



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI



CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Noi proceduri biocatalitice pentru sinteza enantioselectivă a 3-aryl-3-hidroxi-propanoatilor

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand: Brem Jürgen

Conducător științific: Prof. Dr. Florin-Dan Irimie

Juriu

Presedinte: Conf. Dr. Cornelia Majdik

Referent: Prof. Dr. Ion Grosu

Referent: Prof. Dr. Vasile Pârvulescu

Referent: Prof. Dr. László Poppe

Cluj – Napoca

2011

Cuprins

1. Introducere	1
2. Utilizarea β -hidroxiacizilor heterociclici ca sintoni in obtinerea unor produse farmaceutice si a altor chimicale fine	2
2.1. β -Hidroxiacizii si esterii acestora ca si sintoni chirali si materii prime	3
3. Studiu de literatura. Abordari biocatalitice de obtinere a β -hidroxiacizilor si esterilor acestora	4
4. Scopul lucrarii	5
5. Rezultate si discutii	6
5.1. Prezentarea generala a metodologiei de lucru	6
5.2. Sinteze enzimaticice	7
5.2.1. CaL-A si CaL-B prezinta enantiomerpreferinta opusa in cazul rezolutilor cinetice ale tiofen si furan- β -hidroxi esterilor	7
5.2.2. Sinteza acizilor (<i>R</i>)- si (<i>S</i>)-benzofuranil si benzo[<i>b</i>]tiofenil-3-hidroxi-propanoatilor cu ajutorul lipazelor	11
5.2.3. Rezolutia cinetica cu enzime a <i>N</i> -alchilatilor racemici ai fenotiazin-3-il- β -hidroxi esterilor	15
5.2.4. Biotransformare cu L-AK immobilizata	19
5.2.5. O noua procedura generala folosind substraturi si reagenti mimati din natura pentru rezolutia aril- β -hidroxi esterilor	26
6. Concluzii generale	31
7. Lista completa a publicatiilor	32
Literatura	34

Cuvinte cheie: lipaze, biotransformare, 3-aryl-3-hidroxi propanoati, rezolutie cinetica, immobilizarea lipazelor, acizi grasi

1. Introducere

În ultimele decenii s-a înregistrat o creștere aproape exponențială a necesarului de compuși optici puri. Principalul motiv este dorința de creștere a calității vieții omului. E vorba în primul rând de medicamente de calitate superioară dar și de alte produse (cosmetice, parfumuri, insecticide, agrochimicale), majoritatea putând fi obținute din sintoni cu structuri chimice variate. β -Hidroxiacizii și derivații lor optici puri sunt doar una dintre aceste clase de compuși. În structura lor sunt prezente cel puțin două grupuri funcționale (hidroxilică și carboxilică) care pot fi modificate în alte grupuri (aldehide, amine, amide). Sinteză unor: (i) antibiotice β -lactamice (penemii și carbapenemii), (ii) compuși naturali (acid γ -lactonic, de exemplu acidul isomuronic și neuropogolic), (iii) inhibitori selectivi ai reabsorbției serotoninei și norepinefrinei (fluoxetine, duloxetine, etc.) și (iv) inhibitori ai HMG-CoA reductazei (asa numitele statine) pornind de la β -hidroxiacizi sau derivați ai acestora a fost prezentată recent în literatură de specialitate.

Lipazele

Enzimele, în special lipazele sunt utilizate în mod uzual ca și catalizatori în sinteză organică datorită enantio- și regioselectivității lor foarte ridicate. Pe lângă substraturile lor naturale (trigliceridele), lipazele pot cataliza transformarea unei mari varietăți de compuși alifatici, ciclici, aromatici și organometalici.¹ Mai mult de atât ele sunt stabile în solvenți nepozi deoarece își manifestă activitatea naturală la interfața lipidă/apă. Lipazele pot fi utilizate atât în sinteză cât și pentru hidroliza esterilor, prin alegerea corespunzătoare a condițiilor. La ora actuală lipazele sunt obținute în cantități impresionante (sute de tone anual) pentru a fi utilizate ca aditivi în detergenți. Obținerea lor prin tehnici de inginerie genetică le face accesibile la prețuri rezonabile și ușor de modificat (îmbunătățirea proprietăților: selectivitate, specificitate, rezistență). Lipazele native (în soluție) pot fi utilizate doar o dată. Dacă se apelează însă la imobilizare, este posibilă recuperarea și reutilizarea lor și uneori chiar îmbunătățirea termostabilității și a selectivității.²

În cadrul sintezei asimetrice, cea mai uzuală aplicație a lipazelor este rezoluția cinetică a racemateilor. Pentru eliminarea dezavantajelor majore ale acesteia, randamentul teoretic de maxim 50% și scăderea exceselor enantiomerice odată cu creșterea conversiei, se apelează la rezoluția cinetică dinamică (dynamic kinetic resolution- DKR), când un amestec racemic este transformat într-un singur enantiomer, paralel cu racemizarea *in situ* a celuilalt, mai puțin reactiv (Figura 1).³

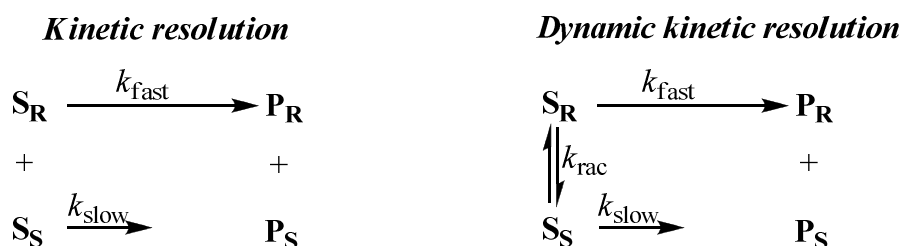


Figura 1. Rezoluția cinetică (KR) și rezoluția cinetică dinamică (DKR)

2. Utilizarea β -hidroxiacizilor heterociclici ca sintoni in obtinerea unor produse farmaceutice si a altor chimicale fine

2.1. β -Hidroxiacizii si esterii acestora ca si sintoni chirali si materii prime

β -Hidroxiacizii si esterii acestora optic activi sunt sintoni chirali versatili datorita dublei lor functionalizari. De aceea ei pot fi utilizati ca si materii prime pentru obtinerea unor compusi bioactivi: vitamine, antibiotice, feromoni si compusi de aroma.⁴ In Schema 2 sunt prezentate doar cateva exemple ilustrative. Medicamentele sunt utilizate pentru tratarea unei game variate de afectiuni:

1) (S)-duloxetine, (R)-atomoxetine si (R)-fluoxetine sub forma de clorhidrat sunt inhibitori ai reabsorbției serotoninei-norepinefrinei si pot ameliora starea generala a pacientilor afectati de diabetic neuropatic, depresie si anxietate.⁵

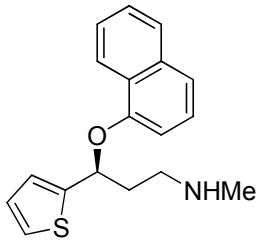
2) Simvastatin, Pravastatin si Atorvastatin apartin clasei statinelor. Ei inhiba 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzim A reductaza (HMG-CoA) care catalizeaza conversia reductiva a HMG-CoA in mevalonat, compus important in primele etape, limitative ale biosintezei colesterolului. Astfel se realizeaza scaderea nivelului LDL (LDL=low-density lipoprotein). Testele clinice efectuate cu statine au indicat o legatura directa intre nivelul acestuia si incidenta afectiunilor coronariene, in general mortale.⁶

3) Substante naturale utilizate ca si sintoni ai unor medicamente derivate din acidul γ -lactonic: Acidul lichesterolic, acidul neuropogolic, acidul iszmuronic.⁷

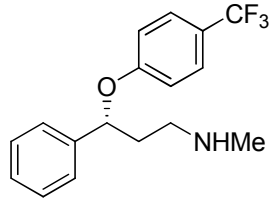
4) (-)-Tetrahidrolipstatin (nume comercial Orlistat) este un derivat al lipstatinului, izolat din *Streptomyces toxytricini* in 1987, un inhibitor ireversibil si selectiv al lipazei pancreatice.⁸

5) Dorzolamide (nume comercial Trusopt) se utilizeaza sub forma de solutii oftalmice si reduce presiunea interoculara care apare in glaucom si hipertensiune oculara.⁹

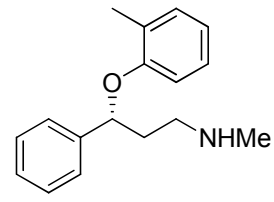
6) Penem, Carbapenem reprezinta o clasa relativ noua de antibiotice cu spectru antimicrobian larg, unele dintre ele in faza de studii clinice. Penemii si carbanemii se utilizeaza pentru eliminarea patogenilor atunci cand alte medicamente sunt ineficiente.¹⁰



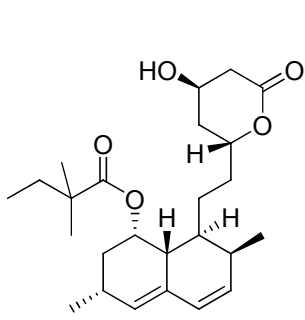
Duloxetine



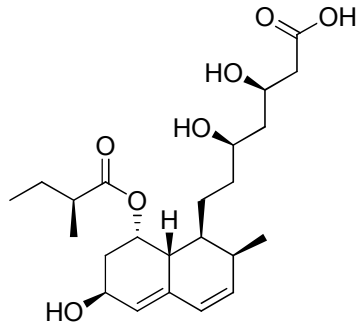
(*R*)-Fluoxetine



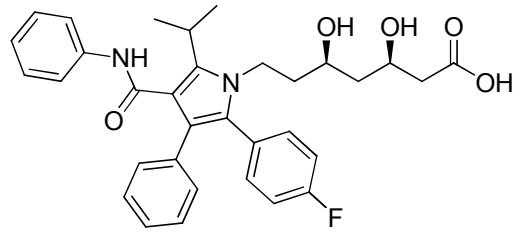
Atomoxetine



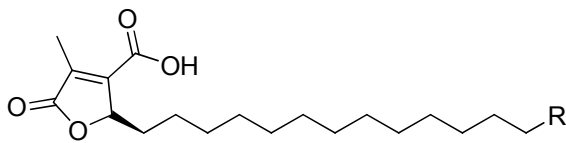
Simvastatin



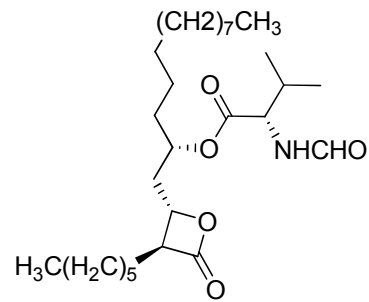
Pravastatin



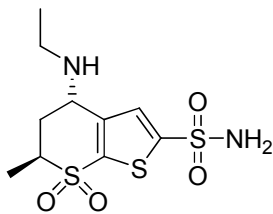
Atorvastatin



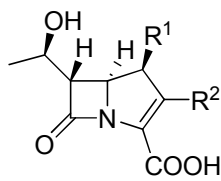
R = H: (+)-Lichesterolic acid
 R = CH(OH)Me: Neuropogolic acid
 R = COMe: Isomuronic acid



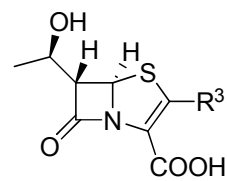
tetrahydrolipstatin



Dorzolamide



Carbapenem

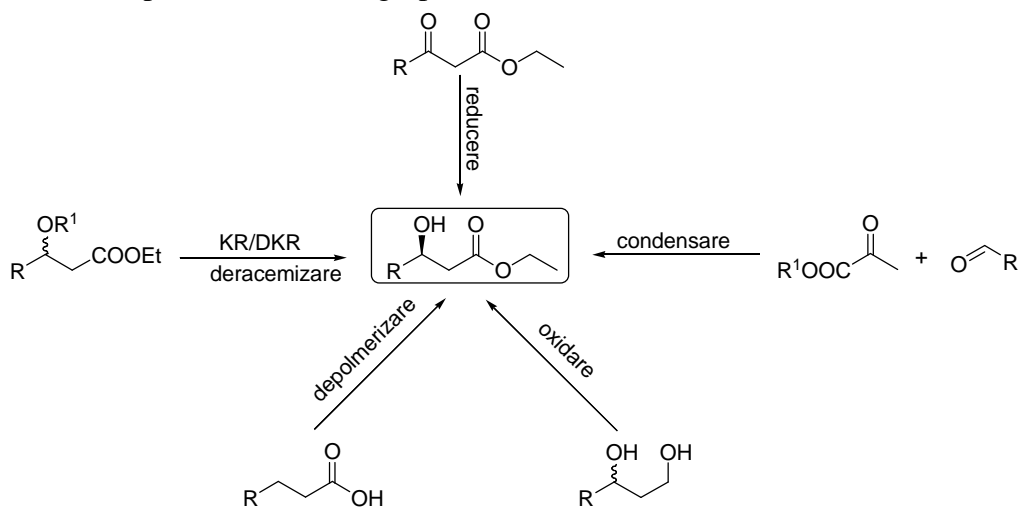


Penem

Schema 2. Medicamente care pot fi sintetizate pornind de la β -hidroxiacizi si derivatii acestora

3. Studiu de literatura. Abordari biocatalitice de obtinere a β -hidroxiacizilor si esterilor acestora

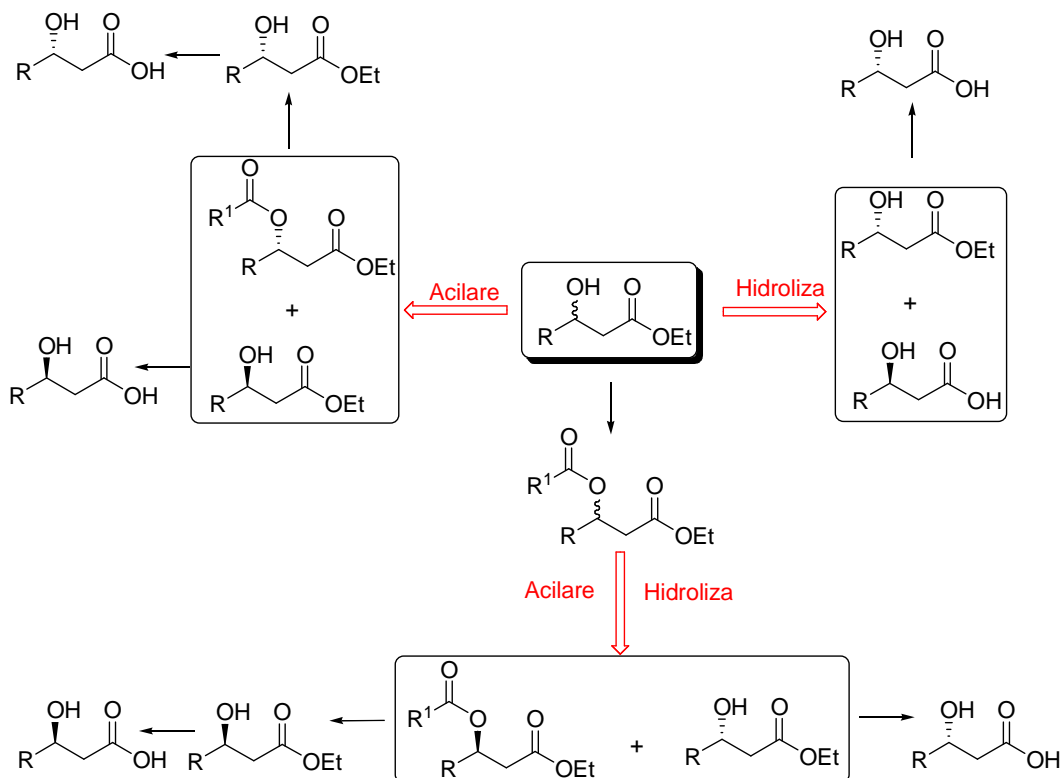
Cele mai importante metodologii prezentate in literatura sunt ilustrate in Schema 6.



Schema 6. Metodologii de obtinere a β -hidroxiacizilor si a esterilor acestora

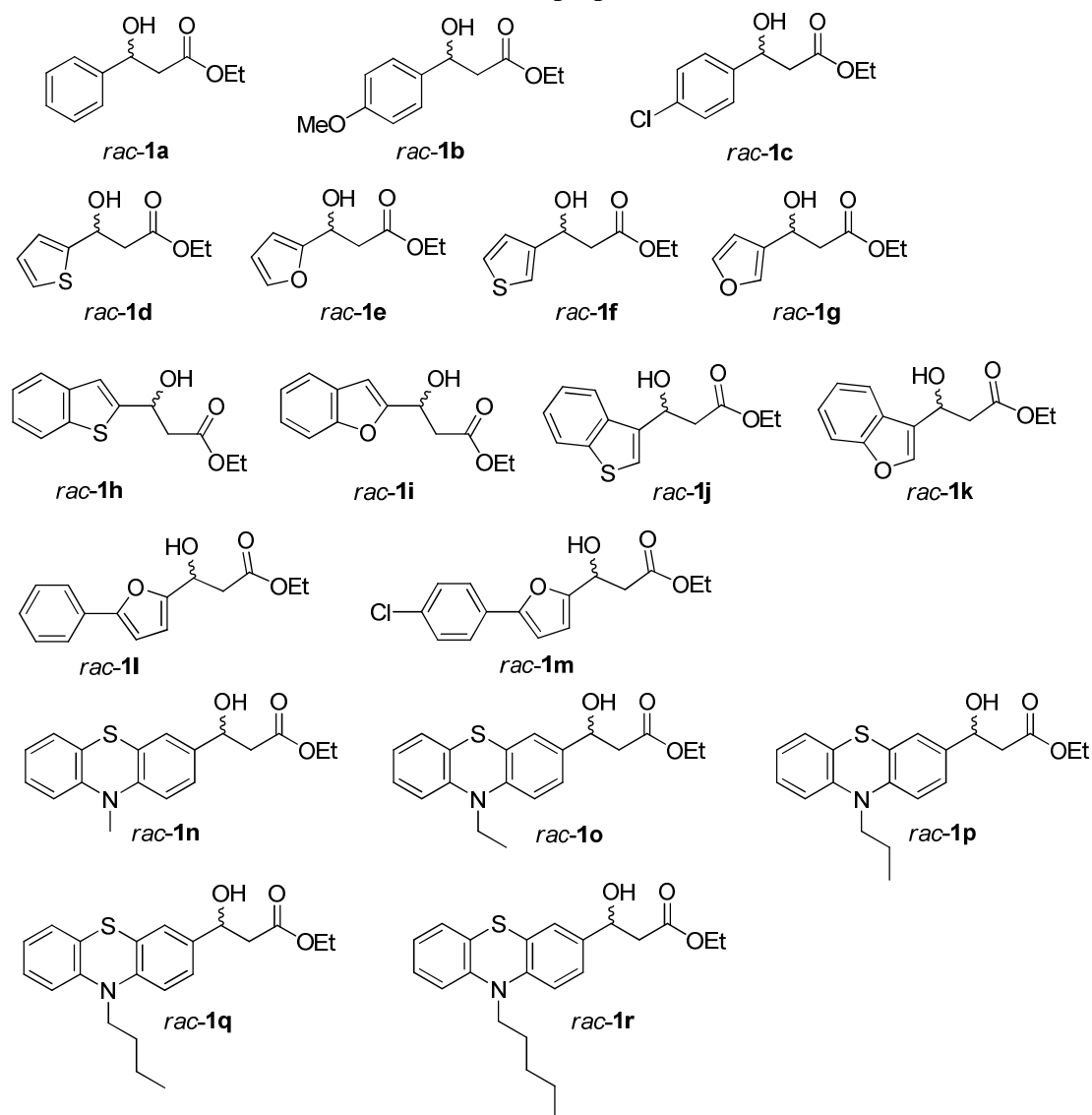
4. Scopul lucrarii

Obiectivul principal al acetsei teze este studiul acilarii si hidrolizei selective, catalizata de lipaze, a 3-aryl-3-hidroxiopropanoatilor de etil, reactii prezentate in Schema 12. Functionalitatea duala a compusilor utilizati a necesitat fie elaborarea unor metode noi, fie imbunatatirea celor deja existente in scopul obtinerii β -hidroxiacizilor si a esterilor lor cu enantiopuritate ridicata.



Schema 12. Metodologiile utilizate in reactiile de rezolutie cinetica mediate de lipaze

Au fost utilizate ca substraturi ai rezolutiei cinetice enzimaticice (in special cu lipaze) compusii din Schema 13, adica 3-aryl-3-hidroxi propanoati de etil cu diverse structuri (*rac-1a-r*) care contin radicali aril, care au fost mai intai preparati ca racemati.



Schema 13. Substraturile racemice cu structura de β -hidroxi-propanoati de etil (*rac-1a-r*) utilizate in rezolutia cinetica enzimatica

La scara analitica au fost testate mai multe enzime, iar la scara preparativa doar lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (lipaza AK „Amano” 20, libera si immobilizata), din *Candida rugosa* (CRL, AYS Amano), lipaza A din *Candida antarctica* (CAL-A libera si immobilizata prin adsorbție pe celita in prezenta de zaharoza) si lipaza B din *Candida antarctica* (lipaza CAL-B immobilizata, comercializata sub denumirea de Novozyme 435). Proprietatile tuturor lipazelor au fost prezentate deja in literatura¹¹.

5. Rezultate si discutii

5.1. Prezentarea generala a metodologiei de lucru

Principalul obiectiv al acestei teze este studiul reactiilor de acilare si hidroliza enzimatica selectiva a 3-aril-3-hidroxiopropanoatilor de etil substituiti cu diverse resturi aromatice: fenil simplu si substituit, fenil-furanil simplu si substituit, tiofen-2 si 3-il, furan-2 si -3-il, benzofuran-2 si 3-il si N-alchil-fenotiazinil (Schema 13). S-a urmarit in special elaborarea unei metode optime (acilare si hidroliza mediate enzymatic selectiva) pentru toate aceste tipuri de substraturi. Desi in literatura au fost prezentate deja cateva metode de acilare sau hidroliza a acestor tipuri de substraturi, o metodologie generala nu exista inca.

Mai intai s-a realizat sinteza chimica a substraturilor implicate in biotransformare (β -hidroxi-acizi, esteri si diesteri). In continuare s-a realizat separarea chirala a racematilor, utilizand cromatografia si coloanele chirale adecvate, in scopul determinarii activitatii si selectivitatii reactiilor enzimatic.

S-a trecut apoi la efectuarea reactiilor enzimatic, mai intai la scara analitica si apoi la scara preparativa, in conditiile optime determinate la scara analitica. Produsii de biotransformare izolati la scara preparativa au fost analizati si caracterizati. Compusii nou sintetizati au fost caracterizati complet prin diferite metode analitice (cromatografie, NMR, MS si IR) si li s-a determinat configuratia absoluta prin VCD.

Pentru a fi mai clar, biotransformarile mediate enzymatic au fost divizate in patru categorii, pe baza structurii substraturilor utilizate a) Substraturi cu structura ce include resturi de tiofen -2 si -3 si furan-2 si -3 (Cazul 1.); b) Substraturi care contin resturi de benzo[b]tiofen -2 si -3 si benzofuran-2 si -3 (Cazul 2.) si c) Substraturi care contin fenotiazine *N*-substituite (Cazul 3.).

Studiul proceselor de *O*-acilare si hidroliza enzimatica selectiva a β -hidroxi esterilor si a diesterilor acestora a condus la concluzia ca *O*-acilarea este cea mai buna metoda in cazul acestor tipuri de substraturi.

Obtinerea unei metodologii generale (acilarea selectiva mediata de lipaze) a impus si utilizarea altor substraturi in biotransformari, respectiv a celor care contin fenil simplu si substituit, respective fenil-furanil simplu si substituit.

Pentru a imbunatati performantele catalitice ale lipazei AK in rezolutia β -hidroxiesterilor studiati, au fost preparati si biocatalizatori "tailor made" (Cazul 4.). Acestia trebuie intelesi ca enzime imobilizate in scopul imbunatatirii performantelor lipazei AK in procesul de *O*-acilare selectiva a β -hidroxiesterilor ca substraturi, create special pentru aceste tipuri de compusi. Datorita tolerantei nu foarte inalte a acestor preparate imobilizate, metoda nu a putut fi inasa generalizata inca. S-a trecut de aceea la studierea acizilor grasi ca si donori de grupari acil in procesul de acilare selectiva (Cazul 5.).

5.2. Sinteze enzimatic

In procesele de rezolutie cinetica enzimatica au fost utilizati ca si substraturi β -hidroxiesteri cu diferite grupari aromatice. A fost studiata atat reactia de *O*-acilare cat si cea de hidroliza selectiva (metode deja prezentate in literatura) in prezenta lipazelor ca si catalizatori chirali. *O*-Acilarea a fost efectuata in toate cazurile, in timp ce hidroliza doar in situatiile in care acilarea nu a condus la rezultate bune. In cazul esterilor noi au fost studiate ambele tipuri de procese pentru a obtine rezultate cat mai concludente.

5.2.1. Cazul 1. Tiofenul, furanul (Articol 1)

(*S*)-3-Hidroxi-3-(tiofen-2-il)propanoatul de etil [notat aici (*S*)-**1d**] este un precursor in sinteza duloxetinei (un inhibitor al reabsorbției serotoninei-norepinefrinei), motiv pentru care studiata realizarea la scara preparative a rezolutiei cinetice enzimatic a racematilor de 2- si 3-furil-, respectiv 2- si 3-tienil-3-hidroxiopropanoatilor de etil

Screening-ul enzimelor a fost efectuat la scara analitica pentru reactia de *O*-acilare a *rac*-**1d** utilizat ca si compus model in acetat de vinil pur (Tabelul 6). In procesele catalizate de lipaze, etapa decisiva este cea de formare a intermediarului acil-enzima, un intermediar esteric format de gruparea hidroxică a unui rest de serina si donatorul gruparii acil. In acest context β -hidroxiesterul, nucleofilul, se fixeaza in situsul de legare a nucleofilului intr-o maniera enantioselectiva inainte de a reactiona cu intermediarul. Datorita naturii duale a substraturilor este nevoie de o atentie sporita la alegerea donatorului achiral de grupare acil. De exemplu, in cazul catalizei cu CAL-B poate aparea o reactie competitiva de interesterificare cu formarea unor produse secundari,¹² reactie utilizata de altfel in alte aplicatii.¹³ Pentru a preveni reactia secundara de interesterificare la utilizarea CAL-B a fost ales ca donator ireversibil de grupare acil acetatul de vinil. Acesta este un donator mai reactiv decat substratul esteric (*rac*-**1d**) si astfel reactiile secundare posibile (dimerizarea substratului) sunt eliminate. La utilizarea CAL-A procesele de interesterificare si dimerizare sunt mai putin probabile datorita buzunarului de legare a gruparii acil, mult mai restrictiv. Rezultatele obtinute in cazul substratului model au evidentiat doua aspecte interesante.

In primul rand, in prezenta CAL-A si a lipazei din *Rhizopus oryzae* reactioneaza preferential enantiomerul *S* (Tabelul 6, liniile 1-3 si 10-11), in timp ce in cazul celorlalte enzime reactioneaza mai rapid enantiomerul *R* (liniile 4-9 si 12-17). In mod clar, CAL-B (linia 4) si diferite preparate de CAL-A, in special cel cu lipaza adsorbita pe celita in prezenta zaharozei (linia 2),¹⁴ da cele mai rapide si enantioselective reactii cu *rac*-**1d**. In plus fata de lipazele prezentate in Tabelul 6, lipaza din pancreasul porcine, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica* si *Penicillium camemberti* au fost practic inactive in conditiile testate.

Asa cum se observa in Tabelul 6, CRL si Lipaza-F par a fi eficiente in rezolutia cinetica a *rac*-**1d** (*E*= 71 si 124, liniile 17 si 20). Pe de alta parte, in cazul lipazei din *Candida rugosa* nu au fost obtinute rezultate satisfacatoare nici dupa optimizarea procesului de rezolutie (Tabelul 7). O explicatie posibila este prezenta unor izoenzime in preparatul enzimatic utilizat, deja semnalata si in alte studii.

Tabelul 6. Acilarea *rac-1d* (0.050 M) cu diverse enzime (50 mg/mL) in $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ pur la temperatura camerei

Nr.	Enzima	Timp (h)	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{2d} (%)	Configuratie	<i>ee</i> _{1d} (%)	Configuratie	<i>E</i>
1	CaL-A (liofilizata)	1	25	75	(<i>S</i>)	20	(<i>R</i>)	7
2	CaL-A pe Celita	1	49	78	(<i>S</i>)	93	(<i>R</i>)	54
3	CaL-A CLEA	1	38	75	(<i>S</i>)	39	(<i>R</i>)	10
4	CaL-B (Novozyme 435)	20	7	94	(<i>R</i>)	8	(<i>S</i>)	40
5	L-AK (liofilizata)	20	25	80	26	(<i>R</i>)	12	20
6	L-AK pe Celita	20	20	70	18	(<i>R</i>)	7	20
7	CRL	20	35	94	(<i>R</i>)	38	(<i>S</i>)	71
8	CRL sol-gel	20	29	91	(<i>R</i>)	39	(<i>S</i>)	50
9	Lipase TL-IM	20	2	94	(<i>R</i>)	2	(<i>S</i>)	36
10	Lipase F	20	7	99	(<i>S</i>)	6	(<i>R</i>)	124
11	Lipase F imobilizata	20	6	23	(<i>S</i>)	2	(<i>R</i>)	2
12	PPL	20	2	41	(<i>R</i>)	1	(<i>S</i>)	2
13	LPS	20	4	34	(<i>R</i>)	3	(<i>S</i>)	2
14	PS-C II	20	7	35	(<i>R</i>)	85	(<i>S</i>)	5
15	PS-D	20	55	61	(<i>R</i>)	77	(<i>S</i>)	10
16	Alcalaza- CLEA	20	24	88	(<i>R</i>)	28	(<i>S</i>)	20

Tabelul 7. Acetilarea 3-hidroxi-3-(tiofen-2-il)propanoatului de etil (*rac-1d*, 50 mg/mL) catalizata de CRL (50 mg/mL) cu diferiti donori de acil (5 eq.) in diferiti solventi la temperatura camerei in prezenta sitelor moleculare

Nr.	Solvent	Donor acil	Timp (h)	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _p (%)	<i>ee</i> _s (%)	<i>E</i>
1	Dietileter	VA	6	27	88	40	24
2	Ciclohexan	VA	6	16	91	21	25
3	Toluen	VA	6	18	89	23	22
4	<i>n</i> -octan	VA	6	24	93	36	42
5	<i>n</i> -octan	VP	16	45	92	90	79
6	<i>n</i> -octan	VB	16	50	84	97	47

Selectivitatea inversa a lipazei F in acilarea alcoolilor secundari a fost deja descrisa in mai multe articole, dar inca nu a fost efectuat un studiu sistematic pentru utilizarea ei in acilarea β -hidroxiesterilor. De aceea a fost studiat efectul solventului si al agentului de acilare. Selectivitatea si activitatea enzimei scade la utilizarea donozilor de acil cu catene mai lungi (Tabelul 8, liniile 1-3). Toluenul a fost ales ca solvent optim (Tabelul 8, linia 6). Solventii nepolari (liniile 4-7) permit obtinerea unor rezultate mai bune, in timp ce solventii polari nu pot fi utilizati (liniile 8-12). Dezavantajul major al lipazei F la scara preparativa este activitatea ei redusa, in ciuda enantiomeraselectivitatii inalte ca si enzima (*S*)-selectiva. O explicatie posibila ar fi continutul redus in proteina al preparatului enzimatic comercializat.

Tabelul 8. Acilarea 3-hidroxi-3-(tiofen-2-il)propanoatului de etil (*rac-1d*, 50 mg/mL) catalizata de lipaza F (50mg/mL) cu diferiti donori de acil (5 eq.) in mai multi solventi la temperatura camerei in prezenta sitelor moleculare

Nr.	Solvent	Donr de acil	<i>c</i> (%)	ee _P (%)	ee _S (%)	<i>E</i>
1	VA	VA	18	98	22	124
2	VP	VP	14	94	19	84
3	VB	VB	7	85	10	71
4	<i>n</i> -Octan	VA	13	96	14	50
5	<i>n</i> -Hexan	VA	15	96	17	63
6	Toluen	VA	14	97	16	70
7	Benzen	VA	6	96	6	50
8	Acetonitril	VA	6	92	6	25
9	Dioxan	VA	0.1	77	0.1	8
10	Cloroform	VA	6	91	6	22
11	Diclorometan	VA	8	91	7	24
12	THF	VA	6	93	5	29

Datorita rezultatelor obtinute, atat CRL cat si lipaza F nu au mai fost studiate in continuare.

Atentia noastra s-a indreptat spre CAL-A si CAL-B, doua lipaze fascinante mult exploatate de exemplu in *N*-acilarea β-aminoesterilor.¹⁵ Enantioselectivitatea inversa observata, desi moderata, ne-a incurajat insa sa continuam studiile pentru cele doua enzime.

Acilarea *rac-1d* cu acetat, propanoat si butanoat de vinil pur, utilizat atat ca si doner de acil cat si ca si solvent a permis evidentierea efectelor opuse ale CAL-A si CAL-B asupra valorilor enantioselectivitatii *E* (Tabelul 9).

Tabelil 9 Acilarea *rac-1d* (50mg/mL) catalizata de CaL-A si CaL-B (50mg/mL) cu esterii vinilici puri la temperatura camerei

Nr.	Donor de acil/solvent	CaL-A ^a				CaL-B ^b			
		<i>c</i>	ee _P	ee _S	<i>E</i>	<i>c</i>	ee _P	ee _S	<i>E</i>
1	VA	50	78	93	54	5	71	3	6
2	VP	62	61	99	19	15	97	17	74
3	VB	51	71	73	13	45	>99	79	>>200

^a dupa 1h pentru CaL-A imobilizata pe celita; ^b dupa 60 h pentru CaL-B

La utilizarea CAL-A, cea mai mare enantioselectivitate (*E*=54, linia 1) s-a obtinut in acetate de vinil pur, in timp ce CAL-B a dat rezultate excelente la utilizarea butanoatului de vinil (*E*>200, linia 3).

A fost studiat mai departe efectul solventului la acilarea *rac-1d* cu CAL-A si acetat de vinil (VA) respectiv cu CAL-B si butanoat de vinil (VB) (Tabelul 10).

Reactia in ester vinilic a condus la rezultate acceptabile cu ambele lipaze (Tabelul 10, linia 12). In plus, reactivitatea este buna in eteri sau solventi hidrofobi la utilizarea CAL-B si decurge cu enantioselectivitati bune (*E*>200) (liniile 1-6 si 9). Deoarece butanoatul de vinil

este relativ scump si are un punct de fierbere ridicat, experimentele cu CAL-B au fost continuate in *tert*-butil metil eter (MTBE) ca si solvent.

Table 10. Acilarea *rac*-**1d** (50mg/mL) in prezenta CaL-A si CaL-B (50mg/mL) cu VA sau VB (5 eq.) in diferiti solventi la temperatura camerei

Nr.	Solvent	CaL-A ^a				CaL-B ^b			
		c	ee _P	ee _S	E	c	ee _S	ee _P	E
1	<i>n</i> -Octan	21	74	20	8	44	95	75	94
2	<i>n</i> -Hexan	20	74	18	8	46	98	85	>>200
3	Toluen	14	72	12	7	49	98	93	>>200
4	Benzen	12	81	11	10	46	99	85	>>200
5	MTBE	19	77	18	10	45	98	81	>200
6	Dietleter	31	73	33	9	50	98	97	>>200
7	Acetonitril	21	86	22	16	8	93	8	27
8	Dioxan	1	52	1	3	3	>99	3	>>200
9	Cloroform	3	67	2	5	6	>99	6	>>200
10	Diclorometan	7	87	6	15	9	>99	10	>>200
11	THF	9	86	9	15	8	>99	9	>>200
12	Ester vinilic pur	50	78	93	54	45	>99	7	>>200

^a dupa 1h pentru CaL-A imobilizata pe celita; ^b dupa 60 h pentru CaL-B

In final a fost realizata acilarea *rac*-**1d-g** cu CAL-A in acetat de vinil pur si cu CAL-B si butanoat de vinil in MTBE (Tabelul 11).

Tabelul 11. Rezolutia cinetica a *rac*-**1d-g** (50mg/mL) cu lipazele din *Candida antarctica* (50mg/mL)

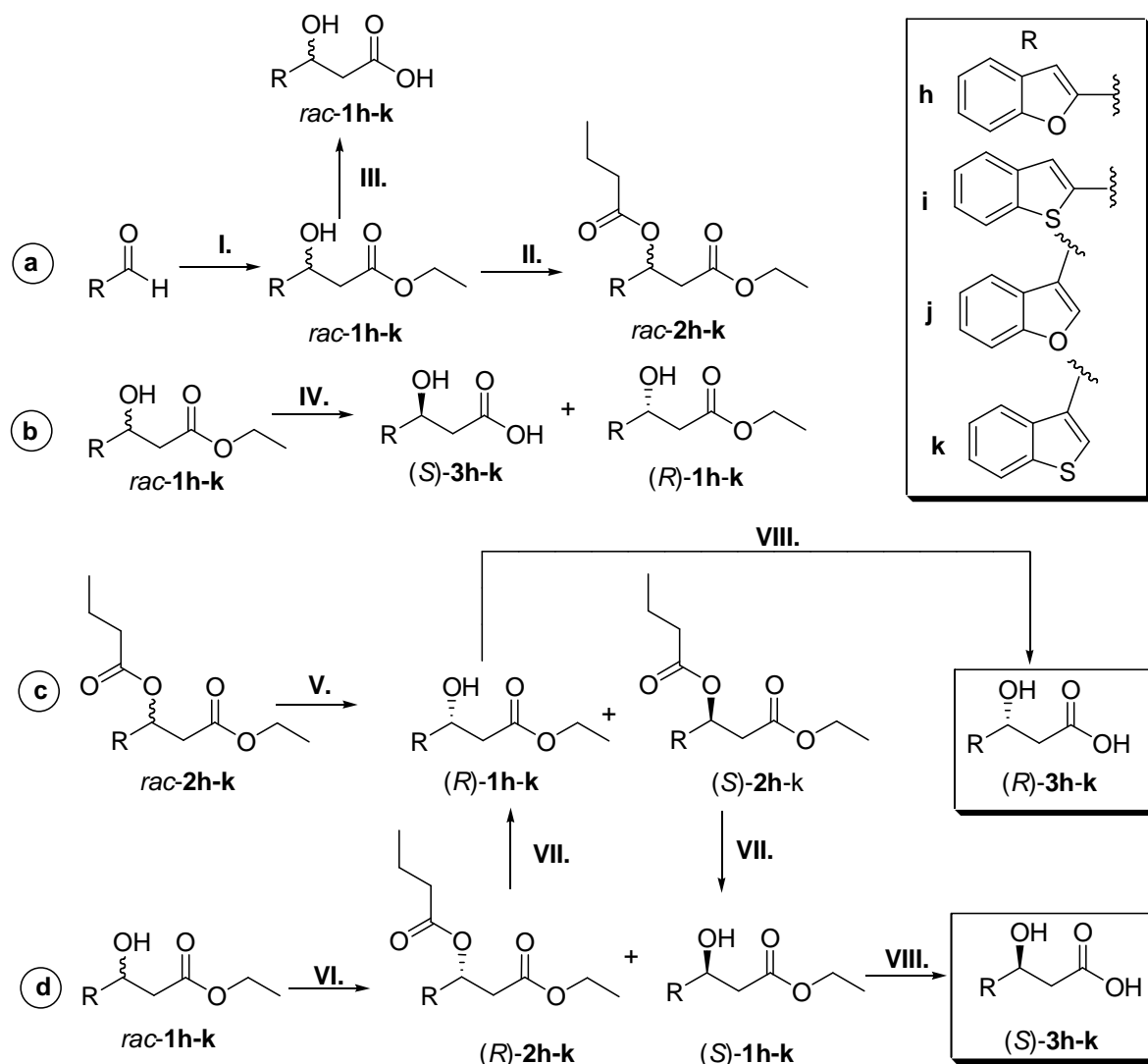
Entry	Substrate	CaL-A ^a				CaL-B ^b			
		c	ee _P	ee _S	E	c	ee _S	ee _P	E
1	<i>rac</i> - 1d	48	93	80	54	50	96	95	>200
2	<i>rac</i> - 1e	49	85	86	33	51	>99	94	>200
3	<i>rac</i> - 1f	50	73	72	14	50	>99	98	>>200
4	<i>rac</i> - 1g	46	85	80	22	48	99	91	>>200

^a dupa 1h pentru CaL-A imobilizata pe celita in VA pur; ^b dupa 70 h pentru CaL-B cu 5 eq. VB in MTBE

Rezultatele obtinute indica in mod clar *R*-enantioselectivitatea excelenta a reactiei de *O*-acilare catalizata de CAL-B ($E > 200$), in timp ce CAL-A prezinta o *S*-selectivitatea moderata ($E = 14-54$). In final procesul a fost realizat la scara preparative pentru toti compusii *rac*-**1d-g** cu CAL-B in MTBE, ceea ce a permis obtinerea (*R*)-esterilor **2d-g** ($R^1 = Pr$) si a substratului netransformat (*S*)-**1d-g** cu puritate optica ridicata ($ee = 95-99\%$).

5.2.2. Cazul 2. Benzofuranul, benzotiofenul (Articol 2)

Sinteza 3-benzofuranil- si and benzo[*b*]tiofenil-3-hidroxi-propanoatilor optic puri prin reaolutie cinetica enzimatica nu a fost din cate stim prezentata inca in literatura. De aceea a fost elaborat un proces de rezolutie cinetica a acizilor 3-heteroaril-3-hidroxi-propanoici **3h-k** si a derivatilor acestora **1,2h-k** (Schema 17).



I. 2-bromoacetat de etil, Zn, THF, reflux; **II.** CoCl₂, (CH₃-CH₂-CH₂-COO)₂O, CH₃CN, reflux;
III. PLE in apa sau K₂CO₃ in apa si reflux; **IV.** BCL, H₂O, solvent organic; **V.** CRL, H₂O, solvent organic;
VI. CH₃-CH₂-CH₂-COO-CH=CH₂, lipaza, solvent; **VII.** BCL, H₂O, solvent organic; **VIII.** PLE, H₂O.

Schema 17. Sinteza enantioselectiva mediate de lipaze a acizilor 3-heteroaril-3-hidroxi-propanoici **3h-k** si a derivatilor acestora **1,2h-k**

Configuratia absoluta a compusilor cu puritate optica ridicata sintetizati a fost determinata prin masuratori de dicroism circular vibrational (vibrational circular dichroism-VCD) combinate cu calcule de chimie cuantica la un nivel teoretic *ab initio* (DFT), metoda deja bine cunoscuta de determinare a configuratiei si conformatiei absolute a moleculelor chirale mici si medii in solutie.¹⁶

SINTEZE ENZIMATICE

Hidroliza enzimatica a *rac-1h-k* la scara analitica

Hidroliza esterilor racemici *rac-1h-k* a fost testata cu o gama variata de hidrolaze disponibile comercial. Bioprocesul a fost monitorizat cromatografic, cu HPLC. Majoritatea enzimelor testate, lipaza A, AK, AY, F, G, M, R si Lypozyme TL IM au fost inactive. Lipaza A si lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-A si CaL-B, comercializat ca si Novozym 435), lipaza din *Candida rugosa* (CRL) si PLE au prezentat activitate enzimatica mare dar enantioselectivitati reduse pentru toate substraturile testate *rac-1h-k*. Hidroliza completa are loc in 2-4 h. Numai BCL (initial abreviata LPS) s-a dovedit un catalizator eficient pentru sinteza (*R*)-**1h-k** cu puritate optica mare ($ee=97-99\%$), in timp ce puritatea (*S*)-**3h-k** a fost redusa ($ee<50\%$) la conversii apropiate de 50% (randamente de izolare a (*R*)-**1h-k** and (*S*)-**3h-k** de 45-48%, Tabelul 13). Aceasta contradictie aparenta poate fi explicata numai printr-un proces de racemizare lenta a acizilor 3-heteroaril-3-hidroxiopropanoici in prezenta apei. Procesul e chiar mai rapid daca se utilizeaza diferite solutii tampon cu pH cuprins intre 3-8 in locul apei.

Tabelul 13. Hidroliza enantioselectiva a *rac-1h-k* mediata de lipaza din *Burkholderia cepacia* (BCL) in apa distilata

Substrat	Timp (h)	Randament _{(R)-1h-k} (%)	ee _{(R)-1h-k} (%)	Randament _{(S)-3h-k} (%)	ee _{(S)-3h-k} (%)
<i>rac-1h</i>	24	46	97	47	48
<i>rac-1i</i>	24	45	98	47	46
<i>rac-1j</i>	32	48	99	49	42
<i>rac-1k</i>	32	47	98	48	41

Hidroliza enzimatica la scara analitica a *rac-2h-k*

In continuare a fost studiata biotransformarea compusilor diesterici *rac-2h-k* cu aceleasi enzime. Deoarece alcooliza enzimatica cu cativa alcooli anhidri s-a dovedit complet ineficienta (randamente $< 5\%$ dupa 7 zile), a fost testata hidroliza enzimatica a *rac-2h-k*. In timp ce majoritatea lipazelor testate au fost inactive, BCL a catalizat hidroliza rapida a *rac-2h-k* in amestec de solventi ciclohexan-THF (1:1,v:v) si 10 equiv. de apa cu regioselectivitate inalta si fara stereoselectivitate, cu formarea *rac-1h-k*. Prezenta *rac-3h-k* in amestecul de reactie nu a fost detectata nici dupa 7 zile. CRL a fost singura enzima care a catalizat hidroliza enantiomeraselectiva a *rac-2h-k* (Tabelul 14, Schema 17, ruta c). Dupa 24-26 h, la o conversie de aproximativ 50%, au fost obtinuti ambii produse cu enantiopuritati excelente in cazul *rac-2i-k* ($E > 200$), dar cu puritati optice moderate ($E = 36$) in cazul *rac-2h*, Tabelul 14.

Tabelul 14. Hidroliza enantiomeraselectiva a *rac-2h-k* in prezenta de CRL

Substrat	Timp (h)	c (%)	ee _{(S)-2h-k}	ee _{(R)-1h-k}	<i>E</i>
<i>rac-2h</i>	24	49	95	95	>200
<i>rac-2i</i>	24	47	79	87	36
<i>rac-2j</i>	26	50	95	95	>200
<i>rac-2k</i>	26	49	94	94	>200

Acilarea enzimatica enantiomeraselectiva a *rac-1h-k*

O alta abordare a sintezei stereoselective a derivatilor acizilor 3-heteroaryl-3-hidroxi-propanoici are la baza acilarea enantiomeraselectiva a heteroaryl-3-hidroxi-propanoatilor racemici *rac-1h-k*. In acest scop a fost realizata mai intai reactia la scara analitica in acetat de vinil in prezenta catorva enzime.

In cazul *rac-1h,i* majoritatea enzimelor testate au fost inactivate catalitic. Lipozymul din *Mucor miehei*, lipaza AK si Lipozym TL IM au prezentat o reactivitate scazuta si selectivitate moderata. Numai Novozym 435 a permis atingerea unei conversii de 50% dupa 96 h, dar cu o selectivitate scazuta ($E < 7$).

Se stie ca natura solventului si a nucleofilului pot influenta semnificativ selectivitatea procesului de acilare enantiomeraselectiva. A fost testata acilarea *rac-1i* cu acetat de vinil in prezenta Novozym 435 in cativa solvent organici, cum ar fi hidrocarburile aromatice si saturate si eterii saturati ciclici. Cel mai eficient solvent a fost ciclohexanul ($E = 22$ la o conversie de 46 % dupa 4 zile). In continuare au fost testati doi agenti de acilare (propanoat si butanoat de vinil) in ciclohexan. Rezultatele optime s-au obtinut cu butanoat de vinil ($E > 200$). Pentru rezolutia enzimatica a *rac-1h* s-au obtinut in aceste conditii rezultate similare (Tabelul 15). In cazul acilarii enzimaticice a *rac-1j,k* numai CaL-A a fost catalitic activa. Efectuarea aceleiasi proceduri de optimizare descrisa anterior a permis alegerea benzenului ca solvent si a butanoatului de vinil ca donor de grupare acil (Schema 17, ruta d).

Tabelul 15. Influenta naturii donorului de grupare acil la acilarea enzimatica a *rac-1h-k*

Substrat	Reactant	Timp (h)	c (%)	ee _{(S)-1}	ee _{(R)-2}	E
<i>rac-1h</i> ^a	VA	65	17	14	72	7
	VP	72	32	37	60	12
	VB	48	50	99	99	>>200
<i>rac-1i</i> ^a	VA	106	46	42	49	4
	VP	160	41	64	94	66
	VB	60	50	98	98	>200
<i>rac-1j</i> ^b	VA	24	45	60	72	11
	VP	24	50	67	67	10
	VB	24	48	85	92	65
<i>rac-1k</i> ^b	VA	16	44	38	49	4
	VP	16	40	60	90	35
	VB	16	49	91	93	87

^a ciclohexan, Novozym 435; ^b benzen, CaL-A

Sinteza enzimatica la scara analitica a ambilor enantiomeri (R)- si (S)-3h-k

Pe baza observatiilor noastre anterioare, ca BCL si PLE sunt enzime foarte active dar total neselective la hidroliza *rac-2h-k* in *rac-1h-k* si respectiv a *rac-1h-k* in *rac-3h-k*, aceste doua enzime au fost utilizate in continuare la sinteza (S)- and (R)-3h-k fara afectarea compozitiei enantiomerice a produsilor final izolati in prealabil (Schema 17, ruta c,d). Mai intai au fost hidrolizati cantitativ (S)-2h-k si (R)-2h-k in prezenta BCL, cu formarea (S)- si (R)-1h-k. Apoi, utilizand un raport substrat-enzima 1:2, ambii enantiomeri (S)- si (R)-1h-k au fost transformati rapid in acizii 3-heteroaryl-3-propanoici ((S)- and (R)-3h-k) cu puritate optica ridicata.

Configuratia absoluta a compusilor 1h-k optic activi sintetizati prin acilarea enantiomer selectiva a rac-1h-k

Spectra VCD ale (-)-**1h-k** obtinuti prin acilarea enantiomeraselectiva a rac-**1h-k** cu configuratie absoluta necunoscuta, inregistrate in solutie de CDCl₃, sunt prezentate in Figura 2. Se observa banda negativa $\nu_{C=O}$ caracteristica gruparii carbonilice esterice la $\sim 1715\text{ cm}^{-1}$ si zona dintre $1800\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ similara, ceea ce indica faptul ca natura heteroatomului (O sau S) si pozitia catenei pe entitatea heterociclica achirala are o influenta nesemnificativa asupra aspectului general al spectrului VCD. Explicatia acestui comportament este faptul ca molecule cu structuri foarte apropiate prezinta de obicei in spectrele VCD regiuni similare, mai ales cele generate de vibratiile unor parti structural identice ale molecule care nu sunt legate puternic de vibratiile altor unitati structurale.¹

Determinarea configuratiei absolute se bazeaza pe compararea spectrelor simulate si a celor masurate pentru compusul (-)-**1h** (Figura 2).

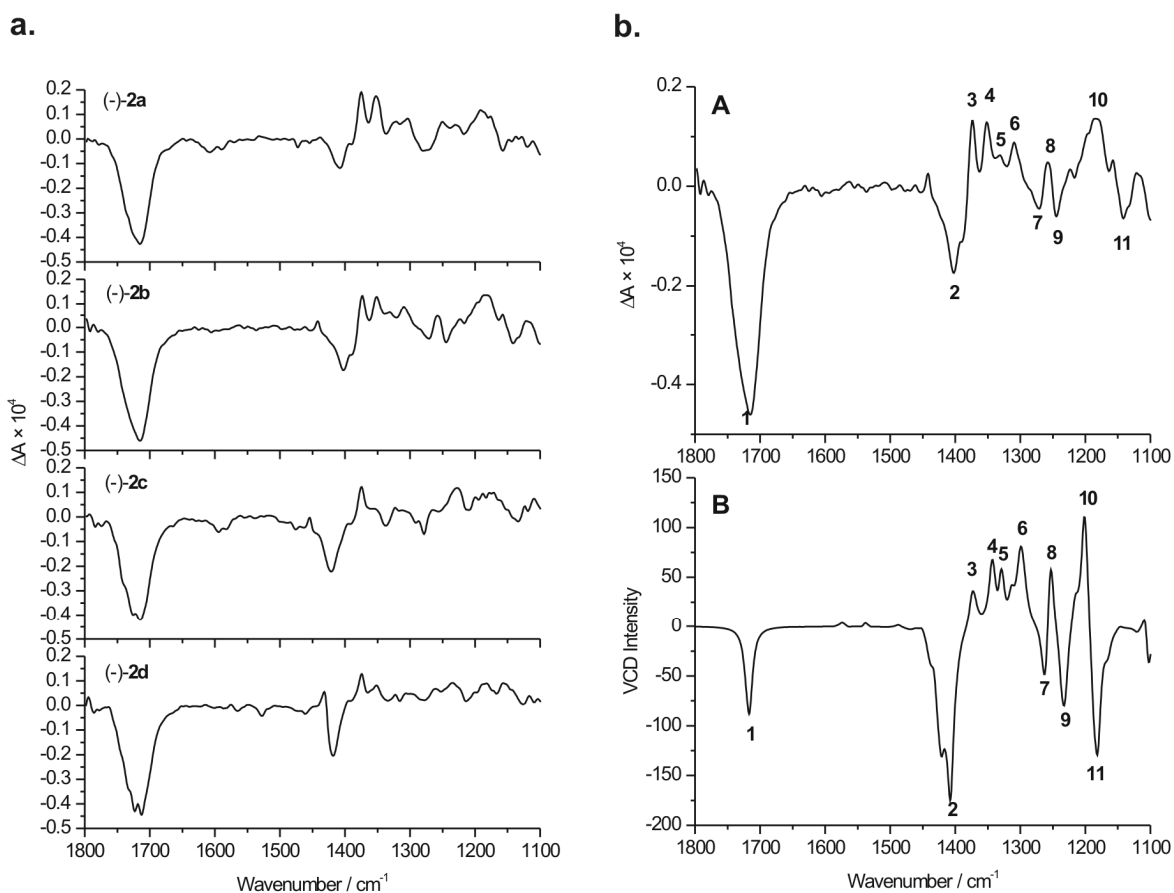


Figura 2. a. Spectrul VCD al compusilor (-)-**1h-k** masurate in CDCl₃; b. Spectrul VCD al (-)-**1h** masurat in solutie de CDCl₃ (A) in comparatie cu spectrul VCD simulat al (*S*)-**1h** (B), obtinut prin insumarea ponderata a spectrelor calculate pentru cele mai probabile conformatii. Benzile corespunzatoare sunt etichetate cu numere identice.

Au fost efectuate calculele pentru enantiomerul (*S*)-**1h** pentru patru conformeri posibili ai acestuia cu energie minima, reprezentati in Figura 3, cu o populatie totala estimata de 96%. Toti acesti conformeri cu energie minima contin legaturi de H intramoleculare intre carbonilul esterice si gruparea OH din pozitia β , in concordanta cu valoarea relativ scazuta ($\sim 1715\text{ cm}^{-1}$) a

gruparii carbonilice esterice $\nu_{C=O}$ din spectrul VCD determinat experimental (un ester alifatic tipic, fara legaturi intramoleculare de H, are o valoare caracteristica de circa $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$).

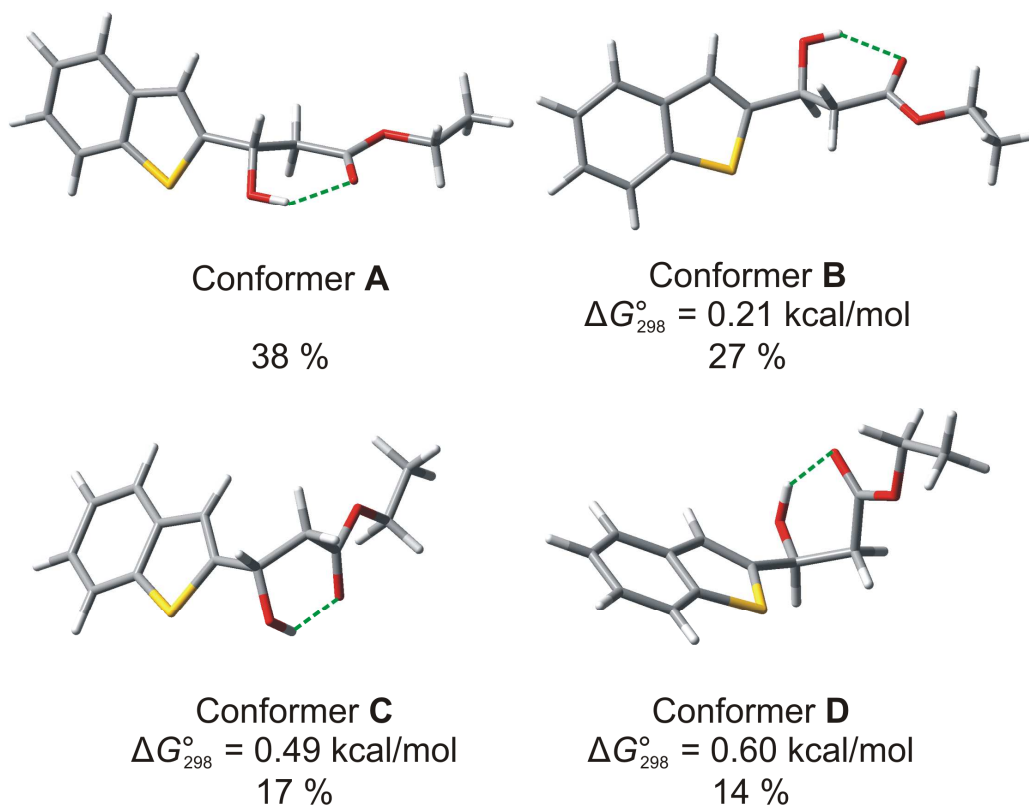


Figura 3. Structura celor mai semnificativi conformeri la echilibru, determinati computationally pentru (*S*)-**1h** impreuna cu energia libera Gibbs si populatiile estimate

Concordanta dintre spectrele VCD calculate si cele masurate este suficient de buna atat in ceea ce priveste valorile numarului de unda, cat si sensul benzilor VCD (perechile similar sunt etichetate cu aceleasi numere in Figura 3), ceea ce permite atribuirea configuratiei absolute *S* enantiomerului levogir in mod indubitabil.

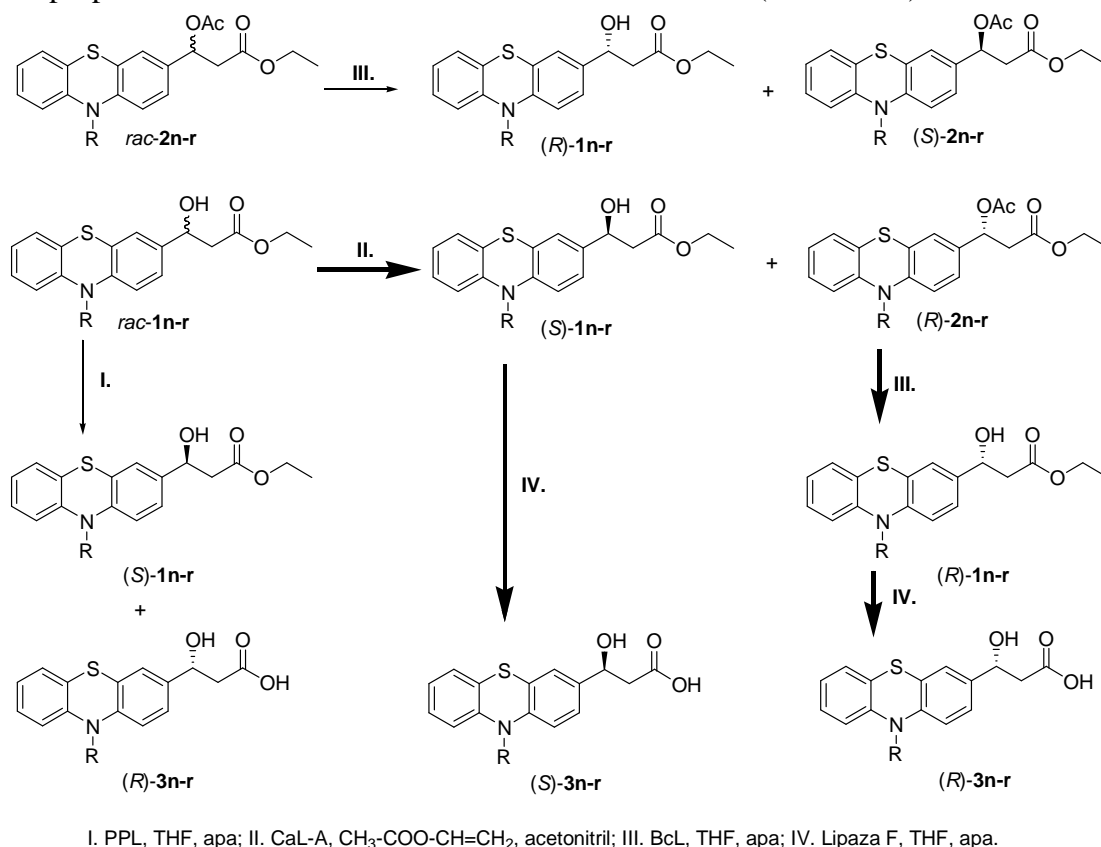
5.2.3. Cazul 3. Seria fenotiazinei (Articol 3.)

Fenotiazinele sunt una din cele mai vechi si mai mari clase de medicamente neuroleptice¹⁷ si reprezinta in acelasi timp un schelet valoros pentru sinteza unor structuri diferite, capabile sa interactioneze cu o mare varietate de procese biologice, utilizate ca medicamente din clasa tranchilizantelor,¹⁸ anti-inflamatoarelor,¹⁹ antimalaricelor²⁰ si agentilor antimicrobieni²¹. In timp ce anumite fenotiazine stimuleaza penetrarea agentilor anticancerosi prin bariera sanguina la nivelul creierului,²² altele inhiba leucin-encefalin aminopeptidazele plasmatiche umane, enzime cunoscute pentru reglarea vitezei de turnover a unei game largi de substante bioactive. O parte dintre ele au fost considerate recent ca medicamente potentiale in controlul maladiei Creutzfeldt-Jacob,²³ altele cu structura de fenotiazin-3-il-pirazolo[3,4-*d*]pirimidine au fost evaluate pentru activitatea lor antituberculoasa provocata de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv.²⁴ Sunt cunoscute deja fenotiazine care inhiba replicarea intracelulara a virusilor, inclusiv cel al imunodeficientei (HIV)²⁵, unii dintre ele au chiar efect

citostatic.²⁶ Toate acestea justifica pe deplin interesul mare in design-ul si sinteza unor derivati noi de fenotiazina cu potential anticanceros.

Datorita posibilitatilor de derivatizare multiple pe care le ofera, acizii 3-(fenotiazin-3-il)-3-hidroxiopropanoici sunt candidati buni pentru sinteza unor compusi biologic activi.

In cadrul studiilor efectuate de noi pentru elaborarea unor metode enzimatice stereoselective de obtinere a compusilor heteroaromatici optic activi, a fost efectuata sinteza enantioselectiva mediata enzimatic a ambilor enantiomeri a cinci acizi (fenotiazin-3-il)-3-hidroxiopropanoici *N*-substituiti **3n-r** si a derivatilor lor **1-2n-r** (Schema 18).



Schema 18. Biotransformarea derivatilor fenotiazinici

Configuratia absoluta a compusilor sintetizati a fost determinata prin dicroism circular vibrational (VCD) combinat cu calcule de chimie cuantica la nivel *ab initio* (DFT), ca in cazul anterior.²⁷

SINTEZE ENZIMATICE

Biotransformari la scara analitica

Hidroliza enzimatica a compusilor esterici *rac-1n-r* la scara analitica

In prima etapa a fost studiata hidroliza enzimatica a *rac-1n-r* in solventi miscibili cu apa: acetonitril, dioxan si tetrahidrofuran (amestec apa-solvent organic 25:1, v/v) la un raport substrat-enzima de 1:1 (m/m). Unele enzime cum ar fi lipaza din *Burkholderia cepacia* (BCL), *Penicillium camemberti*, *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Aspergillus niger*, *Candida antarctica*, *Candida lypolitica* si *Mucor miehei* au fost inactivate catalitic sau foarte putin active; altele, ca si lipaza din *Thermomyces lanuginosus* (TL IM), *Candida rugosa* (CRL) sau

Candida cylindracea (CcL) au prezentat o activitate si stereoselectivitate redusa. Lipaza din *Rhizopus oryzae* (Lipaza F), *Rhizopus arrhizus* sau *Mucor javanicus*, s-au dovedit foarte active dar neselective, hidroliza completa a *rac-1n-r* fiind incheiata in 2-3 ore. Lipaza din pancreasul porcin (PPL) a fost singura enzima enantiomeraselectiva si activa in acelasi timp pentru toti derivatii testati *rac-1n-r*. Rezultatele optime au fost obtinute in THF. Cantitatea de cosolvent utilizata influenteaza semnificativ procesul enzimatic. A fost determinata activitatea si selectivitatea PPL in diferite amestecuri THF-apa. Cu cantitati mici de THF (de la un raport apa:THF 100:1 la 20:1, v/v), viteza reactiei este mica (conversii de 19-29 % dupa 24 ore), dar selectivitatea creste (ee ~99 % pentru (*S*)-**3n-r**). Dupa inca 24 de ore de reactie conversia creste, dar excesul enantiomeric al produsului scade considerabil. La un continut mare al THF (apa-THF intre 15:1 si 5:1), atat viteza reactiei cat si selectivitatea ei scad. Mai mult chiar, in timpul hidrolizei enzimatice se formeaza atat acidul *cis*- cat si cel *trans*-acrilic ca si produse secundari (detectati cromatografic prin compararea timpului de retentie cu cel al produsilor utilizati ca si standard extern). Formarea produsilor secundari este datorata enantiolabilitatii si instabilitatii structurale a acizilor (*S*)-3-(fenotiazin-3-il)-3-hidroxiopropanoici ((*S*)-**3n-r**) la valori usor acide ale pH-ului (6.5-6.8). Daca in locul apei se utilizeaza solutii tampon fosfat sau Tris (cu pH cuprins intre 6 si 8 in incremente de 0.5, 20 mM), procesul de racemizare si viteza celui de descompunere au fost similare celui observat in apa. Astfel hidroliza enzimatica a *rac-1n-r* nu permite obtinerea produsilor ((*R*)-**1n-r** si (*S*)-**3n-r**) optic puri si cu randamente bune.

Acilarea enzimatica a *rac-1n-r* la scara analitica

A fost apoi studiata acilarea enzu optimizarea procesuluiimatica enantiomeraselectiva a 3-hidroxiopropanoatilor racemici *rac-1n-r* utilizand *rac-1p* ca si compus model pentru optimizarea procesului. Mai inati a fost efectuata acetilarea *rac-1p* in prezenta unor enzime in acetat de vinil pur. Majoritatea enzimelor testate cum ar fi CaL-B, lipaza din *Penicillium camemberti*, *Mucor javanicus*, lipaza F, PPL, lipaza din *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica* si *Mucor miehei* au fost inactivate. CrL, L-AK si TL IM au prezentat enantioselectivitati bune dar activitati reduse (ee > 90% pentru (*R*)-**2p**, c < 15 % dupa 5 zile). Numai lipaza A din *Candida antarctica* (CaL-A pe celita) a fost atat active cat si selective, dar performantele acestei enzyme sunt strans dependente de procedura de imobilizare utilizata. In cazul imobilizarii enzimei prin reticulare cu glutaraldehida (CLEA) sau a imobilizarii covalente pe rasini acrilice (IMM-CALA), s-au obtinut excese enantiomerice moderate ale produsului, chiar si la conversii scazute. Lipaza A din *Candida antarctica* imobilizata prin adsorbție pe celita (CaL-A) a permis obtinerea ambilor produse practic enantiopuri (ee>90%) la conversii de ~50 %.

Deoarece solventul si agentul de acilare utilizat influenteaza performantele enzimei, a fost apoi studiata acilarea *rac-1p* cu acetat de vinil in prezenta CaL-A (Tabelul 17).

Acetonitrilul si toluenul (Tabelul 17, liniile 4 si 7) sunt cei mai potriviti solvent pentru procesul de acetilare studiat (*E*= 157 si 127 la conversii de 50 si 34.5 % dupa 48 h). In *tert*-butil-metil-eter (*t*-BME) selectivitatea este moderata (linia 3), in timp ce in solvent polari ca si cloroform, diclorometan si THF catalizatorul a fost putin activ si selectiv (conversii de 4.2-11.3 % dupa 48 h, *E* = 1-9; Tabelul 17, liniile 5, 6, 8). A fost studiata si acilarea *rac-1p* mediata de CaL-A in acetonitrile dar nu s-au obtinut imbunatatiri considerabile ale performantelor fata de utilizarea acetatului de vinil.

Pe baza studiilor de optimizare efectuate pentru biotransformarea *rac-1p*, a fost realizata cu rezultate bune si acetilarea mediata de CaL-A a *rac-1n,o,q,r* in acetonitrile (liniile 1, 2, 9, 10 din Tabelul 17). Se observa o crestere a selectivitatii paralel cu cresterea catenei alchilice, de la $E = 42$ in cazul *rac-1n* la 462 in cazul *rac-1r*.

Tabelul 17. Acilarea enantioselectiva a *rac-1n-r* cu acetat de vinil si CaL-A in diferiti solventi

Nr.	1	Solvent	Timp (h)	<i>c</i> (%)	ee _{(S)-1n-r} (%)	ee _{(R)-2n-r} (%)	<i>E</i>
1	n	Acetonitril	32	53	95	83	42
2	o	Acetonitril	40	53	98	86	64
3	p	<i>t</i> -BME	48	31.9	43.6	93.2	43
4	p	Acetonitril	48	50	97	95	157
5	p	Cloroform	48	11.3	2.4	18.7	1
6	p	CH ₂ Cl ₂	48	5	4.2	79.5	9
7	p	Toluen	48	34.1	50.5	97.4	127
8	p	THF	48	4.2	2.9	67.3	2
9	q	Acetonitril	60	50	97	97	>200
10	m	Acetonitril	72	50	98	98	>200

Hidroliza enzimatica a *rac-2n-r* si (*R*)-*2n-r* la scara analitica

Pentru alcooliza enzimatica a *rac-2n-r* au fost testate un numar mare de hidrolaze disponibile comercial. Reactia la scara analitica a fost efectuata in alcooli anhidri puri, apoi in diferiti solventi (solventi halogenati, eteri, hidrocarburi saturate, ciclice si aromatice, acetonitril si dioxan) in prezenta a 5 equiv. de alcooli, la un raport masic substrat-enzima de 1:1. Toate experimentele au fost insa nesatisfacatoare (randamente <5 % dupa 2 zile).

A fost studiata mai departe hidroliza enzimatica a *rac-2p* in cativa solvent organici, folosind aceiasi strategie de optimizare. In timp ce majoritatea enzimelor au fost inactive, lipazele BCL si AK au catalizat hidroliza *rac-2p* cu enantio- si regioselectivitati bune in amestec apa-THF (20:3, v/v) ($E = 183$ si $c = 45$ % dupa 22 h cu BCL si $E = 50$, $c = 22$ % dupa 22 h cu AK) daca s-a utilizat un raport masic enzima-substrat ridicat (2:1, m/m). Gruparea carboxietilica nu a fost afectata in timpul efectuarii experimentelor de hidroliza enzimatica, nefiind posibila detectarea acizilor 3-acetoxi-3-(10-alkil-10*H*-fenotiazin-3-il)propanoici sau a acizilor 3-hidroxi-3-(10-alkil-10*H*-fenotiazin-3-il)propanoici (**3n-r**) nici macar in urme in amestecul de reactie. La rapoarte enzima-substrat mai mici se observa aparitia produsilor secundari si cresterea semnificativa a timpilor necesari pentru atingerea conversiei dorite. Hidroliza mediata de BCL a fost realizata si in cazul *rac-2n-r* ca si substrat in conditiile optime determinate anterior (Tabelul 18).

Tabelul 18. Hidroliza enantioselectiva a *rac-2p* in amestec apa-THF (20:3, v/v) cu BCL

Substrat	<i>c</i> (%)	ee _{(S)-2} (%)	ee _{(R)-1} (%)	<i>E</i>
2n	43.4	84.1	96.7	46
2o	43.5	83.6	96.3	44
2p	41.9	88.7	95.8	64
2q	40.7	82.4	95.1	95
2r	45.2	80.3	97.3	183

A fost utilizata aceeași procedură și pentru hidroliza (*R*)-3-acetoxi-3-(10-alkil-10*H*-fenotiazin-3-il)propanoatilor de etil enantiomeric îmbogățiți (*R*)-**2n-r**, sintetizați anterior, cu formarea (*R*)-etil 3-hidroxi-3-(10-metil-10*H*-fenotiazin-3-il)propanoatilor de etil (*R*)-**1n-r**. Produsii au fost izolați cu randamente bune și enantiopuritatea lor a crescut față de a compusilor utilizați ca și substrat (Tabelul 19).

Tabelul 19. Hidroliza enantioselectivă a (*R*)-**2n-r** în amestec apă-THF (20:3, v/v) cu BCL

Substrat	ee _{(S)-2n-r} (%)	Produs	Randament ^a (%)	ee _{(R)-1n-r} (%)
(<i>R</i>)- 2n	83	(<i>R</i>)- 1n	75	95
(<i>R</i>)- 2o	86	(<i>R</i>)- 1o	77	97
(<i>R</i>)- 2p	95	(<i>R</i>)- 1p	85	98
(<i>R</i>)- 2q	97	(<i>R</i>)- 1q	86	99
(<i>R</i>)- 2r	98	(<i>R</i>)- 1r	85	98

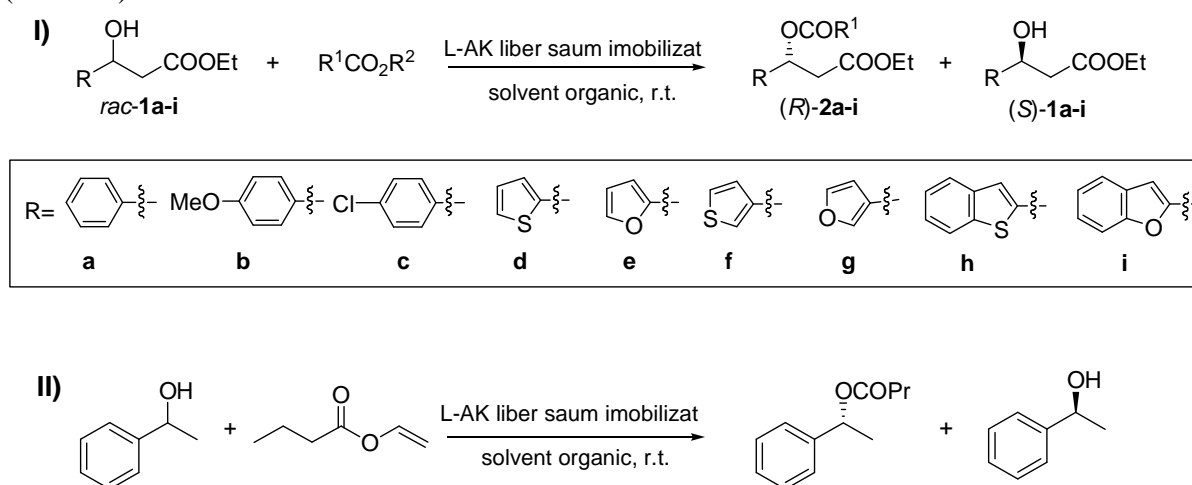
^a după 24 h

5.2.4. Cazul 4. Imobilizarea (Articol 4.)

L-AK este una din cele mai utilizate lipaze disponibile comercial; acilarea *rac*-**1a** și a *rac*-**1d-i** cu L-AK liberă prezentată anterior în literatură, a relevat o reactivitate scăzută și enantioselectivități moderate sau bune.

Imobilizarea lipazei din specii de *Pseudomonas* sp prin metode de adsorbție,²⁸ reticulare,²⁹ încapsulare sol-gel,³⁰ combinații ale acestor metode³¹ sau prin alte tehnici³² a fost descrisă detaliat. Majoritatea studiilor au fost efectuate independent cu diferite cantități de enzimă, ceea ce face imposibilă compararea acestor metode.

În această lucrare a fost studiată lipaza AK din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK) adsorbită pe Celita (diatomită) în prezența zaharozei, L-AK reticulată (CLEAs) și L-AK inclusă în sol-gel. Pudra de L-AK și preparatele imobilizate au fost caracterizate și optimizate în ceea ce privește activitatea relativă (ca măsură a stabilității pe termen scurt), reutilizării (o măsură a stabilității îndelungate) și a raportului enantiomeric *E* (ca măsură a enantioselectivității) prin utilizarea unui conținut constant de proteină (1.5 mg proteină/mL) în acilarea *rac*-**1a** utilizată ca și reacție model în solvenți organici (Schema 19). Catalizatorii preparați au fost studiați apoi în acilarea enantioselectivă a unor (hetero)aryl-β-hidroxiesteri (*rac*-**1a-i**).



Schema 19. Acilarea β-hidroxiesterilor și a 1-feniletanolului cu L-AK.

Generalati privind imobilizarea

Odata cu extinderea utilizarii lipazelor, nevoia de a le creste stabilitatea si de a le imbunatati activitatea si selectivitatea s-a accentuat. Au fost dezvoltate in acest scop mai multe metode eficiente de imobilizare, de la legarea pe support sau reticularea pana la includere in matrici polimerice organice si anorganice.

Imobilizarea lipazelor utilizeaza mai ales adsorbția, o metoda simpla, ieftina si usor de realizat. In special in solutii apoase apare insa un dezavantaj mare al acestei metode, pierderea enzimei din preparat in solutia apoasa.

Acest dezavantaj major este eliminat la imobilizarea covalenta, cand are loc fixarea covalenta in mai multe puncte pe un suport, cu sau fara grupari distante (spacer).

Dintre metodele de reticulare s-a conturat in anii 1990 tehnologia cristalelor reticulate (CLEC-cross-linked enzyme crystals) care tinde sa inlocuiasca metodele de imobilizare existente, mai scumpe. Metoda necesita o dialdehida, de obicei glutaraldehida, care permite obtinerea unor agregate enzimatic (cross-linked enzyme aggregates-CLEA) Avantajele CLEA fata de CLEC sunt datorate modului de realizare a metodei: precipitarea enzimei sub actiunea sarurilor sau a solventilor organici, fara a fi necesara purificarea ei prealabila.

Incapsularea este si ea o metoda utila in care inactivarea enzimei prin legarea ei este redusa. Utilizarea sol-gelurilor formate prin hidroliza acida sau bazica a precursorilor silanici (mai nou se utilizeaza amestecuri de tetraalcoxi- si alchiltrialcoxisilani) conduce la niste suporturi sticloase inerte cu porozitate, rezistenta termica si mecanica mare si cu o hidrofobicitate variabila, care poate fi modulata prin precursorii silanici utilizati.

Screening-ul solventilor

3-Hidroxi-3-fenilpropanoatul de etil (*rac*-**1a**) a fost ales ca si substrat model al acestui studiu pentru investigarea eficientei preparatelor enzimatic de L-AK obtinute (Schema 19). Mai intai s-a realizat acilarea sa cu acetat de vinil si L-AK libera (1.5 mg/mL proteina) in toluen, diizopropileter (DIPE) si meti-*tert*-butileter (MTBE) (Fig. 6). In timp ce in DIPE ($E = 111$) si MTBE ($E = 61$) reactia a fost mai rapida decat in toluen ($E = 135$) in acest solvent reactia a fost mai selectiva si a permis obtinerea ambilor produși ai reactiei ((*R*)-**2a** ($R^1=Me$) si substratul netransformat (*S*)-**1a**) cu excese enantiomerice de 95 % ee la conversii de 50% dupa 15 h. Pentru a minimiza sau chiar elimina hidroliza substratului esteric si a produsului de apa prezenta in enzima, s-au introdus in amestcul de reactie site moleculare (4 Å). Desi acilarea cu butanoat de vinil a fost mai selectiva decat cu acetat de vinil, studiile de optimizare s-au efectuat cu acetat de vinil pentru a obtine rezultate mai detaliate privind performantele acestora.

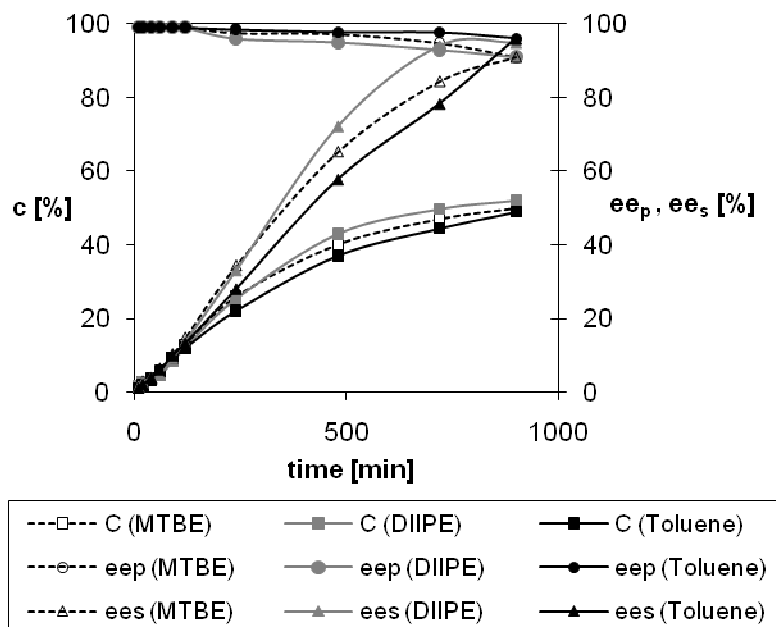


Fig. 6. Screening-ul solventului in reactia de *O*-acetilare a *rac*-**2a** (0.1 M) cu L-AK libera (25 mg/mL) si acetat de vinil in solvent organici

Imobilizarea L-AK

I.) Adsorbția pe celita.

S-a realizat adsorbția L-AK pe celita, un suport hidrofob, în prezența zaharozei, așa cum s-a prezentat anterior în literatură.¹⁴ Studiul spectroscopic al preparatelor obținute astfel arată că zaharoza îmbunătățește performanțele biocatalizatorului prin reducerea interacțiilor dintre moleculele de proteină, prevenind astfel agregarea enzimei. Pe de altă parte, zaharoza prezintă favorizează distribuția apei reziduale sau adsorbite și prin aceasta reduce afinitatea solventului pentru apă, prevenind hidroliza enzimatică a substraturilor susceptibile la hidroliza. Așa cum ne așteptăm, reacția de *O*-acilare a *rac*-**1a** cu acetat de vinil în toluen cu acest preparat enzimatic a decurs în condiții mai bune, comparativ cu L-AK liber (Tabelul 21). În plus, în acest caz nu a fost necesară prezența sitelor moleculare pentru a preveni hidroliza grupării esterice.

Tabelul 21. Activitatea relativă (x) și nd enantioselectivitatea L-AK (1.5 mg proteină/mL) în reacția de *O*-acilare a *rac*-**1a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) în toluen la temperatura camerei.

Entry	Enzyme preparation	x^a (%)	E
1	L-AK powder	100	145
2	L-AK on Celite	127	>200

^a Activitatea relativă x reprezintă $v(\text{enzima imobilizata})/v(\text{enzima libera}) \cdot 100$, unde v este viteza inițială a reacției în $\mu\text{mol} \cdot (\text{h} \cdot \text{mg lipaza})^{-1}$.

II.) CLEA.

Obținerea CLEAs se realizează în două etape, precipitarea enzimei din soluția apoasă fiind urmată de reticularea acesteia *in situ*, în general cu glutaraldehida. Pentru a favoriza adoptarea celei mai active conformații de către enzima, se pot adăuga aditivi sau coprecipitanți. S-a realizat atât precipitarea (tip A) cât și coprecipitarea (tip B), ambele tipuri de cristale fiind apoi testate în *O*-acilarea *rac*-**1a** cu acetat de vinil în toluen (Tabelul 22).

Catalizatorul tip A, obtinut prin precipitarea cu sulfat de amoniu, DME si acetone, prezinta o activitate si enantioselectivitate puternic diminuata (Tabel 22, liniile 1-5) comparativ cu enzima libera (Tabel 22, linia 1; $E = 135$ si 100% activitate relativa). In plus, reactia se opreste inainte de atingerea conversiei maxime de 50%. Activitatea enzimatica scade in acest caz si prin reducerea legaturilor azometinice cu NaBH_4 (Tabel 22, compara linia 1 cu 2 si 4 cu 5). Toate incercarile de optimizare a acestui tip de preparat enzimatic au fost lipsite de success. Probabil glutaralediha a afectat puternic enzima, care a precipitat intr-o conformatie nefavorabila. Pentru a preveni acest lucru s-a trecut la coprecipitare cu eter coroana 18C6 in DME ca solvent (Tabel 22, linia 6), dar fara rezultate. La utilizarea ca si coprecipitanti a *N*-hexadecilacetamidei (CeAmide) sau hexadecan-1-olului (CeOH) in acetona s-au obtinut preparate enzimatice (tip B) cu activitati si enantioselectivitati mult imbunatatite (liniile 7 si 8 comparativ cu 1-5). In aceste cazuri, la conversii de 50% s-au obtinut ambii produși ai rezolutiei cinetice cu excese enantiomerice ridicate

Tabelul 22. Activitatea relativa (x) si enantioselectivitatea preparatelor enzimatice in reactia de *O*-acilare a *rac*-**1a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) si L-AK CLEA (1.5 mg proteina/mL) in toluene la temperature camerei.

Nr.	Tip	Agent de precipitare	x (%)	E
1	A	sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	32	80
2	A ^a	sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26	64
3	A	DME	30	52
4	A	DME with 18-crown-6	1	- ^b
5	A	Acetone	22	67
6	A ^a	Acetone	15	81
7	B	CeAMiD	75	162
8	B	CeOH	65	160

^a dupa reducere cu NaBH_4 a legaturii azometinice; ^b nu a fost determinat, $c < 5\%$.

III.) Sol-gel.

Includerea enzimelor in matrici sol-gel prezinta cateva avantaje. Prin utilizarea unor combinatii de metiltrimetoxisilan [$\text{MeSi}(\text{OMe})_3$, MTMS] cu tetrametoxisilan [$\text{Si}(\text{OMe})_3$, TMOS] se poate genera o matrice hidrofoba capabila sa imbunatateasca activarea interfaciala si activitatea enzimei incluse. Si in acest caz s-au utilizat doua tipuri de metode, tip A si B. In metoda A (a xero-gelurilor), precursorii gelului se prepara separat in apa acidulata si metanolul format se evapora inaintea procedurii de includere in timp ce in metoda B descrisa de Reetz³⁰ polimerizarea silanilor se realizeaza *in situ* in cataliza bazica.

La acilarea *rac*-**1a** cu acetat de vinil in toluen utilizand catalizatorii preparati prin metoda A se observa activitati reduse (Tabel 23). Activitate mai mare s-a observat doar la preparatul obtinut la un raport 3.8/1 TMOS/MTMS al precursorilor (liniile 1-4). Utilizarea Ipa ca aditiv nu influenteaza activitatea enzimatica (liniile 1 si 2), in timp ce prin spalarea preparatului cu Ipa activitatea relative scade (linia 3). Adaosul de celita in solutia apoasa a enzimei inainte de incapsulare creste enantioselectivitatea (linia 4), in timp ce adaosul de L-AK pe Celita scade activitatea preparatului enzimatic (linia 5). Trebuie subliniat aici ca un raport de 1/5 [TMOS]/[MTMS], determinat anterior ca optim in cazul obtinerii silanilor in prezenta ionului de fluorura, a condus la preparate enzimatice mai putin active (liniile 6-8). Din aceste motive aceste tipuri de preparate au fost abandonate.

Tableul 23. Activitatea relativa (x) si enantioselectivitatea *O*-acilarii *rac*-**1a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) si preparat sol gel tip A de L-AK (1.5 mg proteina/mL) in toluen la temperatura acamerei.

Nr.	TMOS/MTMS (mmol/mmol)	IPA gel/spalare	Additivi/enzima	x (%)	<i>E</i>
1	3.8/1	nu/nu	nu/L-AK liofilizat	46	113
2	3.8/1	da/nu	nu/L-AK liofilizat	45	118
3	3.8/1	da/da	nu/L-AK liofilizat	17	144
4	3.8/1	nu/nu	Celita ^a /L-AK lioofilizat	35	>200
5	1/5	nu/nu	nu/L-AK liofilizat	3 ^b	>200
6	1/5	da/nu	nu/L-AK liofilizat	4 ^b	>200
7	3.8/1	nu/da	nu/AK pe Celita	7 ^b	>200
8	1/5	nu/da	nu/AK pe Celita	3 ^b	>200

^a75 mg Celita.

^b Reactia oprita inainte de 50% conversie

In metoda B fara aditivi de coprecipitare s-a obtinut un raport optima apa/gel de 9/1 (Figura 7A) si un raport de 5/1 [MTMS]/[TMOS] (Figura 7B). Reducerea activitatii la continut redus de apa poate fi explicata prin agregarea enzimei, in timp ce la un continut mai mare de apa e posibila o incapsulare partiala a enzimei, o parte din enzima fiind adsorbita simplu la suprafata gelului. Raportul optim detrmnat de 1/5 intre [TMOS]/[MTMS] indica o hidrofobicitate diferita a acestuia. Spalarea cu Ipa a acestui gel dupa incapsulare favorizeaza activitatea enzimatica, asa cum se stia deja.^{33 30}

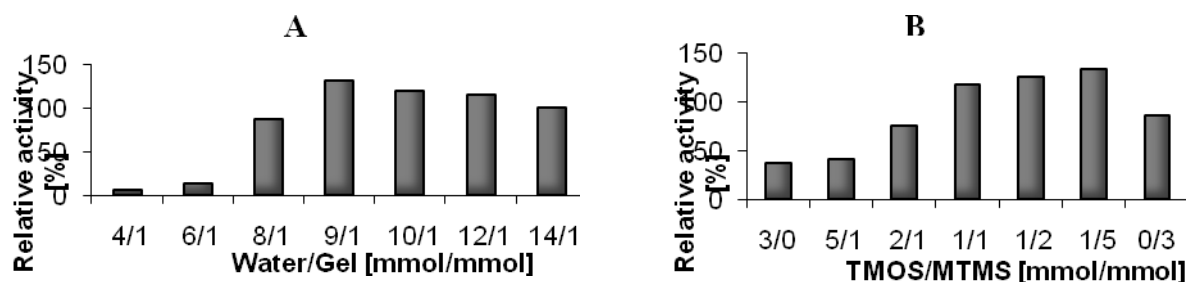


Figura 7. Efectul (A) cantitatii de apa in gel (TMOS/MTMS 1:5) si (B) raportului (TMOS/MTMS) in precursorul silanic asupra activitatii enzimatice la acilarea *rac*-**2a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) in toluen.

Pe baza rezultatelor anterioare, s-a preparat un catalizator prin metoda B, cu un raport [TMOS]/[MTMS]=1/5 si apa/gel=9/1 urmat de spalarea cu Ipa. Rezultatele din tabelul 44 arata ca in absenta aditivilor (linia 3) sau in prezenta Ipa, Celitei si zaharozei (linia 6) se obtin cele mai active si selective preparate enzimatic de acest tip. Prezenta celitei si a zaharozei in Solutia de L-AK utilizata la imobilizare (linia 6) creste activitatea enzimatica fata de utilizarea celitei singure, cand activitatea scade (linia 4), ceea ce confirma efectul pozitiv al zaharozei. Pe de alta parte, incapsularea L-AK detrmna o scadere a activitatii enzimatice (liniile 13 si 14) prin formarea unui gel eterogen. Adaosul de PEG-400 imbunatateste activitatea (linia 2), in timp ce adaosul de zaharoza si celita impreuna cu PEG-400 o scad (liniile 9 si 10) si influenteaza negativ si enantioselectivitatea. Sol-gelul preparat fara aditivi (activitate relativa 134 si *E*>200, linia 3) si in prezenta celitei si a zaharozei (activitate relativa 122 si *E*>200, linia 6), au fost selectate si utilizate in testele ulterioare.

Tabelul 24. Activitatea relativa (x) si enantioselectivitatea O -acilarii *rac*-**1a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) si preparate enzimatic (Tip B; TMOS/MTMS 1:5; 1.5 mg proteina/mL) fara aditivi in toluen (1 mL) la temperatura camerei.

Nr	IPA in gel ^a /spalare	Aditivi/tip de enzima	x (%)	E
1	da/da	nu/ L-AK liber	97	>200
2	da/da	PEG 400/ L-AK liber	110	165
3	nu/da	nu/ L-AK liber	134	>200
4	nu/da	Celita ^b / L-AK liber	44	97
5	da/da	Celita ^b / L-AK liber	52	150
6	da/da	Celita ^b , zaharoza ^c / L-AK liber	122	>200
7	da/da	metil- β -CD ^d / L-AK liber	36	63
8	da/da	KCl ^e / L-AK powder	19	41
9	da/da	PEG 400, zaharoza ^c / L-AK liber	47	160
10	da/da	PEG 400, zaharoza ^c , Celita ^b / L-AK liber	55	130
11	da/nu	PEG 400, zaharoza ^c , Celita ^b / L-AK liber	25	162
12	da/da	hexadecil amina ^f / L-AK liber	28	45
13	nu/da	hexadecil amina ^f / L-AK liber	56	134
14	da/da	nu/AK pe Celita	26	>200
15	nu/da	nu/AK pe Celita	25	>200

^a 100 μ L; ^b 50 mg; ^c 100 mg; ^d 100 mg; ^e 2 mmol; ^f 20 mg.

Reutilizarea enzimelor imobilizate

Reutilizarea este unul din cele mai importante aspecte pentru un preparat enzimatic imobilizat. Testarea capacitatii de recirculare a celor mai bune preparate enzimatic obtinute [L-AK pe Celita (Tabelul 21, linia 2), L-AK CLEA (L-AK precipitat cu acetona/CeAMiD, Tabelul 22, linia 7), L-AK sol-gel tip B fara aditivi (Tabelul 24, linia 3) si a celui preparat in prezenta zaharozei si a celitei (Tabelul 24, linia 6)] impreuna cu enzima L-AK libera s-a realizat pentru reactia de acilare a *rac*-**1a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) in toluene la un continut constand de proteina (1.5 mg /mL). Reactia s-a repetat de maxim 10 ori cu acelasi preparat enzimatic. In fiecare situatie s-a perfectat procesul pana la atingerea conversiei de 50% sau pana cand activitatea a disparut complet. Intre 2 cicluri, catalizatorul a fost spalat cu toluen uscat si apoi utilizat ca atare, fara uscare. Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tabelul 25 (selectivitatea) si Figura 8 (activitatea relativa). L-AK libera sau adsorbita pe celita si-au pierdut activitatea complet dupa 3, respective 4 cicluri de utilizare. Preparatele CLEA au prezentat o oarecare scadere a activitatii enzimatic si a enantioselectivitatii ($E = 162$ in primul cilcu si 100 dupa 10 utilizari). Pe de alta parte, toate preparatul sol-gel au dovedit proprietati excelente. Activitatea relativa dupa 10 utilizari a ramas la 85-87% (fata de 134 % initial) in cazul absentei aditivilor, respectiv 90-92% (fata de 122 % initial) cand s-au utilizat aditivi. In acelasi timp, enantioselectivitatea nu s-a modificat la reutilizare, ceea ce permite obtinerea enantiomerilor (*S*)-**1a** si (*R*)-**2a** cu puritate enantiomeric mare ($ee > 95\%$) chiar si la a zecea reutilizare.

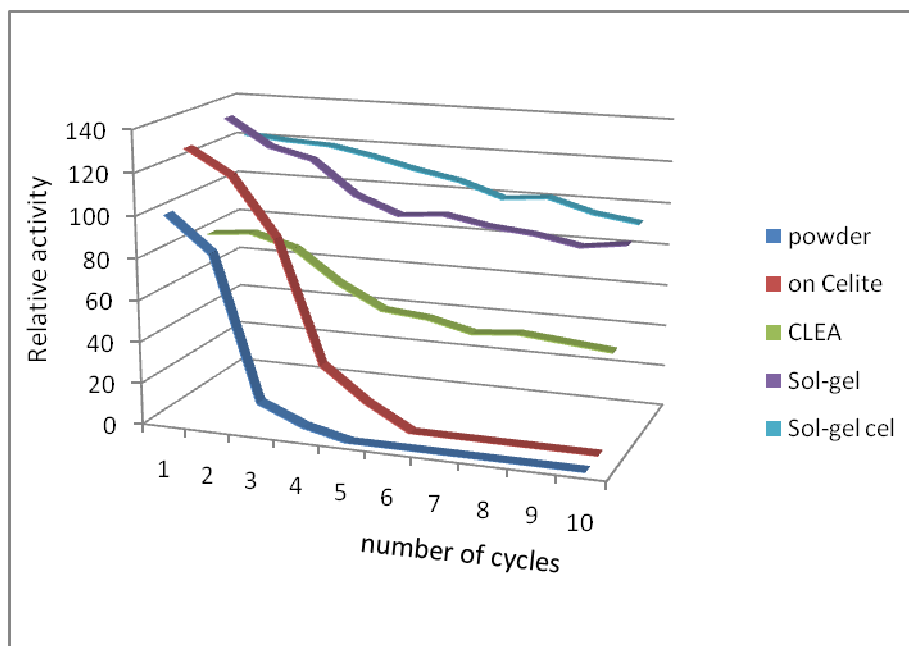


Figure 8. Reutilizarea preparatelor de L- AK (activitatea relativa)

Tabelul 25. Reutilizarea preparatelor de L- AK (1.5 mg proteina/mL) in *O*-acilarea *rac*-**1a** (0.1 M) cu acetat de vinil (0.2 M) in toluen (1 mL) la temperatura camerei.

L-AK	Cycle 1					Cycle 10				
	liber	pe celita	CLEA	Sol-gel ^b	Sol-gel ^c	liber ^a	pe celita ^a	CLEA	Sol-gel ^b	Sol-gel ^c
Timp [h]	15	12	20	12	10	-	-	45	15	12
<i>c</i> [%]	50	50	47	50	49	-	-	35	50	50
ee ^(S) - 2a	95	99	87	96	95	-	-	54	97	98
ee ^(R) - 3a	95	95	96	95	99	-	-	96	96	97
<i>E</i>	135	>200	162	>200	>200	-	-	100	>200	>200

^a inactiv

^b L-AK sol-gel tip B (TMOS/MTMS=1/5; apa/gel 9/1) incapsularea L-AK din solutie apoasa.

^c L-AK sol-gel tip B (TMOS/MTMS=1/5; apa/gel 9/1) incapsularea L-AK din solutie apoasa, Ipa, Celita si zaharoza.

***O*-Acilarea *rac*-**2a-j** cu enzime imobilizate**

Studiul de imobilizare efectuat a condus la doua tipuri de preparate enzimatice noi, L-AK CLEA si sol-gel L-AK, care au fost testati pentru acilarea *rac*-**1a-i** si a 1-feniletanolului (0.1 M) cu butanoat de vinil (mai selectiv decat acetatul) in toluen. Rezultatele obtinute (Tabelul 26) indica fara dubii ca aceste doua preparate pot fi utilizate cu success in *O*-acilarea 3-aryl-3-hidroxiopropanoatilor. Referitor la activitatea enzimatica, ele sunt in general mai active; acilarea *rac*-**1h** si **1i** cu adsorbit pe Celita si a *rac*-**1a-c** cu CLEA L-AK reprezinta exceptii. Imbunatatiri considerabile ale activitatii enzimatice si o interesanta *R*-enantioselectivitate s-a observat la acilarea substraturilor heteroaromatice *rac*-**1d-g**, cand L-AK libera a fost inlocuita de L-AK adsorbita pe Celita (coloana 4) sau L-AK sol-gel preparat din solutia apoasa de L-AK, IPA, Celita si zaharoza (coloana 7, liniile 5-8). Rezultatele din Tabelul 26 si cele referitoare la reutilizare arata ca preparatul imobilizat de L-AK sol-gel este cel mai eficient in procesul studiat si corespunde scopului propus. Probabil ca celita si zaharoza ajuta la leagarea apei esentiale in functionarea enzimei, iar glucidul actioneaza si ca agent lipoprotector, prevenind agregarea proteinei si modificarea semnificativa a conformatiei sale.³⁴

Tabelul 26. Activitatea relativa (x%) si enantioselectivitatea enzimei in *O*-acilarre (hetero)aril- β -hidroxiesterilor **1a-i** (0.05 M) si a 1-feniletanolului (**Ph-OH**; 0.4 M) cu butanoat de vinil (2 eq.) si L-AK (1.5 mg proteina/mL) in toluela temperatura camerei.

Nr	Substrat	L-AK liber (x/E)	L-AK rpeCelita (x/E)	L-AK CLEA ^a (x/E)	L-AK sol-gel ^b (x/E)	L-AK sol-gel ^c (x/E)
1	1a^d	100/135	127/>200	81/>200	134/>200	122/>200
2	1a	100/>200	135/>200	72/>200	138/>200	125/>200
3	1b	100/>200	135/>200	72/>200	138/>200	125/>200
4	1c	100/>200	132/>200	76/>200	128/>200	118/>200
5	1d	100/68	192/137	118/54	92/55	181/130
6	1e	100/81	198/187	122/63	96/74	190/184
7	1f	100/57	155/106	116/52	107/63	144/112
8	1g	100/66	163/126	121/42	110/68	141/108
9	1h	100/>200	91/>200	121/>200	124/>200	116/>200
10	1i	100/>200	87/>200	128/>200	127/>200	110/>200
11	Ph-OH	100/>200	194/>200	137/>200	139/167	166/>200

^a L-AK precipitat cu acetona/CeAMiD.

^b sol-gel L-AK Tip B (TMOS/MTMS=1/5; apa/gel 9/1) din solutie apoasa a L-AK; gelul spalat cu IPA.

^c sol-gel L-AK Tip B (TMOS/MTMS=1/5; apa/gel 9/1) din solutie apoasa a L-AK; gel., IPA, Celita si zaharoza

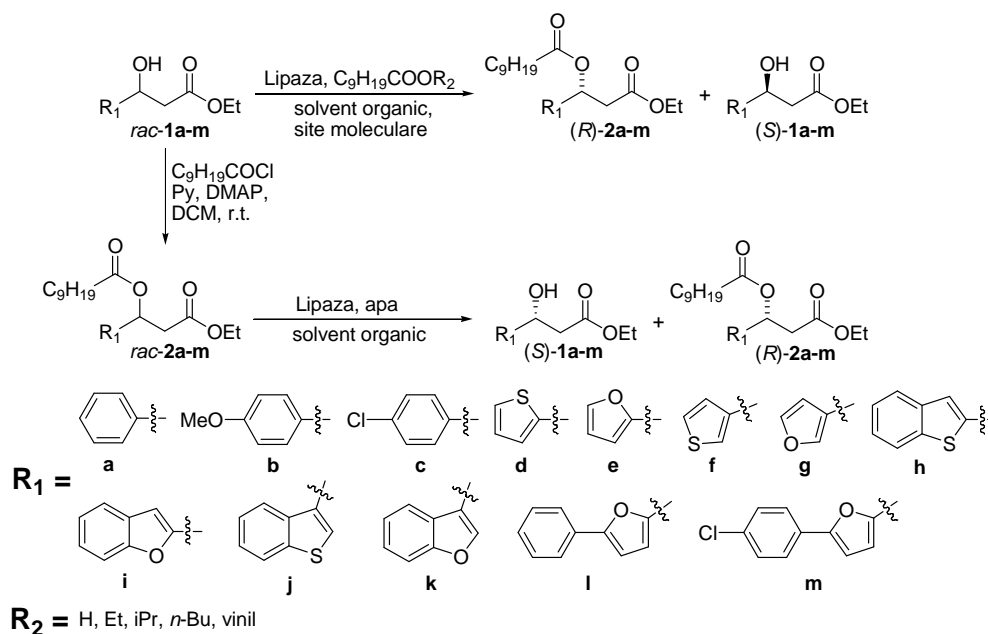
^d Cu acetat de vilil

5.2.5. Cazul 5. Acizii grasi (Articol 5)

Aceasta parte a studiului a urmarit de asemenea *O*-acilarea enantioselectiva mediata de lipaze versus hidroliza selectiva sub actiunea lipazelor, in scopul obtinerii ambilor enantiomeri ai unor β -hidroxiesteri si a diesterilor acestora *O*-acilati (Schema 7).

Optimizarea reactiilor enzimatice

Deoarece hidroliza enzimatica a β -hidroxiesterilor decurge in general cu stereoselectivitate moderata, a fost mai intai studiata rezolutia cinetica a acestora prin *O*-acilare enzimatica.



Schema 7. Rezolutia cinetica a β -hidroxiesterilor racemici *rac-1a-m* si a diesterilor acestora *rac-2a-m*

Rezolutia cinetica cu lipaze prinn *O*-acilare

Screening-ul biocatalizatorului si a solventului; efectul apei

Pentru elaborarea unei proceduri generale de rezolutie enzimatica cinetica a diferitelor β -hidroxiesteri aromatici *rac-1a-m*, a fost mai intai testata reactia de *O*-acilare stereoselectiva cu lipaze a 3-hidroxi-3-fenilpropanoatului de etil *rac-1a*. Au fost utilizate mai multe lipaze disponibile comercial (cate 25 mg/mL) in reactia de *O*-acilare a *rac-1a* (0.025 M) cu acid decanoic ca donor de acil (0.1 M) in diferiti solventi organici la temperatura camerei. Lipazele A si B din *Candida antarctica* (CaL-A si CaL-B), libere si immobilizate, lipaza din *Burkholderia cepacia* (anterior *Pseudomonas cepacia*; LPS), lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (LAK) si din *Candida rugosa* (CrL), au fost testate in diferiti solventi organici anhidri. Pentru a elimina chiar si urmele de apa, care ar putea determina reactii de hidroliza neselectiva, in amestecul de reactie s-au introdus site moleculare.

LAK, LPS si CaL-B au dat rezultate nesatisfacatoare in acilarea *rac-1a* indiferent de solvent; acidul 3-hidroxi-3-fenilpropanoic format prin hidroliza gruparii esterice a fost produsul obtinut majoritar. In reactia martor, realizata in absenta agentului de acilare, s-a observat de asemenea hidroliza cantitativa a gruparii esterice cu toate cele trei lipaze enumerate. Probabil continutul ridicat in apa al acestor enzime face imposibila utilizarea lor in procesul de rezolutie studiat.

Aceeasi reactie martor arata ca atat CaL-A cat si CrL nu prezinta activitate hidrolitica, de aceea ele sunt biocatalizatori potentiali utili, rezultatele obtinute la utilizarea *rac-1a* ca substrat fiind prezentate in Tabelul 27. Dintre toti solventii investigati, cele mai bune rezultate s-au obtinut in *n*-octan cu CrL (AYS Amano) (linia 7), alese din aceste motive pentru studiile ulterioare.

Tabelul 27. Screening-ul lipazei (25 mg/mL) si solventului (1 mL) pentru *O*-acilarea *rac-1a* (0,025 M) cu acid decanoic (0,1 M) la temperatura camerei dupa 15h

Nr.	Lipaza	Solvent	<i>c</i> (%)	ee _{(R)-2a} (%)	ee _{(S)-1a} (%)	<i>E</i>
1	CaL-A pe Celita	DIPE	27.7	8.6	3.3	1.2
2	CaL-A pe Celita	Toluen	21.3	12.6	3.4	1.3
3	CaL-A pe Celita	<i>n</i> -Octan	19.7	12.6	3.1	1.3
4	CrL (libera, Tip VII.)	DIPE	4.3	82.7	3.7	11
5	CrL (libera, Tip VII.)	Toluen	6.9	85.5	6.3	13
6	CrL (libera, Tip VII.)	<i>n</i> -Octan	15.8	97.9	18.4	113
7	CrL (libera, AYS Amano) ^a	<i>n</i> -Octan	17.0	98.5	20.2	161
8	CrL (imob., T2-150)	<i>n</i> -Octan	6.0	97.8	6.2	95

^a Abreviata in continuare ca CrL

Efectul donorului gruparii acil

Deprotectarea regio- si enantiomeraselectiva rapida, catalizata de lipaze, ar putea fi o metoda utila de realizare a rezolutiei cinetice a β -hidroxiesterilor. In acest scop, o grupare *O*-acil cu catena lunga ar fi eficienta deoarece lipazele actioneaza in natura asupra unor asemenea tipuri de substraturi. Dintre acizii geasi testati (decanoic, lauric si stearic), CrL a fost activa doar in prezenta acidului decanoic.

Natura donorului de acil a fost apoi testata in *n*-octan prin utilizarea decanoatului de etil, izopropil si butil (Tabelul 28). In ciuda stereoselectivitatii bune, datorita activitatii reduse a CrL AYS Amano (liniile 2-4), a fost utilizat in continuare decanoatul de vinil, un donor

ireversibil care determina o scadere usoara a stereoselectivitatii, dar o activitate imbunatatita (linia 5).

Tabulul 28. Influenta donorului de grupare acil (0.1 M) asupra stereoselectivitatii CrL (25 mg/mL) in *O*-acilarea *rac-1a* (0.1M) in *n*-octan la temperatura camerei dupa 15h

Nr.	Donor acil	<i>c</i> (%)	ee _{(R)-2a} (%)	ee _{(S)-1a} (%)	<i>E</i>
1	Acid decanoic	17.0	98.5	20.2	161
2	Decanoat de etil	4.0	98.6	4.1	148
3	Decanoat de izopropil	6.1	>99	6.4	>200
4	Decanoat de butil	2.0	>99	2.1	>200
5	Decanoat de vinil	44.8	97.2	78.9	170

Efectul temperaturii

Au fost studiate si performantele CrL in reactia de acilare a *rac-1a* cu decanoat de vinil in *n*-octan in functie de temperatura (Tabelul 29). In timp ce selectivitatea creste odata cu temperatura, s-a observat o scadere ireversibila a activitatii CrL datorita inactivarii termice a acesteia. Retestarea unui preparat enzimatic deja utilizat (la 45 °C) in aceeaasi reactie, s-a observat o conversie foarte redusa (*c* < 5%). Deoarece CrL tratat termic si el netratat prezinta enantiomeselectivitati similare (*E* ~165 si respectiv *E* =170), presupunem ca imbunatatirea selectivitatii cu temperatura (*E* »200) este datorata unui comportament intrinsec al enzimei. Considerand ambii parametri, atat activitatea cat si selectivitatea enzimei, temperatura optima determinata pentru acilarea *rac-1a* este de 25 °C.

Tabulul 29. Influenta teperaturii asupra selectivitatii si activitatii CrL (25 mg/mL) in reactia selectiva de *O*-acilare a *rac-1a* (0.025 M) cu decanoat de vinil (0.1 M) in *n*-octan dupa 15h

Nr.	<i>t</i> (°C)	<i>c</i> (%)	ee _{(R)-2a} (%)	ee _{(S)-1a} (%)	<i>E</i>
1	15	36.7	95.8	55.6	82
2	25	44.8	97.2	78.9	170
3	35	32.9	>99	48.5	>200
4	45	10.9	>99	12.2	»200

O-acilarea region- si enantiomeselectiva a β-hidroxiesterilor aromatic racemici *rac-1a-m*

Investigarea comportamentului biocatalitic al CrL in rezolutiile cinetice prin *O*-acilarea *rac-1b-m* a fost efectuata in conditiile optime determinate anterior pentru *rac-1a* (Tabelul 30). In aproape toate cazurile reactia decurge cu activitati si selectivitati bune, totusi s-a observat o dependenta stransa a acestor parametri de natura inelului aromatic al substraturilor *rac-1b-m*. Performantele procesului de acilare depind de mai multi factori cum ar fi marimea si distributia sarcinii entitatii aromatice si de natura liniara sau ramificata a substratului. In general, substituentii mici si polari influenteaza negativ atat activitatea cat si selectivitatea (liniile 2 si 6). In timp ce cresterea volumului substituentului linear este tolerata si chiar benefica (liniile 1, 7, 8), substraturile voluminoase si ramificate sunt mai putin tolerate de enzima, procesul decurge cu viteze si selectivitati mai reduse (liniile 9, 10). Inelul fenilfuranic, usor ramificat dar polarizat este acilat cu viteze si selectivitati moderate (linia 11). Interesant, extinderea acestui substrat [in 5-(4-clorofenil)furan-2-il- derivat] conduce la

un substrat excelent, *rac-1m* (linia 12). Un alt efect important ce influenteaza viteza procesului de acilare este solubilitatea redusa a substratului, in special in cazul benzo[*b*]tiofen-3-il-hidroxiypropanoatului *rac-1j*.

Tabelul 30. *O*-Acilarea selectiva a unor β -hidroxi esterii aromatici *rac-1b-m* (0.025 M) cu CrL (25 in *n*-octan la temperatura camerei dupa 15 h

Nr.	Substrat	<i>c</i> (%)	ee _{(R)-2a} (%)	ee _{(S)-1a} (%)	<i>E</i>
1	<i>rac-1b</i>	49.7	98.3	97.2	>200
2	<i>rac-1c</i>	22.0	98.5	27.8	174
3	<i>rac-1d</i>	52.0	92.1	>99	182
4	<i>rac-1e</i>	50.7	87.3	89.9	45
5	<i>rac-1f</i>	51.6	91.1	97.1	91
6	<i>rac-1g</i>	35.2	94.7	51.5	61
7	<i>rac-1h</i>	47.8	97.2	89.1	>200
8	<i>rac-1i</i>	41.9	>99	72.1	»200
9	<i>rac-1j</i>	20.3	87.7	22.3	19
10	<i>rac-1k</i>	21.9	97.5	27.4	103
11	<i>rac-1l</i>	40.7	96.6	66.2	115
12	<i>rac-1m</i>	51.7	93.3	>99	»200

Hidroliza regio- si enantioselectiva catalizata de lipaze

Asa cum se stie, lipazele isi pastreaza preferinta enantiomerica si pentru hidroliza sau alcooliza. In consecinta, prin efectuarea reactiei inverse este posibila obtinerea ambelor forme enantiomerice atat ale alcoolului cat si ale esterului. S-a aratat deja ca CrL este selectiva in hidroliza unei game variate de β -hidroxi- β -arilpropanoati aromatici.³⁵ In continuare ea a fost testata si pentru hidroliza esterilor decanoici *rac-2a-m*.

Screening-ul solventului pentru hidroliza regio- and enantioselectiva catalizata de lipaze

Pentru a determina conditiile optime ale procesului de hidroliza au fost determinate mai intai conditiile procesului de hidroliza a diesterului racemic *rac-2a* (0.025 M) in diferiti solventi organici. In solventii miscibili cu apa (acetonitril, THF) si cei polari cu hidrosolubilitate mare (DCM) care contin apa (10 μ L/mL) rezultatele obtinute nu au fost cele optime. Cei mai eficienti s-au dovedit a fi solventii nepolari saturati cu apa (Tabelul 31). In *n*-octan sau toluen (Tabelul 31, liniile 3, 4) activitatea si selectivitatea enzimei a fost mai redusa decat in cazul celor obtinute in eteri (Tabel 31, liniile 1, 2). DIPE a fost selectat datorita solubilitatii superioare a substraturilor testate in acest solvent.

Tabel 31. Screening-ul solventilor la hidroliza diesterilor racemici, *rac-2a* (0.025M) in prezenta CrL (25 mg/mL) la temperatura camerei dupa 15 h

Nr.	Solvent	<i>c</i> (%)	ee _{(R)-1a} (%)	ee _{(S)-2a} (%)	<i>E</i>
1	DIPE	17.2	98.8	20.5	>200
2	MTBE	16.4	98.6	19.4	171
3	Toluen	4.3	>99	4.5	»200
4	<i>n</i> -Octan	12.8	99.1	14.6	>200

Hidroliza selectiva a diesterilor aromatici *rac-2a-m*

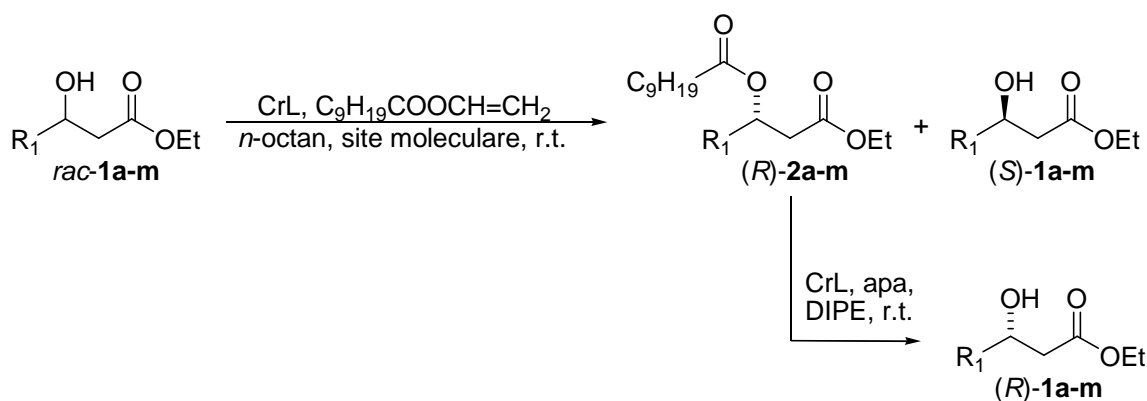
A fost efectuata hidroliza catalizata de CrL a urmatoarelor substraturi:*rac-2b-m* (Tabelul 32) in conditiile optime determinate in cazul *rac-2a* (Tabel 31, linia 1). Important de semnalat, nu s-au identificat produse secundare de hidroliza a gruparii etoxicarbonilice in ici un caz. Diesterul hidrofob fenil-furanic *rac-2l* a fost hidrolizat cu selectivitate foarte mare

(Tabel 32, linia 11), superioara celei gasite la *O*-acilarea alcoolului corespunzator *rac*-**2l** (Tabel 30, linia 11). In toate celelalte cazuri selectivitatile au fost inferioare celor obtinute la *O*-acilarea selectiva. Efectele substituentilor in cazul hidrolizei au fost aproape opuse celor de la *O*-acilare. Derivatul metoxilat *rac*-**2b** (Tabea 32, linia 1) a dat cele mai reduse selectivitati, chiar comparative cu derivatul clorurat, cu efect electornatragator puternic (Tabel 32, liniile 2 si 12). Rezolutia cinetica a diesterilor heterociclici care contin *O*- sau *S*, *rac*-**2b-k**, indica faptul ca cel mai mare impact asupra enantiomerelectivitatii hidrolizei il are caracterul aromatic (Tabel 32, liniile 3-10).

Tabel 6. Hidroliza region- si enantiomerelectiva mediata de CrL (25 mg/mL) a unor diesteri, *rac*-**2b-m** (0,025 M) in DIPE la temperatura camerei dupa 15 h

Nr.	Substrat	<i>c</i> (%)	ee _{(R)-1} (%)	ee _{(S)-2} (%)	<i>E</i>
1	<i>rac</i> - 2b	42.8	90.6	67.8	41
2	<i>rac</i> - 2c	44.9	97.3	79.3	178
3	<i>rac</i> - 2d	51.7	91.5	97.8	101
4	<i>rac</i> - 2e	53.1	86.9	98.5	69
5	<i>rac</i> - 2f	50.3	86.1	87.1	38
6	<i>rac</i> - 2g	57.0	59.0	78.2	9
7	<i>rac</i> - 2h	51.6	91.8	97.8	105
8	<i>rac</i> - 2i	51.0	92.5	96.2	102
9	<i>rac</i> - 2j	23.3	96	29.2	65
10	<i>rac</i> - 2k	26.7	97.5	35.6	112
11	<i>rac</i> - 2l	51.1	95.3	99.6	>200
12	<i>rac</i> - 2m	44.9	95.7	77.9	108

Sinteza ambilor enantiomeri ai **1a-m** prin reactii catalizate de CrL



Scheme 8. Rezolutia cinetica secventiala pentru rezolvarea β -hidroxiesterilor aromatici *rac*-**1a-m**

In timp ce la scara analitica s-a utilizat o concentratie relativ mare a enzimei (25 mg/mL), in prima etapa a sintezei preparative au fost testate concentratii mai reduse (de la 25 mg/mL la 5 mg/mL). Concentratia optima determinata a fost de 10 mg/mL, cand timpii de reactie si selectivitatea au fost similare celor obtinute la scara analitica. Procesul de rezolutie cinetica secventiala elaborat conduce la ambii enantiomeri ai β -hidroxiesterilor aromatici, (*R*)- si (*S*)-**1a-m** (Tabelul 32). Mai intai se realizeaza *O*-acilarea pana la conversii de circa 50%, cu formarea (*S*)-**1a-m** cu excese enantiomerice si randamente ridicate. In etapa urmatoare, esterii *O*-acilati (*R*)-**2a-m** cu puritate optica buna sunt hidrolizati sub actiunea CrL cu formarea

enantiomerului (*R*) al esterilor (*R*)-**1a-m** cu puritate optica ridicata. Configuratia absoluta a (*R*)- si (*S*)-**1a-k** a fost determinata prin compararea sensului de rotire a luminii plan polarizate cu datele din literatura. Configuratia absoluta a produsilor nou sintetizati (*R*)- si (*S*)-**1l-m** a fost determinata prin utilizarea regulii lui Kazlauskas.

Tabelul 32. Sinteza la scara preparativa a ambilor enantiomeri ai β -hidroxiesterilor (*R*)- si (*S*)-**1a-m**

Substrat	Produsii de acilare				Produsii de hidroliza	
	<i>(S)</i> - 1a-m		<i>(R)</i> - 2a-m		<i>(R)</i> - 1a-m	
	η^a (%)	ee (%)	η^a (%)	ee (%)	η^a (%)	ee (%)
<i>rac</i> - 1a	46	>99	49	90.0	45	>99
<i>rac</i> - 1b	47	>99	49	98.1	46	>99
<i>rac</i> - 1c	45	>99	48	90.6	44	>99
<i>rac</i> - 1d	46	>99	49	90.3	44	>99
<i>rac</i> - 1e	41	>99	45	71.9	37	>99
<i>rac</i> - 1f	44	>99	48	83.2	42	>99
<i>rac</i> - 1g	43	>99	47	77.5	35	81.2
<i>rac</i> - 1h	49	>99	48	89.5	43	>99
<i>rac</i> - 1i	48	>99	49	>99	47	>99
<i>rac</i> - 1j	38	65.9	42	76.6	35	>99
<i>rac</i> - 1k	44	>99	46	85.4	42	>99
<i>rac</i> - 1l	43	>99	45	81.7	41	>99
<i>rac</i> - 1m	48	>99	48	>99	47	>99

^a Randamentul de izolare raportat la compusii de start *rac*-**1a-m**

6. Concluzii generale

In concluzie, au fost testate si comparate metodele de acilare si hidroliza selectiva pentru aceleasi tipuri de substrat, acilarea selectiva fiind superioara hidrolizei.

Pe aceasta baza au fost realizate noi metodologii de obtinere a β -hidroxiacizilor si esterilor in forma optic pura prin utilizarea acilarii selective.

A fost descrisa pentru prima data selectivitatea inversa a **doua enzime** utilizate uzual in acilarea selectiva, **CaL-A/B**, in cazul β -hidroxiesterilor.

A fost realizata cu success o metoda de imobilizare a β -hidroxiesterilor “**tailor made**” pentru *O*-acilarea selectiva.

A fost elaborata o metodologie generala noua de acilare selectiva cu lipaze a diferitilor β -hidroxiesteri aromatici utilizand esteri ai acizilor grasi ca donori de acil.

7. Lista completa a publicatiilor

I. Articole publicate în reviste de specialitate de circulație internațională recunoscute, din țară și din străinătate

1. M.I. Toșa, J. Brem, F.D. Irimie, C. Paizs, J. Rétey: Enantioselective Synthesis of L- and D-Nitrophenylalanines Catalyzed by Mutant (MIO-less) Phenylalanine Ammonia-Lyase, *Chemistry A European Journal* 2011 (submitted manuscript)
2. J. Brem, M. Naghi, M.I. Toșa, L. Poppe, F.D. Irimie, P. Csaba, *Lipase mediated sequential resolution of aromatic β -hydroxy esters using fatty acid derivatives*, *Tetrahedron: Asymmetry* 2011, article accepted
3. J. Brem, M.C. Turcu, C. Paizs, K. Lundell, M.I. Toșa, F.D. Irimie, L.T. Kanerva, *Immobilization to improve the properties of Pseudomonas fluorescens lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters*, *Process Biochemistry* 2011 (submitted manuscript)
4. J. Brem, S. Pilbák, C. Paizs, G. Bánóczy, F.D. Irimie, M.I. Toșa, L. Poppe, *Lipases-catalyzed kinetic resolution of racemic 1-(10-ethyl-10H-phenothiazin-1,2, and 4-yl)ethanols and their acetates*, *Tetrahedron: Asymmetry* 2011, 22, 916-923.
5. C. Paizs, M.I. Toșa, L.C. Bencze, J. Brem, F.D. Irimie, J. Rétey, *2-Amino-3-(5-phenylfuran-2-yl) Propionic Acids and 5-Phenylfuran-2-yl Acrylic Acids are Novel Substrates of Phenylalanine Ammonia-Lyase*, *Heterocycles* 2011, 82, 1217-1228
6. J. Brem, A. Liljeblad, C. Paizs, M.I. Toșa, F.D. Irimie, L.T. Kanerva *Lipases A and B from Candida antarctica in the enantioselective acylation of ethyl 3-heteroaryl-3-hydroxypropanoates: aspects on preparation and enantiopreference*, *Tetrahedron: Asymmetry* 2011, 22, 315-322
7. J. Brem, M.I. Toșa, C. Paizs, A. Munceanu, D. Matković-Čalogović, F.D. Irimie, *Lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic 1-(10-alkyl-10H-phenothiazin-3-yl)ethanols and their butanoates*, *Tetrahedron: Asymmetry* 2010, 21, 1993-1998
8. J. Brem, M.I. Toșa, C. Paizs, E. Vass, F.D. Irimie, *Enzyme-catalysed synthesis of (R)- and (S)-3-hydroxy-3-(10-alkyl-10H-phenothiazin-3-yl)propionic acids*, *Tetrahedron: Asymmetry* 2010, 21, 365-373
9. S. Dalia, I. Lingvay, Sz. Lanyi, D.D. Micu, C.L. Popescu, J. Brem, L.C. Bencze, C. Paizs, *The efec of electromagnetic fields in baker's yeast population dynamics, biocatalytic activity an selectivity*, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia* 2009, 4 (II), 195-201
10. J. Brem, C. Paizs, M.I. Toșa, E. Vass, F.D. Irimie, *Enzyme-catalysed synthesis of (R)- and (S)-3-heteroaryl-3-hydroxypropanoic acids and their derivatives*, *Tetrahedron: Asymmetry* 2009, 20, 489-496

II. Articole publicate în volumelor unor manifestări științifice internaționale recunoscute, din țara și din străinătate

1. D. Hapau, J. Brem, F.D. Irimie, V. Zaharia, *Chemoenzymatic synthesis of new optically pure thiazolic derivatives*, 8th International Conference „Students for students, 7-10 April 2011, Cluj Napoca, Romania
2. M. Lăcătuș, M. Naghi, B. Nagy, J. Brem, Florin-Dan Irimie, *Biocatalytic synthesis of various optically active (hetero)aryl- β -hydroxy-propanoic acid derivatives*, 8th International Conference „Students for students, 7-10 April 2011, Cluj Napoca, Romania
3. A. Varga, B. Nagy, C. Paizs, J. Brem, *Optikailag aktiv (hetero)aril β -hidroxi-propionsav származékok biokatalitikus szintézise*, 14th Transsylvanian Students Scientific Conference, 13-15 mai 2011, Cluj-Napoca, Romania
4. D. Hapau, J. Brem, V. Zaharia F.D. Irimie, *Enzymatic synthesis of new optically pure thiazolic derivatives*, The XIVth National Congress of Pharmacy from Romania, 13-16 october 13-16 2010, Targu-Mures, Romania
5. J. Brem, C. Paizs, M.I. Tosa, F.D. Irimie, *Biocatalitic synthesis of optically active heteroaryl- β -hydroxy-propionic acid derivatives*, 11th Central an Eastern European NMR Symposium, 4-6 october 2010, Cluj-Napoca, Romania
6. J. Brem, L.C. Bencze, C. Paizs, M.I. Tosa, F.D. Irimie, *Synthesis and enantiomeric excess analysis with NMR of optically active 3-substituted-10-ethyl-10-phenothiazine-5-xides*, 10th International Symposium and Summer Schol on Bioanalysis, 7-14 iuly, 2010, Zagreb, Croatia

Literatura

- ¹ Kanerva, L.T.; Liljeblad, A. *Encyclopedia of Catalysis. Transesterification-Biological*. **2010**, 1-25.
- ² Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 453-468.
- ³ a) Matute, B. M.; Bäckvall, J. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 226-232; Kim, M. J.; Ahm, Y.; Park, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 13, 578-587; Pellissier H. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 1563-1601
- ⁴ a) Patel, R. N. *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker, New York-Basel, **2000**; b) Ren, Q.; Ruth, K.; Thöny-Meyer, L.; Zinn, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 41-52.
- ⁵ Robertson, D. W.; Wong, D. T.; Krushinski, J. H. US Patent 4.956.388, **1990**.
- ⁶ a) Müller, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 362–365.
- ⁷ Dedem, R.; Michaelis, L.; Fuentes, D.; Yawer, M.A.; Hussain, I.; Fischer, C.; Langer, P. *Tetrahedron* **2007**, 63, 12547-12561.
- ⁸ Yin, J.; Yang, X.B.; Chen, Z.X.; Zhang, Y.H. *Chinese Chemical Letters* **2005**, 16, 1448-1450.
Jian YIN, Xiao Bo YANG, Zai Xin CHEN, Yi Hua ZHANG
- ⁹ Huang, H.; Pan, X.; Tan, N.; Zeng, G.; Ji, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 365–372.
- ¹⁰ a) Bush, K.; Macielag, M.; Weidner-Wells, M. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, 7, 466–476; b) Kobayashi, R.; Konomi, M.; Hasegawa, K.; Morozumi, M.; Sunakawa, K.; Ubukata, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 889–894; c) Dahloff, A.; Janjic, N.; Echols, R. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 1085–1095.
- ¹¹ a) Domínguez de María, P.; Carboni-Oerlemans, C.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; Gemert, R. *J. Mol. Cat. B.: Enzymatic* **2005**, 37, 36-46; b) Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 797-812; c) Sugiura, M.; Oikawa, T.; Hirano, K.; Inukai, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 488, 353-358; d) Tejo, B.A.; Salleh, A.B.; Pleiss, J. *J. Mol. Model.* **2004**, 10, 358-366; e) www.novozymes.com; f) www.amano-enzyme.co.jp.
- ¹² a) Gedey, S.; Liljeblad, A.; Fülöp, F.; Kanerva, L.T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 2573-2581; b) Gedey, S.; Liljeblad, A.; Lázár, L.; Fülöp, F.; Kanerva, L.T. *Can. J. Chem.* **2002**, 80, 565-570.
- ¹³ a) Li, X.-G.; Kanerva, L. T. *Org. Lett.* **2006**, 8, 5593-5596; b) Liljeblad, A.; Kavenius, H.-M.; Tähtinen, P.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 181-191.
- ¹⁴ Kanerva, L. T.; Sundholm, O. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2407-2410.
- ¹⁵ a) Li, X.-G.; Kanerva, L. T. *Org. Lett.* **2006**, 8, 5593-5596; b) Solymár, M.; Liljeblad, A.; Lázár, L.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 1923-1928; b) Solymár, M.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 2383-2388; c) Liljeblad, A.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 4405-4415; d) Mavrynsky, D.; Päiviö, M.; Lundell, K.; Sillanpää, R.; Kanerva, L. T.; Leino, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1317-1320; e) Gedey, S.; Liljeblad, A.; Lázár, L.; Fülöp, F.; Kanerva, L.T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 105-110; f) Fernández-Ibáñez, Á. M.; Maciá, B.; Minnaard, A. J.; Feringa, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1317-1319.
- ¹⁶ a) Freedman, T. B.; Cao, X.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A. *Chirality* **2003**, 15, 734-758; b) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Pan, J. J. *Chirality* **2008**, 20, 643-663.
- ¹⁷ Lin, G.; Midha, K.K.; Hawes, E.M. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, 28, 215-219.
- ¹⁸ El-Said, M.K. *Pharmazie* **1981**, 36, 678-679.
- ¹⁹ Tilak, S.R.; Tyagi, R.; Goel, B.; Saxena, K.K. *Indiandrugs* **1998**, 35, 221-227.

-
- ²⁰ Dominguez, J.N.; Lopez, S.; Charris, J.; Iarruso, L.; Lobo, G.; Semenow, A.; Olson, J.E.; Rosenthal, P.J. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2726-2732.
- ²¹ Raval, J.P.; Desai, K. K. *ARKIVOC* **2005**, 21-28.
- ²² Motohashi, N.; Kawase, M.; Saito, S.; Sakagami, H. *Curr. Drug Targets* **2000**, *1*, 237-246.
- ²³ Mosnaim, A.D.; Ranade, V.V.; Wolf, M.E.; Puente, J.; Valenzuela, A.M. *Am. J. Ther.* **2006**, *13(3)*, 261-273.
- ²⁴ Trivedi, A.R.; Siddiqui, A.B.; Shah, V.H. *ARKIVOC* **2008**, 210-217.
- ²⁵ Aszalos, A. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2003**, *50*, 43-53.
- ²⁶ Kurihara, T.; Motohashi, N.; Sakagami, H. H.; Molnar J. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4081-4083.
- ²⁷ Freedman, T. B.; Cao, X.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A. *Chirality* **2003**, *15*, 743-758; Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Pan, J. J. *Chirality* **2008**, *20*, 643-663.
- ²⁸ a) Långvik, O.; Saloranta, T.; Kirilin, A.; Liljeblad, A.; Mäki-Arvela, P.; Kanerva, L.T.; Murzin, D.Y.; Leino, R. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 1615-1621; b) Vääntinen, E.; Kanerva, L.T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **1994**, *1*, 3459-3463; c) Fernández-Lorente, G.; Terreni, M.; Mateo, C.; Bastida, A.; Fernández-Lafuente, R.; Dalmases, P.; Huguet, J.; Guisán, J.M. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 389-396.
- ²⁹ Blap, D.; Guo, Z.; Xu, X. *J Am Oil Chem Soc* **2009**, *86*, 637-642.
- ³⁰ a) Sheldon, R.A. *Adv Synth Catal* **2007**, *349*, 1289-1307; b) Reetz, M.T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J. *Biotechnol Bioeng* **1996**, *49*, 527-534; c) Reetz, M.T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J. *Angew Chem Int Ed* **1995**, *34*, 301-303; d) Reetz, M.T.; Tielmann, P.; Wiesenhöfer, W.; Könen, W.; Zonta, A. *Adv Synth Catal* **2003**, *345*, 717-728.
- ³¹ a) Tomin, A.; Weiser, D.; Hellner, G.; Bata, Zs.; Corici, L.; Péter, F.; Koczka, B.; Poppe, L. *Process. Biochem.* **2011**, *46*, 52-58; b) Santos, J.C.; Paula, A.V.; Nunes, G.F.M.; de Castro, H.F. *J Mol Cat B: Enzymatic* **2008**, *52-53*, 49-57.
- ³² a) Gorokhova, I.V.; Ivanov, A.E.; Zubov, V.P. *Russian Journal of Bioorganic chemistry* **2002**, *28*, 38-43; (translated from *Bioorganicheskaya Khimiya* **2002**, *28*, 44-49) b) Gorokhova, I.V.; Ivanov, A.E.; Zubov, V.P. *Russian Chemical Bulletin, International Edition* **2001**, *50*, 152-154.
- ³³ Colton, I.J.; Ahmed, S.N.; Kazlauskas, R.J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 212-217.
- ³⁴ Secundo, F.; Carrea, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *92*, 439-446; Dai, L.; Klivanov, A.M. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**, *96*, 9475-9478.
- ³⁵ Xu, C.; Yuan, C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169-2186.