CH_3I (2.4 mmnol, 150 µL) cu Mg (2.4 mmol, 58 mg) şi I_2 pentru activare în dietil eter uscat la temperatură în atmosferă de argon până la consumarea magneziului. Mersul reacţiei se monitorizează cu ajutorul cromatografiei în strat subţire folosind drept eluent un amestec de CH_2Cl_2:CH_3OH (90:10, v/v). Reacţia se lasă la agitat la temperatura camerei peste noapte iar după încheiere se adaugă în picături un amestec format din soluţie saturată de NH_4Cl (6 mL) şi etanol (1.5 mL) sub agitare puternică pe baie de gheaţă. Reacţia se mai lasă aproximativ 3 ore la agitare, la temperatura camerei, după care se realizează extracţii cu Et_2O (2 × 6 mL). Fazele organice colectate se anhidrifică cu Na_2SO_4 anhidru, apoi se filtrează iar solventul este îndepărtat cu ajutorul rotaevaporatorului. Produşii se purifică prin cromatografie pe coloană cu silicagel folosind ca eluent CH_2Cl_2. Astfel, s-au obţinut alcoolii racemici *rac*-**2d,e,g-i** cu aspect de uleiuri galbene (*rac*-**2d,i**) sau semi-solide galbene (*rac*-**2e,g,h**).Randamente: 46-65%.

Sinteza acetatilor de heteroariletil racemici rac-3a-i

O cantitate catalitică de DMAP (1% în piridină) şi clorură de acetil (1.2 mmol, 85 µL) se adaugă la soluţia *rac*-**2a-i** (0.3 mmol) în CH_2Cl_2 uscat(2 mL). Amestecul este agitat la temperatura camerei peste noapteDupă încheierea reacţiei (verificat prin TLC), se realizează extracţii întâi cu soluţie de 10% HCl solution (2 × 2 mL), apoi cu soluţie de 2M Na_2CO_3 (4 mL) iar la final cuapă distilată (4 mL). Fazele organicecolectatesunt anhidrifcate cu Na_2SO_4 anhidru iar după îndepărtarea acestuia prin filtrare solventul este evaporat cu ajutorul rotaevaporatorului. Produşii finali sunt purificaţi prin cromatografie pe silicagel, folosind ca amestec de eluţie CH_2Cl_2 obţinând astfel *rac*-**3a-i** sub forma unor compuşi semi-solizi de culoare galbenă. Randamente: 55-80%.

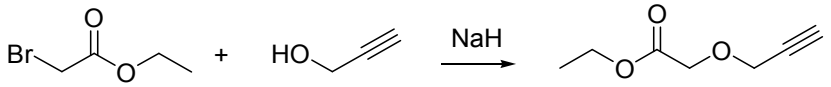
Transterificarea enzimatică

Lipaza imobilizată (5 mg din preparatul 17.4 mg enzimă/g biocatalizator şi 8 mg din preparatul 10.7 mg enzimă/g biocatalizator), substratul testat (10 µmol), solventul (1 mL) şi acetatul de vinil (30 µmol, 2.77 µL) au fost puse într-o sticluţă de reacţie şi amestecul a fost agitat la temperatura camerei până la atingerea conversiei de 50%. Pentru reacţiile conduse în lipsa solventului, acetatul de vinil a fost adăugat în exces (250 µL) şi utilizat ca agent de acilare şi ca mediu de reacţie.Periodic s-au luat probe din reacţie (50 µL), s-au diluat cu 950 µL *n*-hexan/2-propanol pentru analiza HPLC sau 950 µL CH_2Cl_2 pentru analiza GC, au fost filtrate şi apoi analizate.

Activitatea 2.5. Dezvoltarea unei procedeu de tip click pentru prelucrarea produşilor cu puritate enantiomerică ridicată - Partea I

Procedeul click presupune o reacţie între polimerul preactivat (care va fi obţinut în etapa următoare) şi un produs de reacţie funcţionalizat corespunzător obţinut în urma rezoluţiei cinetice enzimatice, după separare enzimei din sistem. În prima parte a cercetărilor au fost studiate reacţiile de funcţionalizare.

2.5.1. Sinteza esterului etilic al acidului prop-2-iniloxi-acetic



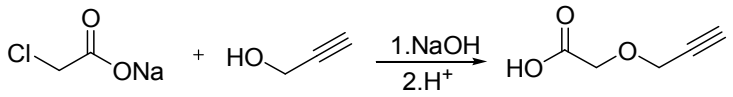
Schema 3. Calea de sinteză a Sinteza esterului etilic al acidului prop-2-iniloxi-acetic

La soluţia alcoolului propargilic (1.2 mL, 20 mmol) în tetrahidrofuran anhidru (15 mL) sub atmosferă de argon, la temperatura camerei se adaugă NaH (60% în ulei mineral, 0.88 g, 1.1 echiv., 22 mmol) şi se lasă la agitat timp de 1 oră. Se adaugă apoi bromoacetat de etil (2.75 mL, 1.2 echiv., 24 mmol) şi amestecul de reacţie este lăsat la agitat sub argon timp de 12 ore. Solventul se evaporă la vid iar uleiul

galben rezultat se dizolva în eter etilic (10 mL) şi se extrage cu apă distilată (3 × 10 mL). Faza organică se anhidrifica cu Na_2SO_4 anhidru, se filtreaza şi se concentreaza la vid. Produsul se purifică prin cromatografie cu silicagel utilizând ca eluent inițial eter de petrol iar apoi un amestec de eter de petrol/eter etilic 96:4 rezultând un ulei incolor. Randament: 34%.

Pentru confirmarea structurii produsului s-au înregistrat spectrele RMN, mai jos fiind prezentate deplasările chimice din cel de protoni, pe care il considerăm relevant.
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.30 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.25 – 4.17 (m, 4H), 2.47 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm.

2.5.2. Sinteza acidului prop-2-iniloxi-acetic

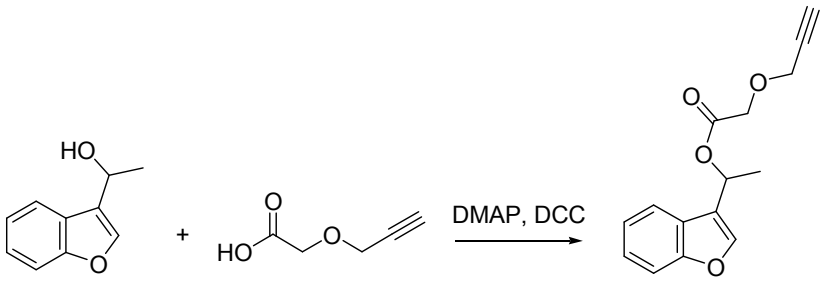


Schema 4. Calea de sinteză a acidului prop-2-iniloxi-acetic

Se adaugă alcool propargilic (1 mL, 1.2 echiv, 17 mmol) în MTBE (5 mL) şi se lasă la agitat la temperatura camerei. Acestui amestec i se adaugă apoi soluția formată din NaOH (0.68 g, 1.2 echiv., 17 mmol) şi apă distilată (5 mL). Se adaugă sarea de sodiu a acidului cloracetic (1.64 g, 14.16 mmol) şi eter de coroană 18-crown-6 ca şi catalizator de transfer interfazic şi amestecul este lăsat la agitare la temperatura camerei timp de 2 zile. După încheierea reacției, cele două faze se separă, faza apoasă este extrasă de două ori cu eter etilic (2 × 5 mL) şi se ajustează pH-ul acesteia la valoarea 2 cu H_2SO_4 concentrat. Se realizează apoi extracții cu acetat de etil (3 × 5 mL). Fazele organice colectate se anhidrifică cu Na_2SO_4 anhidru, se filtrează şi se concentrează la vid. Acidul cloracetic netransformat se îndepărtează prin distilare la vid. Prdusul final are aspectul unui ulei galben. Randament: 30%.

^{1}H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ 4.31 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.26 (s, 2H), 2.51 (t, J = 2.4 Hz, 1H) ppm; ^{13}C RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ 175.39, 78.15, 76.16, 65.73, 58.48 ppm.

2.5.3. Reacția de acilare chimică a rac-1-benzofuran-3-il-etanolului



Schema 5. Calea de sinteză a rac-1-benzofuran-3-il-etanolului

Într-un balon uscat cu fund rotund se adaugă acid prop-2-iniloxi-acetic (114 mg, 0.5 mmol) şi *rac*-1-benzofuran-3-il-etanol (243 mg, 3 echiv., 1.5 mmol) în CH_2Cl_2 uscat. Amestecul se răceşte la 0 °C iar apoi DMAP (49 mg, 0.8 echiv., 0.4 mmol) şi DCC (113 mg, 1.1 echiv., 0.55 mmol) se adaugă şi se lasă la agitat încă 10 minute la 0 °C iar apoi 4 ore la temperatura camerei. După încheierea reacției (verificat prin TLC utilizând CH_2Cl_2 ca eluent) se filtrează DCU precipitat în timpul reacției şi solventul se evaporă la vid. Produsul brut se dizolvă în CH_2Cl_2 (5 mL) şi se extrage cu o soluție de HCl 10% (3 × 5 mL). Faza organică se spală apoi cu o soluție de Na_2CO_3 2M (10 mL) şi cu apă distilată (10 mL), se anhidrifică cu Na_2SO_4 anhidru, se filtrează şi se concentrează la vid. Purificarea produsului se realizează prin cromatografie cu silicagel utilizând CH_2Cl_2 ca şi fază mobilă. Randament: 41%.

<u>Activitatea 2.6</u>. Diseminarea rezultatelor prin publicare în reviste cotate ISI şi prezentări la conferinţe internaţionale

În conformitate cu planul de activităţi al proiectului, s-a realizat diseminarea prin publicarea respectiv trimiterea la publicare a două lucrări în reviste cu factor de impact, publicarea a trei articole în reviste indexate în baze de date internaţionale şi prin participare cu lucrări la conferinţe internaţionale de prestigiu din domeniul biocatalizei şi nanomaterialelor.

2.6.1. Articole în reviste de specialitate indexate în baza de date Web of Science (ISI)

1. Cristina Paul, P. Borza, Anca Marcu, Gerlinde Rusu, Mihaela Bîrdeanu, Simona Marc Zarcula, Francisc Péter, Influence of the physico-chemical characteristics of the hybrid matrix on the catalytic properties of sol-gel entrapped *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Nanomaterials and Nanotechnology*, 2015, F.I. 0.857, *în evaluare*.

2. Emese Biro, Daniel Budugan, Anamaria Todea, Francisc Peter, Szilvia Klebert, Tivadar Feczko, Recyclable solid-phase biocatalyst with improved stability by sol-gel entrapment of β-D-galactosidase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, *acceptată la publicare*, F.I. 2.128, DOI: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.molcatb.2015.11.006

2.6.2. Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaţionale (BDI)

1. Cristina Paul, Paula Borza, Francisc Péter, High thermal stability of sol-gel entrapped lipases, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2015, 21(2), 173-180; ISSN: 2069-0053 (print), ISSN (online) 2068-9551.

2. Paula Borza, Francisc Péter, Iosif Hulka, Cristina Paul, Long-term exposure stability of sol-gel immobilized lipases in organic solvents, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, 2015, 60(74), 25-30, ISSN (online) 2069-6310.

3. Adinela Cimporescu, Anamaria Todea, V. Badea, Cristina Paul, Francisc Peter, Enzymatic acylation of 1-(isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol by sol-gel entrapped lipases, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, 2015, 60(74), 2, 7-12, ISSN (online) 2069-6310.

2.6.3. Studii prezentate la conferinţe internaţionale

1. Cristina Paul, Paula Borza, Francisc Péter, Thermal stability of immobilized biocatalysts by sol-gel techniques, *11th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries RRB-11*, York, Anglia, 3-5 Iunie 2015, Abstract book, pp. 71-72, http://www.rrbconference.com/rrb-11-program.

2. Francisc Péter, Cristina Paul, E. Biro, Paula Borza, Anamaria Todea, Enhancing activity and selectivity of biocatalysts by tailored sol-gel entrapment, *XVIII International Sol-gel Conference*, Kyoto, September 6-11, 2015, http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/solgel2015/program/

3. Valentin Badea, Adinela Cimporescu, Anamaria Todea, Cristina Paul, Francisc Peter, Stereochemical purity determination by NMR analysis of bioactive precursors from enzymatic kinetic resolution, *European Congress on Magnetic Resonance Euromar 2015*, 5-10 Iulie 2015, Praga, Cehia, Abstract book pp. 436-437, http://www.euromar2015.org/programme-abstract-book.htm, ISBN 978-80-210-7890-1.

4. Paula Borza, Cristina Paul, Francisc Péter, Enhanced stability of new sol-gel entrapped biocatalysts in organic solvents, *3rd European Congress of Applied Biotechnology - ECAB3*, Nice 27 Septembrie - 1 Octombrie 2015, Abstract book, pp. 923, ISBN: 978-2-910239-82-4, http://www.ecce2015.eu/program/synopsis-program.

5. Adinela Cimporescu, Anamaria Todea, Cristina Paul, Francisc Péter, Lipase - mediated enantioselective kinetic resolution of 1,5 – dihydroxi – 1,2,3,4 tetrahydro – naphthalene, *3rd European Congress of Applied Biotechnology - ECAB3*, Nice 27 Septembrie - 1 Octombrie 2015, Abstract book, pp. 930, http://www.ecce2015.eu/program/synopsis-program, ISBN: 978-2-910239-82-4.

6. Mădălina Elena Moisă, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Francisc Péter, Monica Ioana Toşa, Novel immobilized lipases preparations for the heteroaromatic ethanols resolution by EKR, *3rd European Congress of Applied Biotechnology - ECAB 3*, 27 Sept.-1 Oct. 2015, Nice, France, Abstract book pp. 932, http://www.ecce2015.eu/program/synopsis-program, ISBN: 978-2-910239-82-4.

7. Mădălina Elena Moisă, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Francisc Péter, Monica Ioana Toşa: Activity and stereoselectivity studies of some novel immobilized lipases preparations on heteroaromatic ethanols and β-hydroxy esters, *15th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,* 13-18 July 2015, Tg. Mures, România.

Referințe bibliografice

[i]Mulvey, R. E., Mongin, F., Uchiyama, M., Kondo, Y.*Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**, *46*, 3802–3824.
[ii] Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Zs., Corici L., Péter F., Koczka B., Poppe L. *Process Biochem*., **2011**, *46(1)*, 52-58;
[iii] Hasan F., Shah A.A., Hameed A., *Enzyme Microb Tech*, **2006**, *39 (2)*, 235-251.
[iv]Chen C. S., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C. J. *J Am. Chem. Soc.***1982**, *104*, 7294-7299.

Director proiect,
Prof.dr.ing. Francisc Peter