



Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Catedra de Biochimie și Inginerie Biochimică

**Alcooli heterociclici chirali:
sinteză chemoenzimatică și efecte metabolice**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific
Prof. Dr. Florin Dan Irimie

Doctorand
Maria Trif

Cluj-Napoca
2012

Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Catedra de Biochimie și Inginerie Biochimică

Maria TRIF

**Alcooli heterociclici chirali:
sinteză chemoenzimatică și efecte metabolice**

Comisia de doctorat:

Președinte: Assoc. prof. Dr. Cornelia Majdik – Decan al Facultății de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Conducător științific: Prof. Dr. Florin Dan Irimie – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

REFERENȚI:

Prof. Univ. Dr. Valentin Zaharia - Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

Prof. Univ. Dr. Ioan Grosu - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Assoc. prof. Dr. Adela Pintea - Facultatea de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca

Data susținerii publice : 2 Martie 2012

Cuprins

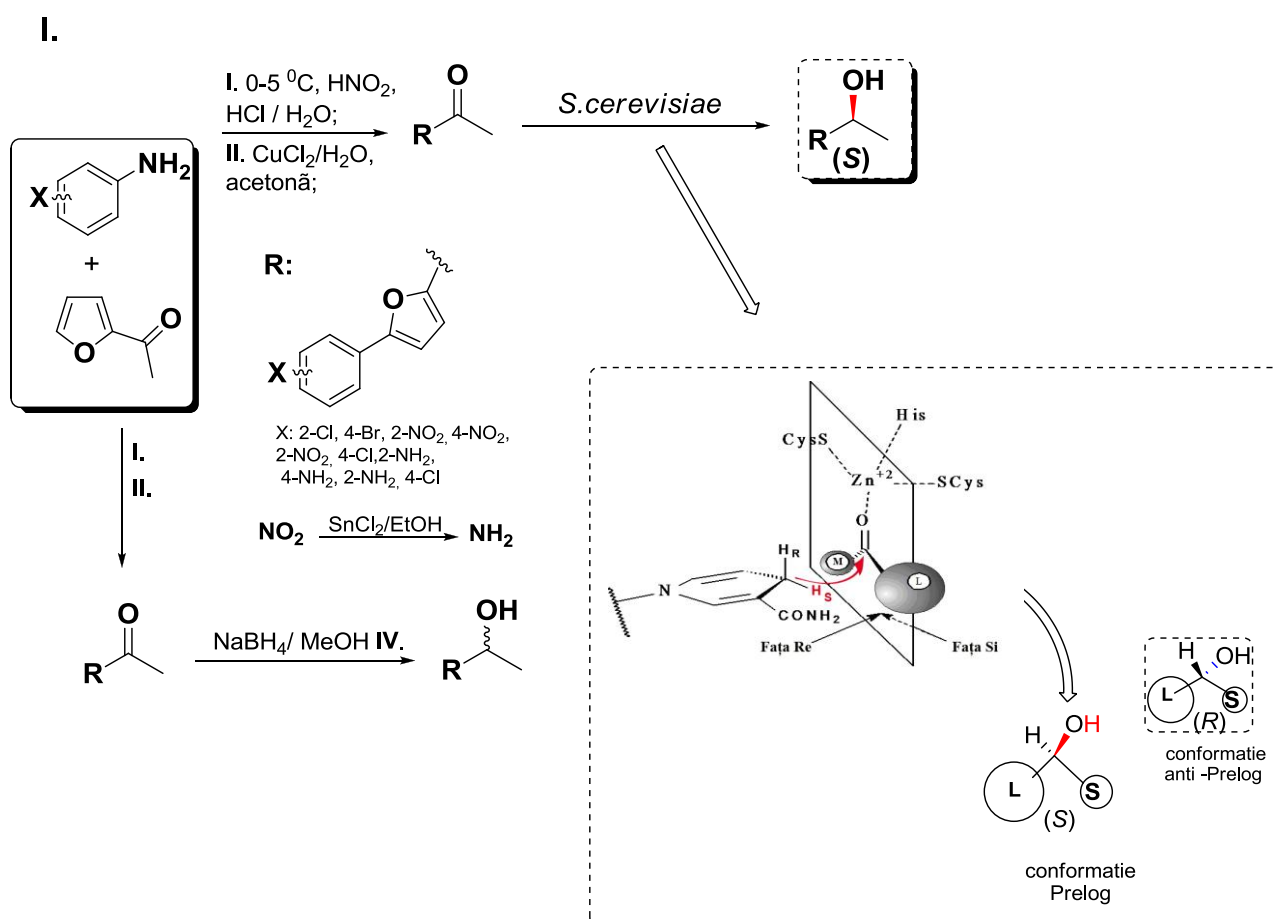
Cuprins	3
Abrevieri	5
1. Introducere	6
2. Partea teoretică	7
2.1. Chiralitate. Activitatea biologică a compușilor chirali	7
2.1.1. Mecanismul activității biologice chirale. Modelul interacțiunii dintre compușii bioactivi chirali receptori	7
2.1.2. Medicamente chirale	8
2.1.3. Activitatea biologică a alcoolilor secundari heterociclici optic puri	9
2.1.3.1. Heterocicluri furanice și fenilfuranice ca precursori și intermediari	9
2.1.3.2. Compușii benzotiazolii și furilbenzotiazolii cu activitate biologică	9
2.1.3.3. Alcoolii secundari heterociclici chirali	10
2.2. Metode și sisteme biocatalitice în sinteza alcoolilor secundari optic puri	11
2.2.1. Drojdia ca biocatalizator în sistem whole cell	12
2.2.2. Biotransformări mediate de lipaze	14
2.3. Obținerea alcoolilor secundari heterociclici optic activi	16
2.3.1. Rezultate obținute prin bioreducerea cetonelor prochirale	17
2.4. Efecte ale consumului de alcool asupra unor parametri metabolici la nivel hepatic	20
2.4.1. Ficatul - aspecte generale și de patologie alcoolică	20
2.4.2. Metabolismul etanolului	22
3. Obiectivele activității de cercetare	26
4. Rezultate și discuții	29
4.1. Sinteza asimetrică a (S)-1-(5-fenilfuran-2-il) etanolilor cu drojdie - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29

4.1.1. Sinteza substraturilor – cetonele prochirale 1a-e	29
4.1.2. Biotransformări mediate de drojdie la scară analitică	30
4.1.3. Determinarea configurației absolute a produșilor de reacție	34
4.2. Rezoluția cinetică a etanolilor și acetaților furilbenzotiazolici racemici	35
4.2.1. Sinteza chemoenzimatică a heteroerilalcolilor racemici rac-3a-d și derivaților acilați ai acestora rac-4a-d	35
4.2.2. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a racemicilor rac-3a-d și rac-4a-d	36
4.2.3. Sinteza (R)- , (S)-3a-d și (R)- , (S)-4a-d la scară preparativă	40
4.2.4. Determinarea configurației absolute a produșilor obținuți prin rezoluție cinetică	43
5. Concluzii	48
6. Partea experimentală	49
6.1. Metode analitice	49
6.2. Reactivi și solvenți	50
6.3. Sinteza compușilor racemici	51
6.3.1. Sinteza a fenilfuran-2-il etanonelor 1a-e	51
6.3.2. Sinteza fenilfuran-2-il etanolilor racemici rac-2a-e	52
6.3.3. Sinteza alcoolilor rac-3a-d și acetaților racemici rac-4a-d	53
6.4. Reacțiile enzimaticice la scară analitică	57
6.4.1. Biotransformarea celulară a cetonele prochirale 1a-e cu drojdie	57
6.4.2. Acilare enzimatică la scară analitică a 1-heteroariletanolilor racemici rac-3a-d	57
6.4.3. Alcooliza enzimatică la scară analitică a racemicilor 1-heteroariletel acetați rac-4a-d	58
6.5. Procedurile de scară preparativă	58
6.5.1. Sinteza (S)-heteroariletanolilor 2a,c-e cu drojdie la scară preparativă	58
6.5.2. Acilarea enzimatică la scară preparativă a racemicilor 1-heteroariletanoli rac-3a-d	58
6.5.3. Alcooliza enzimatică la scară preparativă a racemicilor 1 - heteroariletel acetaților rac-4a-d	59

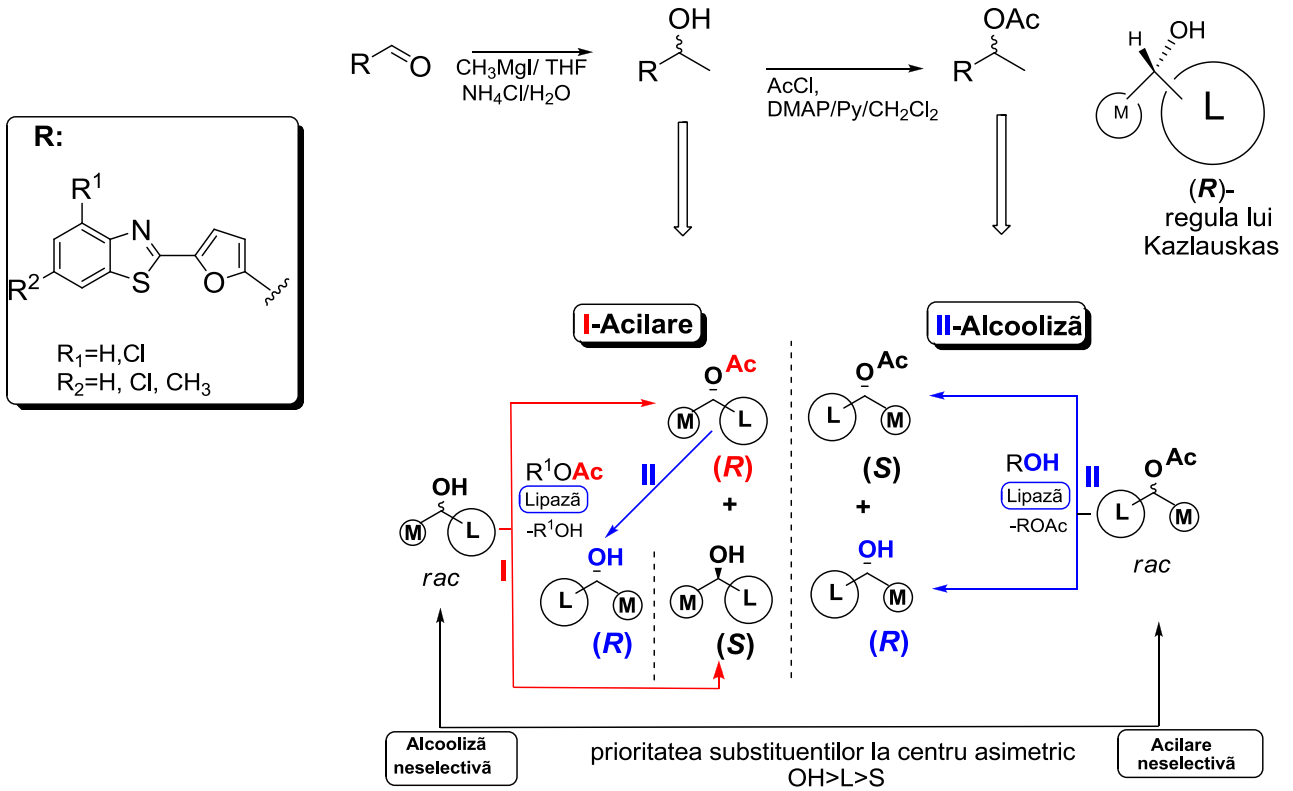
6.6. Determinarea configurației absolute a noilor heteroariletanoli 2a-e, 3a-d și heteroariletii acetatilor 4a-d optic puri	59
6.6.1. Prepararea diolilor mesilați	59
6.6.2. Prepararea esterilor Mosher	59
7. Testarea activității biologice a 1-(5-(6-metilbenzo[d]tiazol-2-il)furan-2-il)etil acetatului rac-4d și (S)-, (R)- 4d	60
7.1. Material și metode	60
7.1.1. Material biologic	60
7.1.2. Protocol experimental	60
7.1.3. Tehnici de lucru	62
7.1.4. Prelucrarea statistică a rezultatelor	63
7.2. Rezultate și discuții	64
7.2.1. Efectele administrării de furil-benzotiazol (enantiomerii R și S) la șobolani	64
7.2.2. Efectele administrării de furil-benzotiazol rac, enantiomerii (R)- și (S)- la șobolani intoxicați subcronic cu etanol	75
7.3. Concluzii	89
Mulțumiri	91
Bibliografie	92

Cuvinte cheie: reducere drojdie, fenilfurani, furilbenzotiazoli, rezoluție cinetică, lipaze, biotransformare, alcoolii secundari, efecte metabolice, ficat, esterii Mosher.

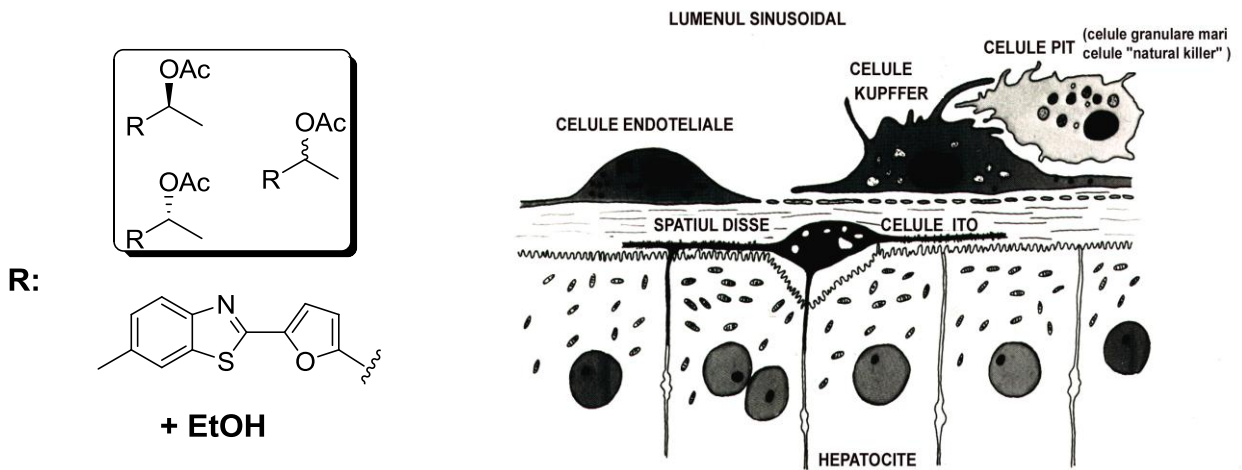
Grafic abstract:



II.



III.



Ramadori și colab., 2008¹

1. Introducere

Biocataliza reprezintă un instrument valoros și atractiv pentru dezvoltarea de noi metode de sinteză pentru o gamă largă de produși din industria farmaceutică, agrochimică și a chimiei fine, din domeniul științelor medico-legale, microbiologiei sau ingineriei genetice. Companiile farmaceutice se orientează tot mai mult spre biocataliză celulară și enzimatică ca sursă de produși enantio- și diastereopuri², care pot fi obținuți prin sinteze selective. În acest sens, noi microorganisme și/sau enzimele lor fac obiectul unui screening intensiv.

În domeniul farmaceutic există un interes în continuă creștere pentru obținerea de substanțe active optic pure, ca precursori pentru medicamente, cu selectivitate mare, cu specificitate înaltă și efecte secundare reduse³. În același timp, se caută strategii de sinteză cu impact negativ minim asupra mediului („green processes”), cu productivitate înaltă, grad crescut de utilizare a materiilor prime și consum minim de energie. Astăzi, aproximativ 10% dintre metodele de sinteză a medicamentelor implică utilizarea biocatalizatorilor și mai mult de jumătate din substanțele active au cel puțin un centru chiral⁴.

În cazul unor reacții chimice dificile, biocataliza oferă o alternativă reală pentru realizarea unor transformări cu chemo-, regio- și/sau stereoselectivitate înaltă, în condiții de lucru (pH, temperatură, presiune) moderate și fără utilizarea unor reactivi periculoși. În general, biocatalizatorii prezintă caracteristici superioare de selectivitate în comparație cu alți catalizatori. Integrarea bioinformaticii în genomică și exploatarea biodiversității facilitează descoperirea de noi biocatalizatori (enzime și/sau microorganisme); în plus, modificarea prin inginerie genetică a enzimelor existente și optimizarea condițiilor de lucru permit adaptarea la necesitățile impuse de scopul urmărit. Această adaptare, este de multe ori necesară întrucât biocatalizatorii enzimatici au făcut obiectul unor secvențe mutație selectivă care au durat milioane de ani, în vederea procesării unor substraturi naturale.

Un număr mare de studii^{5,6,7} dovedesc aplicabilitatea catalizei mediate de enzime și sisteme de celule întregi în sinteza de alcooli heterociclici secundari optic puri. Atât heterociclurile din structura lor, cât și alcoolii secundari heterociclici în general pot reprezenta precursori chirali în sinteza de medicamente cu structuri complexe și activitate biologică diversă⁸. Interesul nostru s-a orientat către rezoluția cinetică enzimatică a alcoolilor racemici catalizată de lipaze și reducerea biocatalitică enantiotop-selectivă a cetanelor prochirale mediată de drojdie, într-o strategie de sinteză care a combinat etapele de biosinteză cu cele chemocatalitice. Aceste metode s-au dovedit a prezenta potențial pentru dezvoltarea de tehnologii durabile, economice, care respectă principiile chimiei verzi.

2. Partea teoretică (date din literatură)

„Cei mai mulți produși naturali, produși esențiali ai vieții, sunt asimetrici, nesuperpozabili pe imaginea lor în oglindă. Aceasta stabilește probabil linia de demarcare dintre chimia materiei fără viață și chimia vieții.”

L. Pasteur, 1858

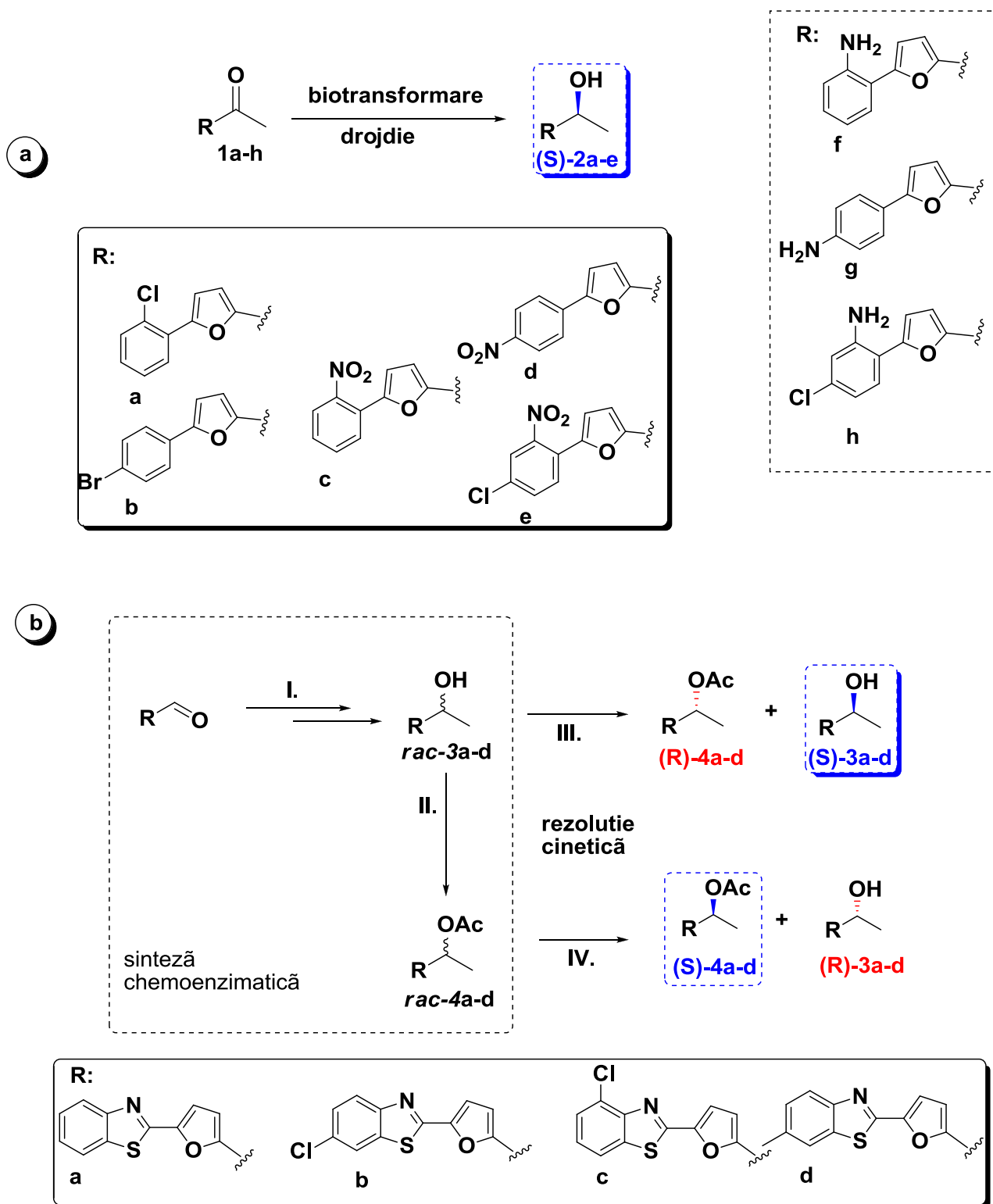
3. Obiectivele activității de cercetare

În ultimele decenii, ca urmare a cererii ridicate de materiale și produse chimice de sinteză fină (agrochimice, farmaceutice), dezvoltarea de noi metode streoselective de sinteză ale alcoolilor heteroarilici enantiomeric îmbogățiți a atras un interes puternic datorită proprietăților biologice și farmacologice a acestora precum și prezenței lor în componenții activi ai multor medicamente^{8, 9, 10, 11}, (Capitolul 2.2). Biocatalizatorii sunt principial extrem de utili pentru sinteza compușilor enantiopuri¹², datorită numeroaselor avantaje specifice utilizării acestora. Mai mult decât atât, procesele biocatalitice s-au dovedit a fi mai ecologice și mai puțin periculoase. În consecință, biocataliza oferă o oportunitate pentru sinteza compușilor chirali, fiind o metodă de fabricație care a evoluat de la o tehnologie de cercetare la utilizarea pe scară largă în industria farmaceutică și chimia compușilor fini¹³.

Scopul acestei activități de cercetare fost sinteza alcoolilor chirali cu enantiopuritate ridicată cu structuri fenil-furanice, furil-benzotiazolice, precum și a acetatilor acestora, testarea experimentală a efectelor biologice a acetatului metil substituit al furilbenzotiazolului. Ne-am orientat către acești compuși deoarece atât heterociclurile din structura lor, cât și alcoolii secundari heterociclici în general pot reprezenta precursori chirali în sinteza de medicamente cu structuri complexe și activitate biologică diversă⁸. La aceasta se adaugă aspectul de chiralitate, cu implicațiile ei biologice majore¹⁴. Compuși care conțin grupe funcționale reactive prin care să se poată atașa la alți componenți structurali ai moleculelor medicamentului final și să permită transformarea ușoară a intermediarilor în alte tipuri de compuși cu un grad ridicat de enantiopuritate îndeplinesc criteriile necesare pentru a putea fi utilizat ca sinton în industria farmaceutică. Datorită structurii lor fenilfuranii și furilbenzotiazolii îndeplinesc aceste criterii, aceștia acționează ca donori/acceptori de legături de hidrogen și deasemenea furnizează ioni pozitivi, iar substituția inelului heterociclic cu un inel aromatic sau heteroaromatic poate mări diversitatea farmacoforică¹⁵,

Activitatea de cercetare s-a axat pe trei direcții:

1. Sinteza stereoselectivă de noi (hetero)aril, (*S*)-1-(5-fenilfuran-2-il)etanoli diferit substituiți (*S*)-**2a-e** și ambelor forme enantiomerice ale 1-(5-(benzo[*d*]tiazol-2-il)furan-2-il)etanoliilor (*R*)-(*S*)-**3-a-d** și acetatilor enantiopuri corespunzători (*R*)-(*S*)-**4-a-d**. Ca parte a interesului grupului în dezvoltarea metodelor stereoselective pentru obținerea alcoolilor secundari heteroaromatici optic activi, am optat pentru sinteza acestora prin două metode biocatalitice diferite a. și b.
 - a. bioreducerea enantiotop selectivă a 1-(5-fenilfuran-2-il) cetonei prochirale **1a-h** mediate de drojdie (Schema 9, a.). Metoda este una dintre cele mai importante, practice, ieftine și eficiente¹⁷, metode cu acțiune prietenoasă față de mediu, așa cum s-a arătat în Capitolul 2.3.1. Deși în drojdie se găsesc oxidoreductaze cu specificitate (*R*)- și (*S*)-, motiv pentru care enantioselectivitatea produșilor este redusă, în literatură sunt raportate proceduri de creștere a stereoselectivității descrise în Capitolul 2.2.1 și valori mari ale exceselor enantiomerice pentru produși obținuți pe substraturi asemănătoare. Cele de mai sus, precum și rezultatele foarte favorabile obținute la sinteza stereoselectivă a fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor diferit substituiți¹⁸, (Capitolul 2.3.1) au fost motivele care ne-au condus la alegerea drojdiei ca biocatalizator pentru sinteza fenilfuran-alcoolilor.
 - b. biotransformarea 1-(5-(benzo[*d*]tiazol-2-il)furan-2-il)etanoliilor *rac*-**3a-d** și acetatilor *rac*-**4a-d** racemici diferit substituiți prin rezoluție cinetică catalizată de lipază în acilarea enzimatică selectivă a etanolilor racemici (Schema 9b, ruta III) și alcooliza enzimatică selectivă (Schema 9b. ruta IV) a acetatilor racemici corespunzători. Rezoluția cinetică a alcoolilor racemici catalizată de lipază s-a dovedit a fi o metodă eficientă de sinteză a diferiților alcooli secundari optic puri⁶, (Capitolul 2.3.2.) Exploatând avantajul lipazei de a-și conserva enantiopreferința (în alcooliză și acilare) și având în vedere activitatea și înalta selectivitate a enzimei demonstrată la sinteza cianhidrin-acetatilor pe bază de furilbenzotiazoli¹⁴ am optat pentru optimizarea metodei chemoenzimetică de sinteză a noilor alcooli și acetati pe bază de furilbenzotiazolului optic puri bazată pe rezoluția cinetică enzimatică mediată de lipază.
2. Mărirea activității și stereoselectivității biocatalizatorilor utilizați, în scopul obținerii unor randamente și excese enantiomerice cât mai mari acolo unde acestea nu sunt satisfacatoare.
3. Investigarea unor efecte metabolice ale 1-(5-(6-metilbenzo[*d*]tiazol-2-il)furan-2-il)etil acetatului, atât a formei racemice, cât și a celor doi enantiomeri. S-a ales pentru testare forma acilată a alcoolului, mai hidrofobă, care penetrează mai ușor membranele celulare.



Schema 9.

- Sinteza noilor (*S*)-fenilfuran etanolilor (*S*)-2a-e, prin biotransformare cu drojdie
- Sinteza ambilor enantiomeri (*S*)- și (*R*)-furilbenzotiazol etanolilor 3a-d și ai furilbenzotiazol acetatilor 4a-d prin rezoluție cinetică a alcoolilor și acetatilor racemici.

4. Rezultate și discuții

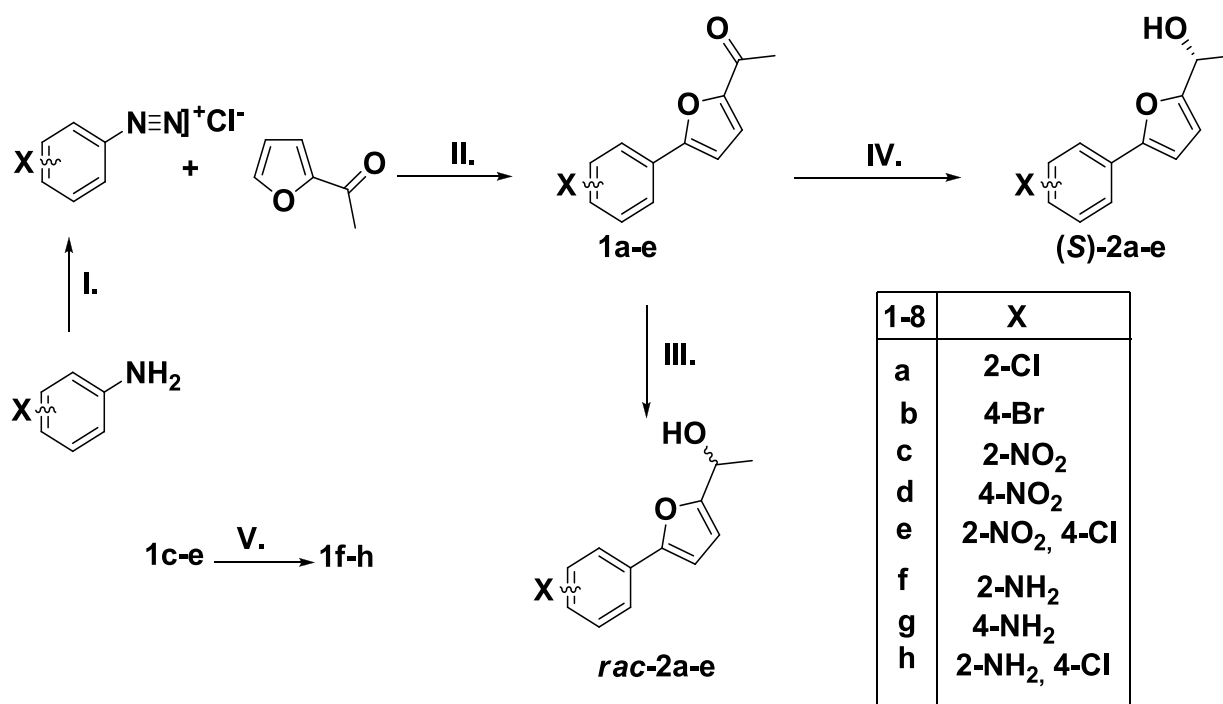
4.1. Sinteza asimetrică a (S)-1-(5-fenilfuran-2-il)etanoliilor cu drojdie - *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1. Sinteza substraturilor – cetonele prochirale **1a-e**

Substraturile prochirale, 1-(5-fenilfuran-2-il)etanonele **1a-e** folosite pentru biotransformările ulterioare au fost sintetizate prin metoda Meerwein¹⁹ descrisă în literatură²⁰. Metoda presupune reacția de cuplare a sărurilor de diazoniu a anilinelor corespunzătoare, foarte instabile, cu 2-acetilfuranul în prezența catalitică a CuCl₂ în sistem apos sau acetonă/apă conform schemei 10. Sărurile de diazoniu s-au obținut la temperatura scăzută 0-5 °C, prin diazotarea anilinelor cu HNO₂ și HCl. Alegerea anilinelor s-a făcut urmărind obținerea unei serii de 1-(5-fenilfuran-2-il) cetone divers substituie, care să posede pe lângă gruparea carbonilică reductibilă și alte grupări funcționale al căror caracter poate influența bioprocerea substratului sub aspectul vitezei de transformare a substratului, în funcție de caracterul electronodonor sau electronoacceptor al substituentului sau chemoselectivității transformării. Cum ar fi gruparea nitro grefată pe inelul fenilic, la rândul ei potențial reductibilă. Fenilfuran cetonele **1f-h** au fost sintetizate prin reducerea regioselectivă a grupării nitro cu SnCl₂ în etanol (Schema 10).

4.1.2. Biotransformări mediate de drojdie la scară analitică

Fenilfuran cetonele **1a-e**, au fost reduse în condiții biocatalitice cu *Saccharomyces cerevisiae* obținându-se (S)-fenilfuran-2-il-etanolii (S)-**2a-e**. Monitorizarea desfășurării reacției – transformarea totală a cetonei a fost controlată prin cromatografie pe strat subțire (TLC). Pentru comparație, transformările au fost efectuate și chimic cu borohidru de sodiu în metanol, obținându-se cu randamente foarte bune *rac*-fenilfuran-2-il-etanolii racemici *rac*-**2a-e**. Structura substraturilor fenil-furan-cetonice și a alcoolilor obținuți a fost confirmată prin spectroscopie ¹H-RMN, ¹³C-RMN și spectroscopie de masă MS. Enantiomerii *rac*-**2a-e** au fost separați cromatografic, ceea ce ne-a permis analiza activității și stereoselectivității drojdiei la bioreducerea cetonele prochirale. În timpul procesului de purificare a fenilfuran-2-il-etanolii *rac*-**2a-e**, s-a observat o instabilitate a acestora în medii slab acide, de aceea acestea trebuiesc evitate.



I. 0-5 °C, HNO₂, HCl / H₂O; II. CuCl₂/H₂O, acetonă; III. NaBH₄/ MeOH IV. drojdie;
V. SnCl₂/EtOH.

Schema 10: Sinteza (*S*)-fenilfuran-2-il-etanolilor (*S*)-**2a-e** prin bioreducerea cu drojdie a cetonelor **1a-e**.

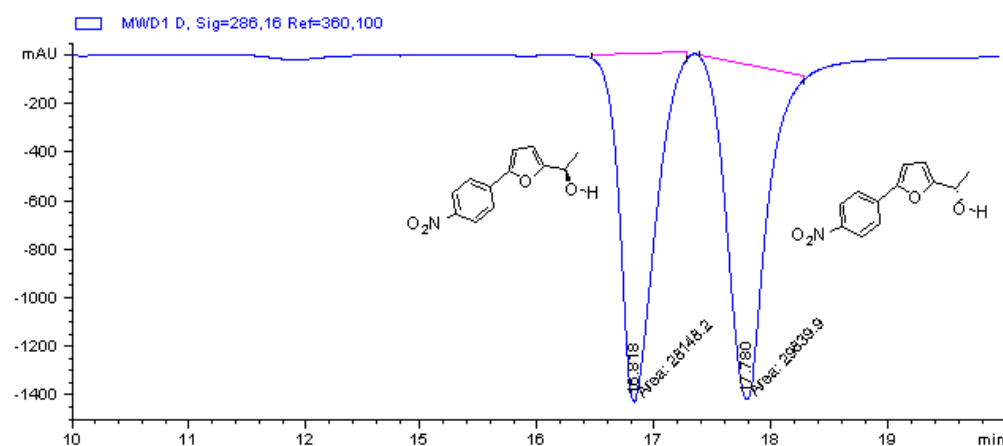
Biotransformarea substraturilor **1a-e** mediată de drojdie a fost efectuată în prima etapă la scară analitică în condiții fermentative și nefermentative. Rezultatele obținute relevă faptul că pentru toate substraturile sistemul fermentativ permite realizarea unor transformări mult mai selective, excesul enantiomeric maxim al produsului putând atinge 99% și conversii superioare în comparație cu sistemul nefermentativ (Tabelul 6).

Tabelul 6. Biotransformarea substraturilor **1a-e** în condiții fermentative și nefermentative

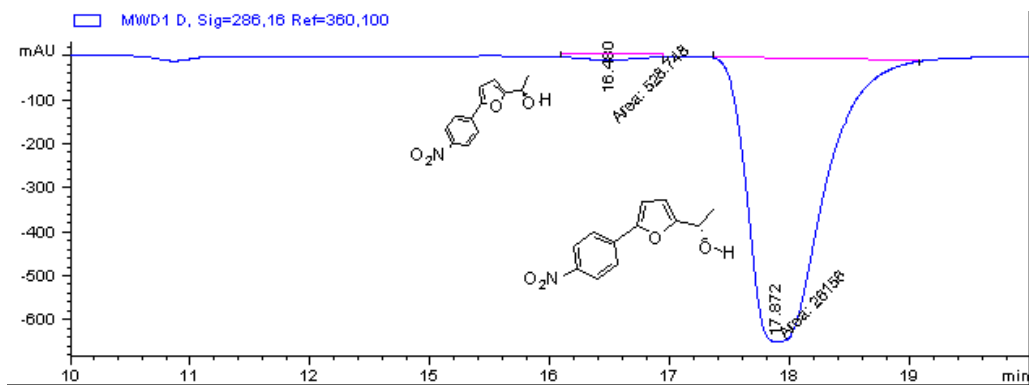
Nr. crt.	Substrat	Produs	Fermentativ		Nefermentativ	
			ee (%)	Rdt. (%)	ee (%)	Rdt. (%)
1	1a	(<i>S</i>)- 2a	64	70	52	49
2	1b	(<i>S</i>)- 2b	-	-	-	-
3	1c	(<i>S</i>)- 2c	41	85	-	-
4	1d	(<i>S</i>)- 2d	98	80	80	57
5	1e	(<i>S</i>)- 2e	99	87	27	61

În urma acelor observații în continuare s-a aplicat sistemul fermentativ pentru reducere. De exemplu, bioreducerea compusului **1c** în sistem fermentativ are loc cu un randament relativ ridicat, în timp ce în condiții nefermentative bioreducerea eșuează (Tabelul 6, nr. 3). Bioreducerea compusului **1b** în ambele sisteme este împiedicată, confirmând previziunile noastre bazate pe observația făcută anterior în cazul sintezei 1,2-etandiolilor mediată de drojdie²¹, unde s-a arătat că ambele substraturi substituie cu Br ale α -hidroximetil fenilfurancetonelor și α -acetoximetil fenilfurancetonelor sunt inadecvate pentru echipamentul enzimatic al drojdiei. Eșecul bioreducerii poate fi explicat prin efectul steric al 5-(4-bromofenil)furan-2-il-etanonei ceea ce face imposibilă interacțiunea acestor compuși cu situsul catalitic al oxidoreductazelor din celulele de drojdie și prin efectul +E al bromului sursă de creștere a densității electronice prin conjugare având loc dezactivarea carbonilului. Valorile ridicate ale exceselor enantiomerice și a randamentului pentru producții (*S*)-**2d** and (*S*)-**2e** (Tabelul 6, nr. 4 și 5), sunt deasemenea în concordanță cu cele obținute anterior la sinteza corespunzătoare a 1,2-etandiolilor ($\eta=79-80\%$, $ee=87-88\%$), pe aceleași substraturi prin biotransformare mediată de drojdie²¹. Diferența între valorile ee ale produșilor obținuți prin bioreducerea compușilor **1c** și **1d** (Tabelul 6, intrarea 2 și 3) sugerează faptul că substraturile substituie în poziția *para* a inelului fenilic sunt preferate celor substituie în poziția *orto*.

Evaluarea stereoselectivității biotransformărilor s-a realizat prin separarea cromatografică a enantiomerilor pe coloane chirale, în vederea calculării ponderii lor în amestecul rezultat, al excesului enantiomeric din diagramele de eluție (Figura 5 exemple)



a.



b.

Figura 5. Cromatogramele obținute la HPLC pentru a. *rac-2d*; b. produși reacției enzimaticice a *rac-2 d*.

Pentru a confirma dependența stereoselectivității de poziția, și efectul electronic, al substituentului, precum și efectul de modificare al substratului (descriș în Capitolul 2.3.2.), s-a redus selectiv gruparea NO_2 a compușilor **1 c-e** cu $\text{SnCl}_2/\text{EtOH}$ la gruparea NH_2 corespunzătoare, cu efect electronic opus. Bioreducerea acestor 1-(amino-5-fenil-furan-2-il)etanone **1f-h**, cu drojdie (Tabelul 6, nr.2) nu a avut loc, similar cu rezultatul obținut la reducerea derivatului **1b**. Absența transformării celulare sugerează o incompatibilitate structurală între aceste substraturi și echipamentul enzimatic al drojdiei ceea ce poate fi explicat printr-o distribuie electronică, o conjugare electronică cu dezactivarea carbonilului în structura amino-cetonelor comparativ cu cea a nitro-cetonelor. Datorită numărului mare de enzime prezente în drojdie nu se pot determina exact însușirile substituenților care influențează în cea mai mare măsură bioreducerea, dar se pare că efectul steric, poziția și efectul electronic sunt caracteristici foarte importante.

Modificarea condițiilor de reacție, imobilizarea enzimei, utilizarea unor sisteme tampon, adaos de cosolvenți: EtOH, DMSO, DMF nu a îmbunătățit semnificativ stereoselectivitatea procesului pentru acești compuși. Aditivii acționează ca inhibitori ai enzimelor specifice, în funcție de stereoselectivitatea [(*R*) sau (*S*)] enzimei inhibate, astfel se poate observa majorarea sau diminuarea valorii ee a (*S*)-alcoolilor obținuți. Stereoselectivitatea procesului nu a putut fi îmbunătățită pentru compusul **1a,d** cele mai bune rezultate rămân cele obținute fără aditivi în condiții fermentative.

- cea mai mare creștere a selectivității pentru bioreducerea compusului **1c** s-a manifestat în prezența n-hexanului 0,1%, însă totuși s-a observat o ușoară scădere a valorii randamentului de reacție (Tabelul 7, nr. 3).

Condițiile optime stabilite pentru reacțiile scară analitică, au fost respectate și pentru bioreducere la scară preparativă a substraturilor **1a,c-e** fără modificări semnificative de randament, stereoselectivitate și timp de reacție (Tabelul 8).

Tabelul 8. Sinteza (*S*)-fenilfuran-2-il etanolilor mediată de drojdie la scară preparativă **2a, c-e**.

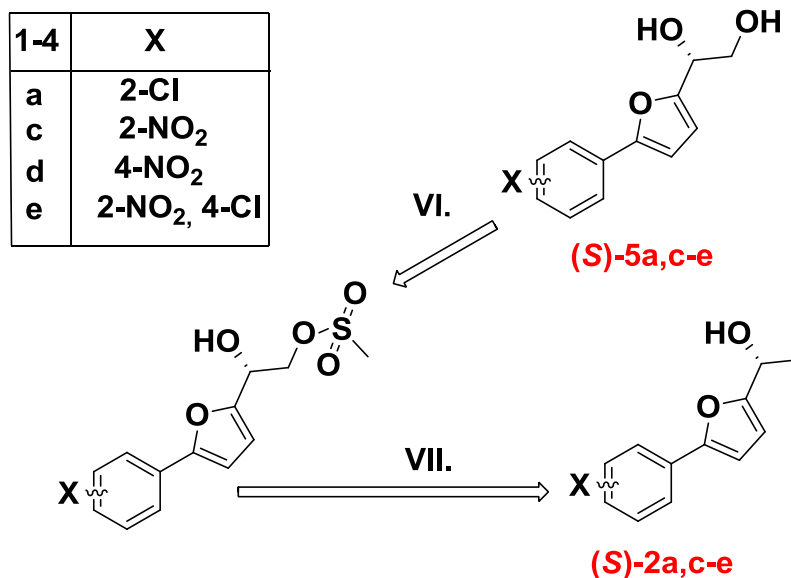
Nr.crt.	Substrat	Produs	ee%	Timp (zile)	Randament %	$[\alpha_D^{20}]$
1	1a	(<i>S</i>)- 2a ^a	64	2	65	- 6.2
2	1c	(<i>S</i>)- 2c ^b	58	2	81	- 28
3	1d	(<i>S</i>)- 2d ^a	98	2	76	+ 13
4	1e	(<i>S</i>)- 2e ^a	99	2	80	-24

^a Sistem fermentativ

^b Sistem fermentativ cu *n*-hexan ca aditiv

4.1.3. Determinarea configurației absolute a produșilor de reacție

Folosind calea retrosintezei²² și cunoscând configurația absolută a (*S*)-fenilfuran-2-il-1,2-etandiolilor corespunzători (*S*)-**5a,c-e**²³, s-a propus următoarea schemă de reacții: meztizarea selectivă a grupării alcoolice primare a (*S*)-**5a,c-e**, urmată de reducerea grupării sulfonesterice cu hidrură de litiu și aluminiu, reacțiile VI și VII și s-au obținut (*S*)-fenilfuran-2-il-etanolii, (*S*)-**2a,c-e**. Configurația absolută a fost stabilită comparând semnele rotației optice și timpii de retenție a enantiomerilor heteroariletanolilor obținuți prin cele două metode diferite (Schema 11). În toate cazurile alcoolii au avut configurația (*S*)-, în concordanță cu regula Prelog.



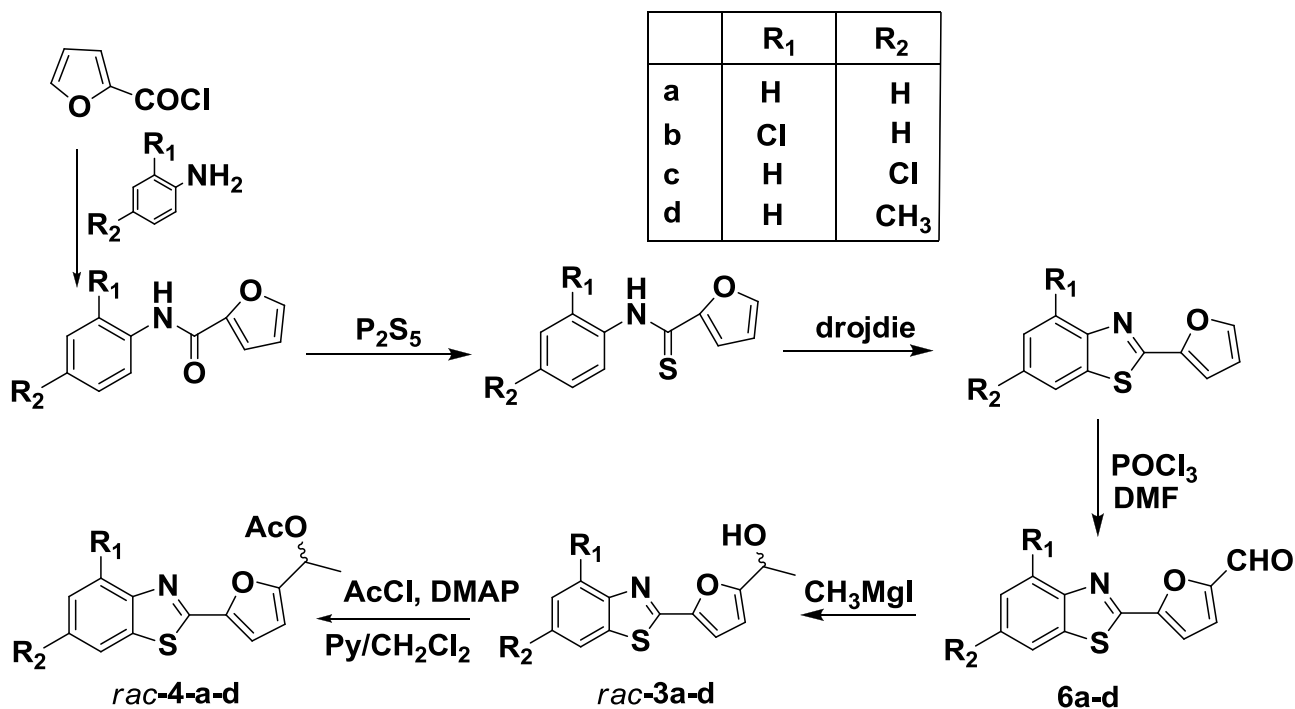
VI. CH₃SO₂Cl, Et₃N/THF, -20⁰C; VII. LiAlH₄/THF

Schema 11: Retrosinteza pentru determinarea configurației absolute a produșilor: (*S*)-fenilfuran-2-il etanolilor (*S*)-**2a,c-e**.

4.2. Rezoluția cinetică a etanolilor și acetaților furilbenzotiazolici racemici

4.2.1. Sinteza chemoenzimatică a heteroerilalcolilor racemici *rac*-**3a-d** și derivaților acilați ai acestora *rac*-**4a-d**

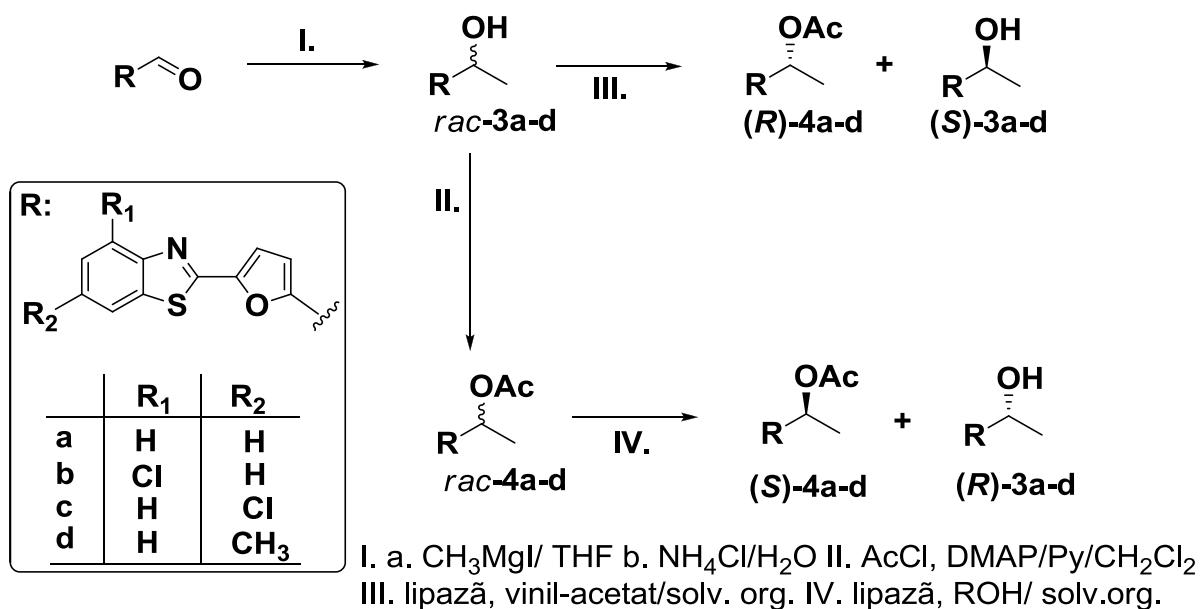
Inițial au fost sintetizați alcoolii racemici 1-(5-(benzo[*d*]tiazol-2-il)furan-2-il)etanol, *rac*-**3a-d** din heteroaril aldehydele **6a-d** corespunzătoare printr-o reacție Grignard. Prin acilare chimică a heteroaril etanolilor *rac*-**3a-d** au fost obținuți acetații corespunzătoare *rac*-**4a-d**. Sinteza alcoolilor furilbenzotiazolici a fost realizată în cele 7 etape: reacția Canizzaro pentru obținerea acidului furoic, clorurarea acidului furoic, condensarea cloruri acidului furoic cu anilina diferit substituită, obținerea tiofuranilidei, transformarea 2-tioanilidei în 2-furil benzotiazol - închiderea ciclului benzotiazolic, obținerea carbalhidei prin formilare Vilsmeier-Haack, sinteza alcoolului racemic prin reacție Grignard (Schema 12). Metoda biocatalitică de sinteză a benzotiazolilor prin ciclizare mediată de oxidorectazele din celulele de *Saccharomyces cerevisiae* a fost propusă pentru prima dată de către Paizs și colab.²⁴, în cadrul colectivului nostru iar Fărcășan și Paiu²⁵ au preparat derivați formilați ai inelului furilbenzotiazolic cu randamente corespunzătoare pentru acest tip de reacții.



Schema 12. Sinteza 1-(5-(benzo[d]tiazol-2-il)furan-2-il)etanolilor, *rac-3a-d* și a 1-(5-(benzo[d]tiazol-2-il)furan-2-il)etil acetatilor *rac-4a-d* racemici.

4.2.2. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a racemicilor *rac-3a-d* și *rac-4a-d*

Pentru a investiga stereoselectivitatea rezoluției cinetice enzimaticе, precum și activitatea enzimelor, în prima etapă au fost separați cromatografic enantiomerii racemicilor *rac-3,4a-d*. În scopul obținerii produșilor rezoluției cinetice cu excese enantiomerice ridicate, s-a folosit drept compus model alcoolul racemic 1-(5-(benzo[d]tiazol-2-il)furan-2-il)etanol, *rac-3a*. Lipazele utilizate au fost testate în diverși solvenți organici în reacția de acilare enantiomer selectivă a alcoolului racemic *rac-3a* cu acetat de vinil (5 echivalenți) și alcooliza acetatului racemic *rac-4a* în metanol, etanol, propanol și butanol (8 echiv) (Schema 13).



Schema 13. Sinteza și rezoluția cinetică enzimatică a etanolilor racemici 1-(5-(benzo[d]tiazol-2-il) furan-2-il) *rac-3a-d* și acetatilor lor corespunzători *rac-4a-d*.

Datorită solubilității reduse a heteroaril etanolului *rac-3a* în acetatul de vinil acilarea enzimatică cu diferite lipaze a fost efectuată în acetonitril, în care solubilitatea substratului este cea mai mare. În urma testării enzimelor, comparând valorile exceselor enantiomerice, conversiei și raportului enantiomeric, s-a constatat că Novozyme 435 (lipază B din *Candida antarctica*, CaL-B) a fost enzima cea mai activă și mai selectivă pentru acest scop.

Interesant este faptul că, deși în rezoluția cinetică și dinamică a cianhidrinelor furilbenzotiazolice¹⁴¹⁴ lipaza A din *Candida antarctica*, (CaL A) este mai eficientă, pentru acilarea enzimatică a *rac-3a* activitatea acesteia a fost mai mică, decât cea a CaL B.

În etapa următoare folosind enzima cea mai eficientă, a fost testat efectul solventului pentru acilarea enzimatică a *rac-3a* catalizată de CaL-B. Doar un număr mic de solvenți organici s-au dovedit a fi utili, deoarece solubilitatea substraturilor în ceilalți solvenți a fost foarte mică. S-a observat o influență puternică a solventului asupra vitezei de reacție, în timp ce selectivitatea a fost ridicată în cele mai multe cazuri. Acetonitrilul s-a dovedit a fi cel mai adecvat solvent (ee și viteză de reacție mari) pentru acilarea enzimatică a *rac-3a*. (Tabelul 10, nr. 1).

Tabelul 10. Influența naturii solventului asupra acilării *rac-3a* cu vinil acetat (8eq), mediată de CaL B, după 3 h.

Nr.crt.	Solvent	c (%)	ee _P (%)	ee _S (%)	E
1	Acetonitril	50	> 99.5	98	»200
2	t-BME	49	> 99.5	95	»200
3	Toluen	47	> 99.5	90	»200
4	1,4-Dioxan	16.4	> 99.5	19.6	> 200
	Cloroform	38.4	> 99.5	62.3	»200

Aceeași procedură de investigare a fost aplicată și pentru restul substraturilor diferit substituie *rac-3b-d* constatându-se că metoda optimă este aceeași ca și în cazul *rac-3a*.

Folosind datele din literatură, prezentate în Capitolul 2.3.2. pentru a obține ambi enantiomeri ai substraturilor respectiv (*R*)-1-heteroariletanoli (*R*)-**3a-d** și (*S*)-1-heteroariletii acetati (*S*)-**4a-d** prin rezoluție cinetică enzimatică, în continuare a fost investigată la scară analitică alcooliza 1-(5-(benzo[*d*]tiazol-2-il)furan-2-il)etil acetatilor racemici *rac-4a-d*. In procesul de optimizare a alcoolizei enzimaticice s-au folosit diverse cantități (2, 4, 6, 8, 10 echivalenți) de metanol, etanol, propanol, butanol, în solvenți utilizați la acilarea enzimatică. Interesant a fost faptul că numai enzima Cal-B a fost catalitic activă. Alcooliza catalizată de toate celelalte lipazele care au manifestat activitate în acilarea enzimatică (CaL-A, LPS, LAK, CCL și CRL), nu a avut loc. Natura și concentrația nucleofilului are o influență puternică asupra selectivității Cal-B în alcooliza catalizată de această enzimă. Cele mai bune rezultate au fost obținute la utilizarea a 8 echiv de metanol în acetonitril, așa cum arată rezultate selectate din procedura de investigare a metanolizei enzimaticice a *rac-4a*.

Condițiilor optime stabilite pentru metanoliza enzimatică a *rac-4a* a fost verificată prin aplicarea aceleași proceduri de screening și la alți acetati racemici *rac-4b-d*. Așa cum era de așteptat, metanoliza catalizată de CAL B (8 echiv) în acetonitril s-a dovedit a fi cea mai selectivă metodă. În toate cazurile la conversie de 50%, au fost obținute valori ridicate ale exceselor enantiomerice ee atât pentru produs cât și pentru enantiomerul nereacționat al substratului, arătând astfel activitatea și enantioselectivitatea înaltă a enzimei CaL-B în acetonitril față de derivați 1-(5-(benzo[*d*]tiazol-2-il)furanului investigați (Tabelul 16).

4.2.3. Sinteza (R)-, (S)-3a-d și (R)-, (S)-4a-d la scară preparativă

Procedura optimă stabilită la scară analitică, a fost aplicată la scară preparativă pentru ambele rezoluții enzimatică a *rac*-1-heteroariletanolilor, *rac*-3a-d și la etil acetati corespunzătoare *rac*-4a-d. Concentrațiile, raportul substrat - biocatalizator și condițiilor de reacție au fost aceleași ca și în cazul reacțiilor la scară analitică. Reacțiile au fost monitorizate prin cromatografie la HPLC (Figura 6, 7 exemple) și pe TLC și au fost oprite la conversii de aproximativ 50%, îndepărtând enzima prin filtrare. Date privind randamentele, excesele enantiomerice și rotația optică a enantiomerilor obținuți sunt prezentate în Tabelul 13.

Identitatea și puritatea compușilor au fost determinate prin spectroscopie ¹H-RMN și de masă MS.

Tabelul 13. Valorile randamentelor, exceselor enantiomerice, rotațiilor specifice ale produșilor rezoluțiilor cinetice catalizate de Cal B, la scară preparativă.

Nr.crt.	Produs	c.(%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25*}$	Produs	c(%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25**}$
1 ^a	(S)-3a	49	> 99.5	-28.3	(R)-4a	49	> 99.5	+ 97
2 ^a	(S)-3b	48	98	-40.3	(R)-4b	49	99	+ 92.9
3 ^a	(S)-3c	49	99	-18.7	(R)-4c	49	99	+109.5
4 ^a	(S)-3d	49	> 99.5	- 12.8	(R)-4d	47	> 99.5	+87.5
5 ^b	(R)-3a	49	> 99.5	+ 31.1	(S)-4a	48	> 99.5	-107
6 ^b	(R)-3b	47	98	+ 42.7	(S)-4b	49	99	-97
7 ^b	(R)-3c	48	98	+ 19.8	(S)-4c	48	98	-103.4
8 ^b	(R)-3d	50	> 99.5	+10.3	(S)-4d	37	99	-94.3

^a produși obținuți prin acilare enzimatică

^b produși obținuți prin alcooliză enzimatică

* $[\alpha]_D^{25}$ valori pentru c = 0.5 mg/ml

** $[\alpha]_D^{25}$ valori pentru c = 0.25 mg/ml

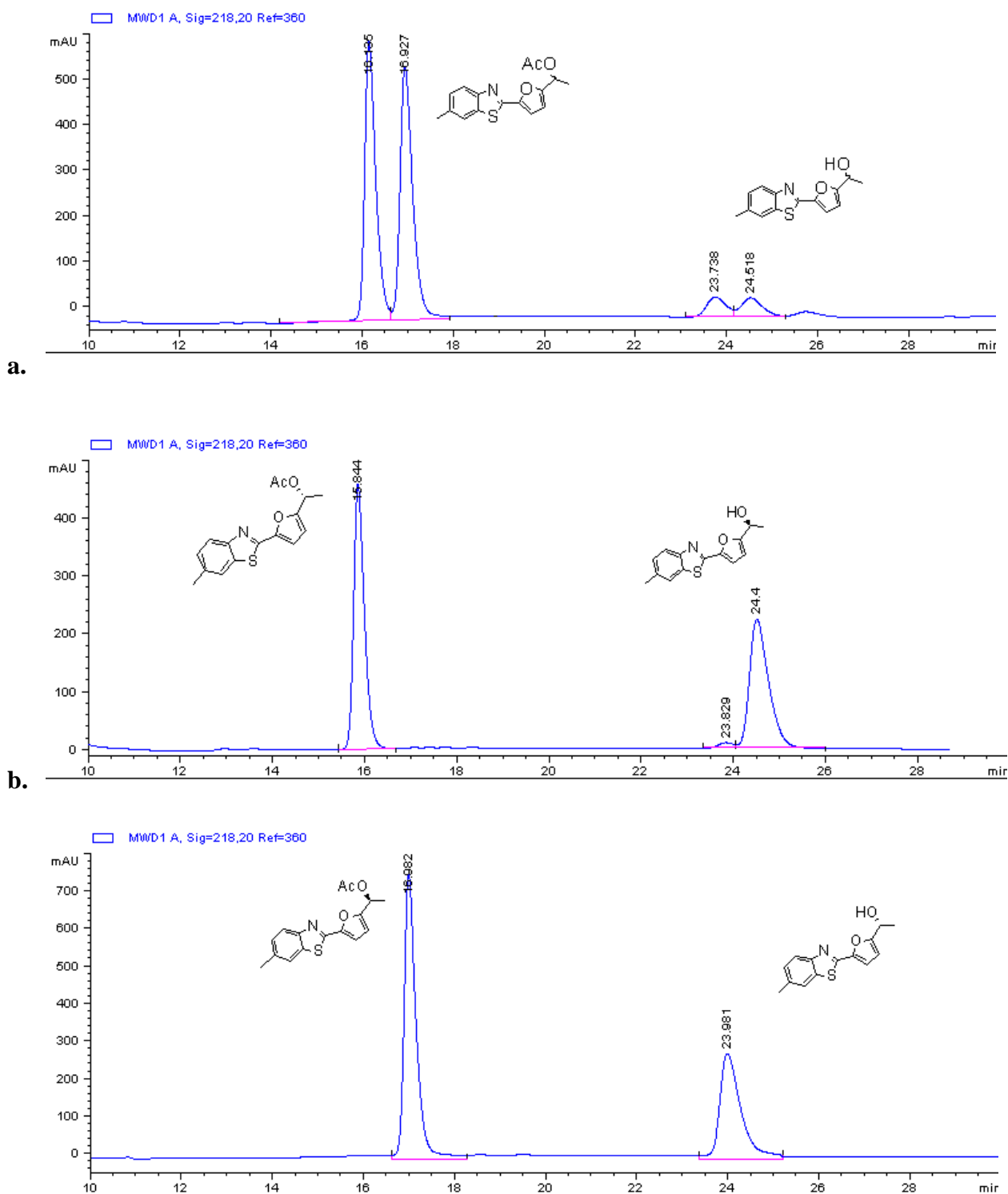


Figura 7. Diagrama de eluție corespunzătoare:

- a.** *rac-3d*, **a.** reacției enzimatic de acilare a după a *rac-3d* după 2 ore, **b.** reacției enzimatic de alcooliză a racemicului *rac-3d* după 5 ore.

4.2.4. Determinarea configurației absolute a produșilor obținuți prin rezoluție cinetică

Configurația absolută a produșilor obținuți prin rezoluția cinetică mediată de lipază²⁶ poate fi atribuită conform regulii empirice a lui Kazlauskas²⁷. Regula afirmă că enantiomerul (*R*)-reacționează mai rapid în timpul rezoluției cinetice a alcoolilor chirali secundari. Cu toate acestea, până în prezent au fost raportate câteva excepții de la această regulă²⁸.

Metoda Mosher se bazează pe anizotropia magnetică a nucleului fenil din structura părții Mosher a conjugatului cu alcoolul secundar. Metoda presupune un studiu detaliat al spectrelor ¹H-RMN ale conjugăților diastereomerici obținuți prin esterificarea enantiomerilor (*R*)- și (*S*)- ai alcoolului cu enantiomerii (*R*)- și (*S*)- ai MTPA. În Figura 8 se prezintă conformațiile conjugăților diastereomerici (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA și (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA în care se evidențiază efectele anizotropiei aromatice dintr-o structură (mosher/alcoolică) asupra protonilor atașați carbonului adiacent centrului stereogenic din structura conjugată (alcoolică Mosher).

Deplasările chimice ale protonilor din structura esterilor diastereomerici sunt influențate de prezența, respectiv absența efectului diamagnetic exercitat de gruparea fenil a fracțiunii Mosher asupra protonilor proximali²⁹.

Conjugații diastereomerici au fost obținuți prin acilarea (*R*)- și (*S*)-alcoolilor *rac*-**3b** cu clorura acidului Mosher [(*R*)-MTPA-Cl]³⁰, în prezența DMAP.

Asa după cum s-a arătat, modificările în spectrele ¹H-RMN ale diastereomerilor (*R*)-**2b**-(*S*)-MTPA și (*S*)-**3**-(*S*)-MTPA sunt cauzate nu doar de influența fenilului fracțiunii Mosher asupra protonilor -CH₃ ai alcoolului, ca în situația discutată mai sus (Figura 8a), ci, suplimentar, și de influența heteroarilului alcoolului asupra protonilor -OCH₃ din fracțiunea Mosher (Figura 8b). Protonii -CH₃, a căror semnal de rezonanță este un dublet, și respectiv protonii -OCH₃ cu semnal de rezonanță *singlet* au fost utilizați pentru analiza configurațională a diastereoizomerilor obținuți. Diferențele între deplasările chimice ale acestor protoni în spectrele celor doi esteri permit atribuirea corectă a configurației absolute a noilor alcooli enantiomerici.

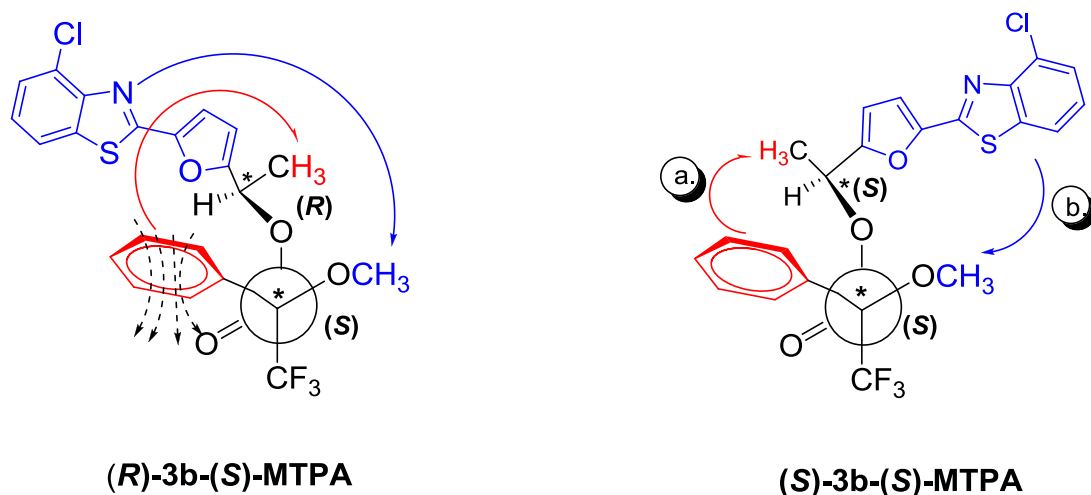


Figura 8. Efectul diamagnetic aromatic în structurile derivaților diastereomerilor (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA și (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA

Esterificarea are loc selectiv, obținându-se un amestec al esterilor Mosher corespunzători în raport de 1,7:1, în acord cu observația anterioară a lui Heathcock³¹ (Figura 9). Noi am remarcat faptul că, în funcție de împiedicarea sterică ce implică gruparea -OH, distribuția inegală a esterilor Mosher corespunzători nu este observată întotdeauna³². Selectivitatea poate fi explicată prin repulsia sterică existentă între fracțiunea heteroaril a compusului **3b** și gruparea fenil a omologului MTPA în cazul diastereomerului (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA. În schimb, în cazul (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA, grupările heteroaril și fenil nu sunt foarte apropiate (Figura 8).

Prin urmare, pe baza selectivității esterificării, semnalele protonilor din spectrele ¹H-RMN ale celor doi diastereomeri, (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA și (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA, pot fi atribuite în mod clar, după cum urmează:

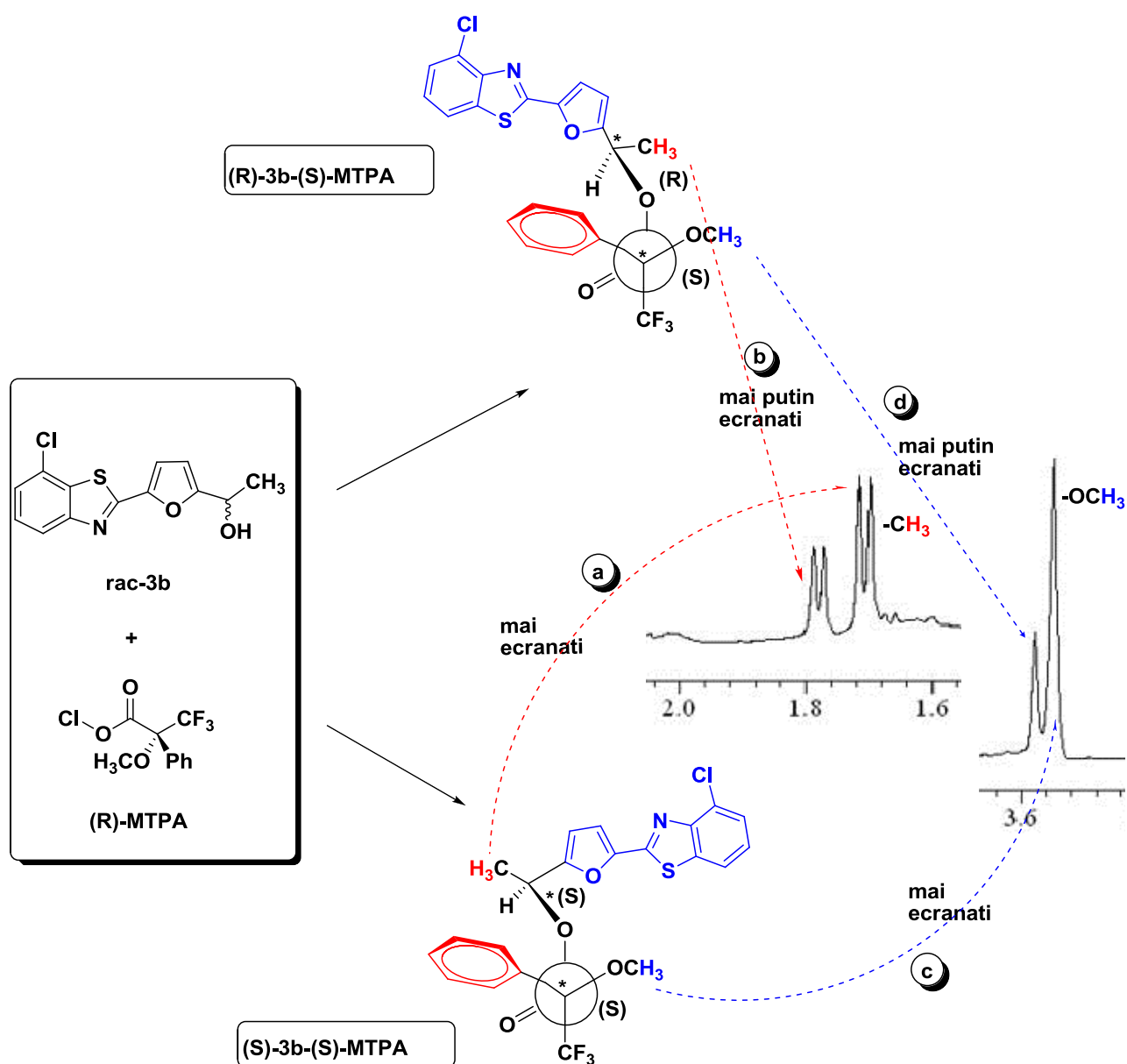
- semnalele protonilor -CH₃, respectiv -OCH₃ au intensitate mare ($\delta = 1,70$ ppm și $\delta = 3,54$ ppm) în compusul (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA (Schema 15 a, c)
- semnalele mai puțin intense ale aceleiași protoni ($\delta = 1,78$ ppm și $\delta = 3,58$ ppm) aparțin diastereomerului (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA (Schema 15 b, d).

După cum se vede în schema 15 a, b, protonii -CH₃ sunt mai ecranați ($\delta_{\text{CH}_3} = 1,70$ ppm) în cazul (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA decât în cazul (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA ($\delta_{\text{CH}_3} = 1,78$ ppm), la care distanța dintre grupările fenil și metil este mai mare. Efectul diamagnetic puternic al inelului fenil determină rezonanța protonilor proximali ai -CH₃ la câmpuri mai înalte³³.

Protonii grupării -OCH₃ ai (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA sunt, de asemenea, mai ecranați, $\delta_{\text{OCH}_3} = 3,54$ ppm, comparativ cu analogii lor din (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA, $\delta_{\text{OCH}_3} = 3,58$ ppm. Acest lucru se datorează

efectului diamagnetic al inelului heteroaril proximal (Schema 15c, d). În acest caz, datorită distanței mari dintre gruparea $-OCH_3$ și heteroaril, efectul diamagnetic al acestuia este mai redus, așa cum o arată diferența mai mică între valorile deplasărilor chimice δ ($\Delta\delta_{CH_3} = 0,08$ ppm, respectiv $\Delta\delta_{OCH_3} = 0,04$ ppm).

O confirmare suplimentară a configurației absolute a enantiomerilor alcoolului vine din rezultatele reacției de esterificare cu clorură (*R*)-MTPA a alcoolului **3b** optic pur rămas netransformat în urma reacției de acilare catalizate de CaL-B. Conform regulii lui Kazlauskas, produsul acestei reacții ar trebui să fie esterul (*S*)-MTPA-(*S*)-**3b**. Similitudinea între spectrele 1H -RMN al compusului obținut și respectiv al diastereomerului (*S*)-MTPA-(*S*)-**3b** obținut prin esterificarea *rac*-**3b** cu (*R*)-MTPA confirmă configurația prezisă de regula lui Kazlauskas.



Schema 15. Efectul de ecranare al grupărilor fenil și heteroaril asupra protonilor -CH₃, respectiv -OCH₃, ai esterilor (*R*)-**3b**-(*S*)-MTPA și (*S*)-**3b**-(*S*)-MTPA

Configurația absolută pentru restul compușilor a fost stabilită comparând semnele rotațiilor optice cu cele specifice (+)-(*S*)-**3b**.

5. Concluzii

Au fost sintetizați o serie de 4 noi fenilfuran-2-il-etanoli (*S*)- **2a-d** prin reacții mediate de drojdie. Procedura a condus la obținerea enantiomerilor (*S*)- ai alcoolilor cu randament moderat până la ridicat.

A fost observat și investigat efect puternic al substituentului inelului fenilic în comparație cu rezultatele obținute anterior la sinteza fenilfuran-2-il-etandiolilor, compuși noi prin bioreducere catalizată de drojdie.

Rezoluția cinetică enzimatică a etanolilor racemici pe bază de furilbenzotiazoli *rac*-**3a-d** și acetaților acestora *rac*-**4a-d** este o metodă eficientă.

Ambele procese, acilare și alcooliză enzimatică au fost eficiente în acetonitril. Utilizând ca și catalizator enzima Cal-B, s-au obținut excese enantiomerice ridicate ale compuși țintă 8 noi alcooli heterociclici (*R*)-, (*S*)-**3a-d** și 8 noi acetați corespunzători (*R*)-, (*S*)-**4a-d**.

Configurația absolută a produșilor obținuți a fost determinată printr-un studiu detaliat spectrelor ¹H-RMN a derivaților Mosher a *rac*-**3b** and (*S*)-**3b**.

7. Testarea activității biologice a 1-(5-(6-metilbenzo[*d*]tiazol-2-il)furan-2-il)etil acetatului *rac*-4d și (*S*)-, (*R*)- 4d

7.1. Material și metode

7.1.1. Material biologic

Animalele de experiență au fost șobolani albi Wistar, masculi adulți, în greutate de 200±20 g, menținuți pe tot parcursul experimentului în biobaza Catedrei de Biologie Experimentală a Facultății de Biologie și Geologie, în condiții zooigienice corespunzătoare: temperatură și umiditate constantă, ritm lumină/întuneric 12/12 ore, dietă Larsen (cu sau fără adaos de FBT), acces liber la apă, respectiv la soluția de etanol.

7.1.2. Protocol experimental

Cercetările noastre au fost efectuate pe un model experimental *in vivo*, în care animalelor li s-a administrat:

1. furilbenzotiazolul (FBT, enantiomerul R, respectiv S).

Administrarea FBT s-a făcut prin amestecarea substanței în furaj:

- 400 mg/kg de furaj, pentru fiecare enantiomer;

Dozele au fost astfel calculate încât să corespundă la 20 mg/kg corp/zi.

Durata experimentului a fost de 15 zile.

Șobolani au fost grupați în 3 loturi: martor **M** (n=10), **FBT-R** (n=10), **FBT-S** (n=10).

2. în paralel etanol și FBT.

Etanolul a fost administrat zilnic, timp de 30 de zile, ca soluție 10% (v/v) în apa de băut.

Administrarea FBT (enantiomerii R și S, respectiv racemicul) s-a făcut prin amestecarea substanței în furaj, în următoarele doze:

- 400 mg/kg de furaj, pentru fiecare enantiomer;

- 800 mg/kg de furaj, pentru racemic.

- 20 mg/kg corp/zi pentru enantiomeri, respectiv 40 mg/kg corp/zi pentru racemic.

FBT a fost introdus în dieta animalelor începând cu ziua a 16-a a experimentului, pentru următoarele 15 zile.

Șobolani au fost grupați în 5 loturi: martor **M** (n=5), **EtOH** (n=5), **(EtOH-R)** (n=5), **(EtOH-S)** (n=5), **(EtOH-Rac)** (n=5).

Durata experimentului a fost de 30 de zile, după care animalele au fost sacrificate și s-a recoltat sângele, precum și probe de țesut hepatic, pentru determinări morfologice și biochimice.

7.2. Rezultate și discuții

7.2.1. Efectele administrării de furil-benzotiazol (enantiomerii R și S) la șobolani

7.2.1.1. Parametri hematologici

Numărul hematiilor, la șobolanul adult, variază între 6 și 10×10^6 celule/ mm^3 de sânge. În varianta noastră experimentală, valorile medii pe lot s-au situat în limitele normale (tabelul 15). O tendință de creștere (cu 14,4%) a numărului de hematii a fost înregistrată la lotul FBT-R, creșterea devenind semnificativă statistic sub influența enantiomerului (S)- (+19,66%).

Hematocritul s-a încadrat între limitele normale pentru șobolanul adult (35,5-43,6%) și nu a prezentat variații semnificative între loturi.

Se impune concluzia că, în doza administrată, FBT nu a avut efecte negative asupra parametrilor sanguini ce caracterizează hematiile.

Tabelul 15. Variația unor parametri hematologici (ai hematiilor) la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		<i>M</i>	<i>FBT-R</i>	<i>FBT-S</i>
Nr. de hematii (nr. $\times 10^6/\text{mm}^3$)	$\bar{x} \pm \text{ES}$	7,12 \pm 0,39	8,17 \pm 0,47	8,52 \pm 0,46
	n	10	10	10
	p (M)		$>0,05$ NS	$< 0,05^*$
Hemoglobina (g/dL)	$\bar{x} \pm \text{ES}$	19,92 \pm 1,66	19,24 \pm 0,66	20,23 \pm 1,86
	n	10	10	10
	p (M)		$>0,05$ NS	$>0,05$ NS
Hematocritul (%)	$\bar{x} \pm \text{ES}$	41,05 \pm 0,69	41,43 \pm 0,72	41,47 \pm 0,51
	n	10	10	10
	p (M)		$>0,05$ NS	$>0,05$ NS

$\bar{x} \pm \text{ES}$ = media \pm eroarea standard; n = nr. de indivizi/lot; p (M) = semnificația statistică față de lotul martor; steluțele marchează diferențe semnificative statistic față de lotul martor, astfel: $p < 0,05$ - * ; $p < 0,01$ - ** ; $p < 0,001$ - ***.

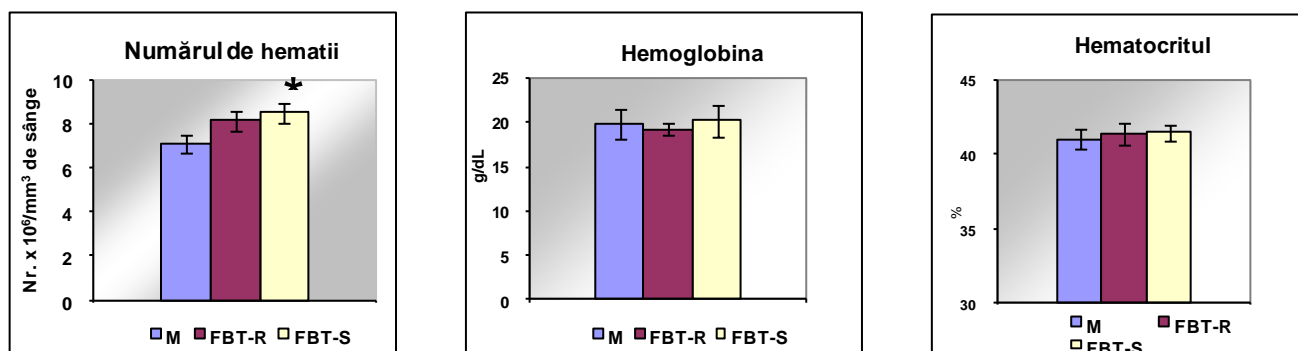


Figura 10. Variația unor parametri hematologici (ai hematiilor) la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

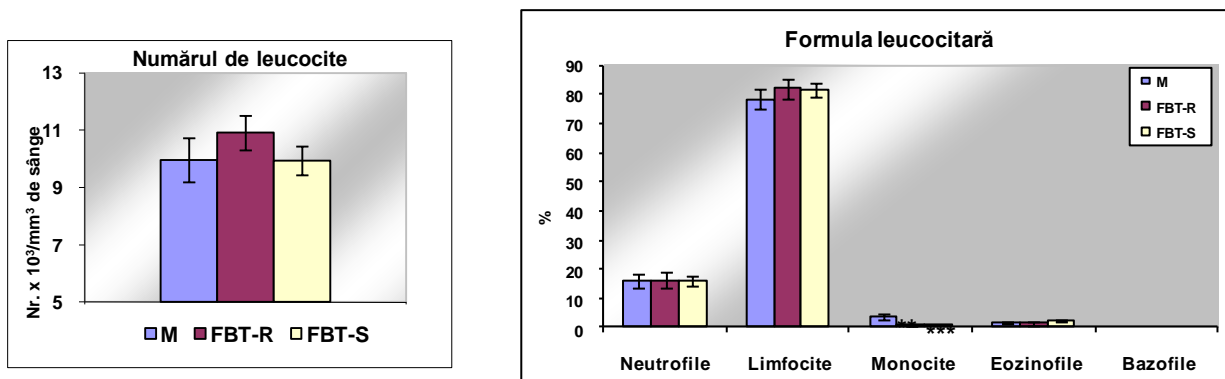


Figura 11. Variația unor parametri hematologici (leucocite, formula leucocitară) la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

La șobolanul matur, numărul leucocitelor variază între 8 și 12×10^3 celule/mm³ de sânge. Valorile obținute în acest experiment (tabelul 16, fig. 11) se încadrează între aceste limite, cu o ușoară creștere (+9,5%) la lotul FBT-R, comparativ cu lotul de control.

A fost remarcată, la loturile tratate cu ambii enantiomeri ai FBT, o creștere a ponderii limfocitelor însoțită de o scădere semnificativă a procentului de monocite circulante. Scăderea procentului de monocite este urmarea fixării acestora în număr mai mare în sinusoidale țesutului hepatic, ca reacție la sarcina metabolică suplimentară reprezentată de adăugarea în hrană a FBT.

7.2.1.2. Parametri biochimici

Glicemia șobolanilor adulți este cuprinsă între 70 și 90 mg%³⁴, limite între care se încadrează și media lotului de control din experimentul nostru (tabelul 3, fig. 3). Enantiomerul R al FBT a determinat o scădere cu 12,25% a glicemiei, neasigurată statistic, în timp ce în cazul enantiomerului S reducerea glicemiei a fost semnificativă, de 26,39%. Concentrațiile glucozei și glicogenului hepatic au fost de asemenea reduse, la ambele loturi tratate cu FBT.

Într-un experiment pe microsomi hepatici, Su și colab. (2006)³⁵ au demonstrat proprietatea hipoglicemiantă a unor derivați benzotiazolici. Un studiu *in vivo* pe șobolani obezi a demonstrat eficiența unor compuși benzotiazolici în reducerea consumului de glucoză și a greutateii corporale³⁶.

În ceea ce privește furil-benzotiazolul sintetizat și testat de noi, este utilă continuarea cercetărilor privind capacitatea hipoglicemiantă a enantiomerului S pe un model experimental de diabet streptozotocinic.

Tabelul 17. Variația glicemiei, a concentrației glucozei și glicogenului din țesutul hepatic la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		M	FBT-R	FBT-S
Glicemie (mg glucoză /dL)	x±ES	72,94±5,28	64,02±4,23	53,69±3,69
	n	10	10	10
	p (M)		>0,05 NS	<0,01**
Glucoză (mg/g țesut)	x±ES	2,46±0,34	1,93±0,11	1,96±0,18
	n	8	10	8
	p (M)		>0,05 NS	>0,05 NS
Glicogen (mg/g țesut)	x±ES	1,88±0,31	1,18±0,20	1,24±0,11
	n	10	10	10
	p (M)		< 0,05*	< 0,05*

Date recente^{37, 38} (2011) semnaleză capacitatea unor compuși benzotiazolici de a reduce nivelurile trigliceridelor și colesterolului plasmatic. În experimentul nostru, numai enantiomerul S a produs o scădere neasigurată statistic, cu 6% a colesterolului total seric, în condițiile în care compusul, neoptimizat din punct de vedere al biodisponibilității, a fost administrat în furajul animalelor normale (tabelul 18, fig. 13). În aceleași condiții, s-a înregistrat o creștere semnificativă a colesterolului hepatic, cu ambii enantiomeri, dar mai mare în cazul FBT-S. Deoarece în acest experiment a fost determinat numai colesterolul total, nu putem afirma predominanța fracțiunii HDL sau a LDL. În orice caz, putem suspecta un turnover scăzut al colesterolului hepatic.

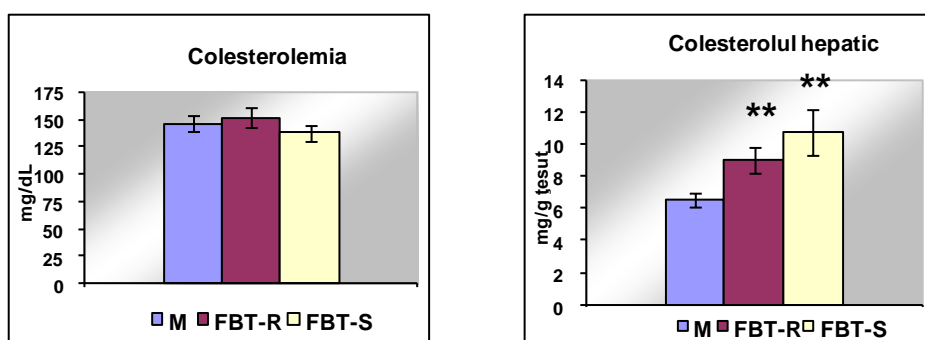


Figura 13 Variația colesterolemiei și concentrației colesterolului hepatic la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

Ambii enantiomeri ai FBT au crescut concentrația proteinelor totale hepatice (valori neasurate statistic), în cazul enantiomerului S înregistrându-se o creștere de 10%. Pe de altă parte, proteinemia a înregistrat o scădere la ambele loturi tratate, semnificativă (+15%) în cazul

enantiomerului S al FBT (tabelul 19 și fig. 14). Rezultatele obținute se datorează unei ușoare inhibări a exportului proteinelor.

Tabelul 19. Variația concentrației proteinelor din ser și țesutul hepatic la șobolani tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		M	FBT-R	FBT-S
Proteine serice (g/dL)	x±ES	5,14±0,29	4,68±0,32	4,36±0,24
	n	10	10	10
	p(M)		>0,05 NS	<0,05*
Proteine hepatice (mg/g țesut)	x±ES	364,79±19,7	400,85±25,0	403,81±18,7
	n	10	10	10
	p(M)		>0,05 NS	>0,05 NS

7.2.1.3. Parametri enzimatici

Catalaza. Dată fiind localizarea intracelulară a enzimei activitatea sa în ser este una reziduală, enzima provenind din țesuturi, ca urmare a modificării permeabilității membranelor plasmaticе, respectiv a destrucțiilor membranare. Prin urmare, o prezență scăzută a enzimei în ser, așa cum s-a înregistrat la lotul FBT-S (tabelul 23 și fig. 18), este dovada unei stabilități membranare crescute.

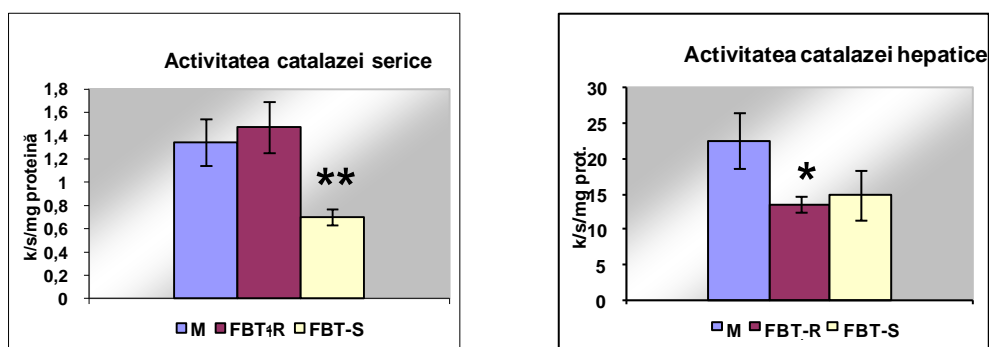


Figura18. Activitatea catalazei serice și hepatice la șobolani tratați cu furilbenzotiazol.

Activitatea CAT în țesutul hepatic a fost redusă cu 40% și respectiv cu 35% în prezența enantiomerilor R și S ai FBT, comparativ cu valoarea medie de la lotul martor. Cum enzima este indusă proporțional cu cantitatea de substrat (H₂O₂) produsă în metabolismul oxidativ, putem presupune că sinteza CAT este redusă ca urmare a unei producții scăzute de H₂O₂.

Superoxid dismutaza. Deoarece reacția catalizată de SOD oferă substrat (H_2O_2) catalazei, între activitățile celor două enzime ar trebui să existe o relație de proporționalitate. Acest aspect este evident în cazul experimentului nostru (tabelul 24 și fig. 19): SOD serică este redusă semnificativ, cu 45%, la lotul FBT-S, iar activitatea SOD hepatică este scăzută semnificativ la ambele loturi tratate cu FBT, mai pregnant în cazul FBT-R.

Tabelul 24. Superoxid dismutaza serică și hepatică la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		M	FBT-R	FBT-S
SOD serică (USOD/ml/min)	x±ES	0,86±0,08	0,82±0,14	0,48±0,09
	n	10	10	10
	p (M)		>0,05 NS	<0,01**
SOD hepatică (USOD/mgp roteină/min)	x±ES	3,91±0,57	1,66±0,12	2,42±0,55
	n	10	10	10
	p (M)		<0,001***	<0,05*

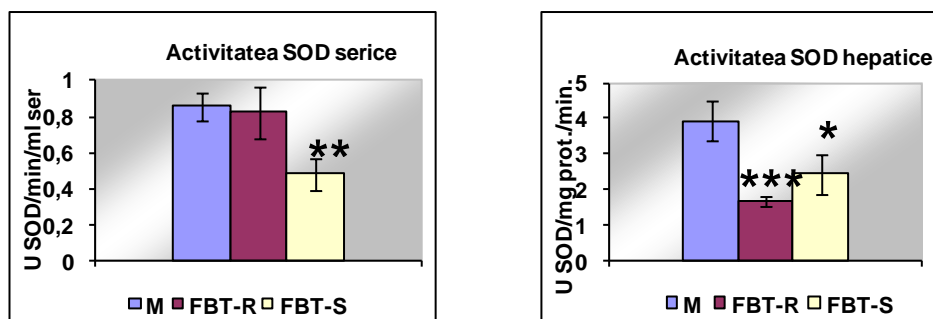


Figura. 19. Activitatea superoxid dismutazei serice și hepatice la șobolanii tratați cu furilbenzotiazol.

7.2.1.4. Concluzie

Acest experiment preliminar, privind acțiunea biologică a FBT sintetizat de noi asupra organismului normal de mamifer, a evidențiat următoarele:

- creșterea numărului de hematii;
- scăderea monocitelor circulante, probabil ca urmare a transformării lor în macrofage fixate ale ficatului;
- scăderea glicemiei și a glicogenului hepatic, ceea ce face din această substanță un candidat interesant pentru dezvoltarea de medicamente antidiabetice;
- lipsa efectelor nocive asupra turnover-ului proteic și asupra enzimelor marker ale integrității membranare;
- o producție scăzută de radicali liberi.

Efectele cele mai semnificative au fost observate în cazul enantiomerului S.

7.2.2. Efectele administrării de furil-benzotiazol *rac*, enantiomerii (*R*)- și (*S*)- la șobolani intoxicați subcronic cu etanol

Deoarece există semnalări privind acțiunea antioxidantă și citoprotectoare a furanilor în cazul intoxicațiilor cu lipopolizaharide, precum și proprietățile antiinflamatoare ale benzotiazolilor³⁷, am considerat interesant de urmărit efectele FBT pe un model experimental de etilism subcronic.

7.2.2.1. Parametri hematologici

Numărul de hematii a crescut semnificativ sub influența etanolului, fenomen întâlnit și în alte experimente similare. Creșterea numărului de hematii reprezintă o încercare de adaptare a organismului pentru suplinirea necesității crescute de O₂. Cei doi enantiomeri și amestecul racemic au readus numărul de hematii la valori apropiate de cele ale martorului (tabelul 25, fig.20).

Tabelul 25. Variația unor parametri hematologici (ai hematiilor) la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		M	EtOH	EtOH-R	EtOH-S	EtOH-Rac
Nr. de hematii (nr. x 10 ⁶)	x±ES	9,53±0,50	12,24±0,98	9,32±0,37	9,66±0,82	9,80±0,32
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		< 0,05*	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
	p ₂ (EtOH)			< 0,05*	< 0,05*	< 0,05*
Hemoglobina (g/dL)	x±ES	17,01±0,71	14,04±1,52	17,35±0,97	17,48±0,75	18,54±0,47
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05NS	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05NS
	p ₂ (EtOH)			>0,05 NS	< 0,05*	< 0,05*
Hematocritul (%)	x±ES	44,98±0,36	45,62±1,23	46,01±0,97	45,94±1,00	45,84±0,42
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
	p ₂ (EtOH)			>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS

x±ES = media±eroarea standard; n = nr. de indivizi/lot; p₁ (M) = semnificația statistică față de lotul martor; p₂ (EtOH) = semnificația statistică față de lotul tratat cu etanol. Steluțele negre marchează diferențe semnificative statistic față de lotul martor; steluțele roșii marchează diferențe semnificative față de lotul EtOH.

Cei doi enantiomeri ai acetil-furilbenzotiazolului readuc concentrația hemoglobinei la valori aproape identice cu cele de la martor, în timp ce racemicul a determinat o ușoară creștere a concentrației de hemoglobină peste valoarea martorului, dar în limite fiziologice.

Numărul de leucocite s-a modificat semnificativ atât față de martor, cât și față de lotul cu EtOH numai sub influența enantiomerului (S)- al compusului studiat. Aceste modificări nu sunt benefice organismului, reducerea numărului de leucocite însemnând o deprimare a funcției imunitare. Enantiomerul (S)- a avut un efect clar imunosupresor care s-a suprapus acțiunii EtOH. Amestecul racemic s-a comportat diferit față de cei doi enantiomeri, numărul de leucocite în cazul lotului EtOH-Rac fiind foarte apropiat de cel al martorului.

Cei doi enantiomeri prezenți în racemic au determinat o scădere potențială a reacției inflamatorii (număr scăzut de neutrofile), o creștere a reacției imune specifice (prin limfocite) și o reactivitate a monocitelor asemănătoare cu a lotului martor.

7.2.2.2. Parametri biochimici

Glicemia nu a suferit modificări semnificative la nici unul dintre loturi (tabelul 27, fig.22). Creșterea a glucozei tisulare sub influența EtOH a fost accentuată semnificativ de acetil-furilbenzotiazolul, atât ca enantiomeri separați cât și ca amestec racemic.

Dacă la animalele normale FBT, în special enantiomerul (S)-, a avut un net efect hipoglicemiant și de scădere a depozitelor glucidice, pe fondul intoxicației etilice efectul a fost opus.

Colesterolemia a suferit modificări evidente la toate loturile tratate (Tabelul 28, Fig.23): dacă valorile loturilor EtOH și EtOH-R sunt semnificativ scăzute față de lotul martor, loturile EtOH-S și EtOH-Rac se remarcă prin valori semnificativ scăzute atât față de martor cât și față de lotul cu EtOH. Reiese de aici caracterul hipocolesterolemiat al enantiomerului (*S*)- și al racemicului, fapt semnalat în literatură și pentru alți benzotiazoli³⁷ (2011).

Colesterolul total hepatic a crescut semnificativ numai la lotul tratat cu racemic, comparativ cu valoarea scăzută sub influența EtOH.

Tabelul 27. Variația concentrației glicemiei și glucozei și glicogenului din țesutul hepatic la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		M	EtOH	EtOH-R	EtOH-S	EtOH-Rac
Glicemie (mg glucoză /dL)	x±ES	206,72±20,11	214,53±18,11	232,85±22,24	249,66±31,50	245,92±26,27
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
	p ₂ (EtOH)		>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
Glucoză (mg/g țesut)	x±ES	12,92±4,31	19,46±4,59	30,84±5,01	29,29±5,81	30,18±6,33
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05 NS	< 0,05*	< 0,05*	< 0,05*
	p ₂ (EtOH)			>0,05NS	>0,05 NS	>0,05 NS
Glicogen (mg/g țesut)	x±ES	0,92±0,07	0,78±0,21	1,68±0,32	2,38±0,54	1,79±0,17
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05 NS	< 0,05*	< 0,05*	< 0,001***
	p ₂ (EtOH)			< 0,05*	< 0,05*	< 0,01**

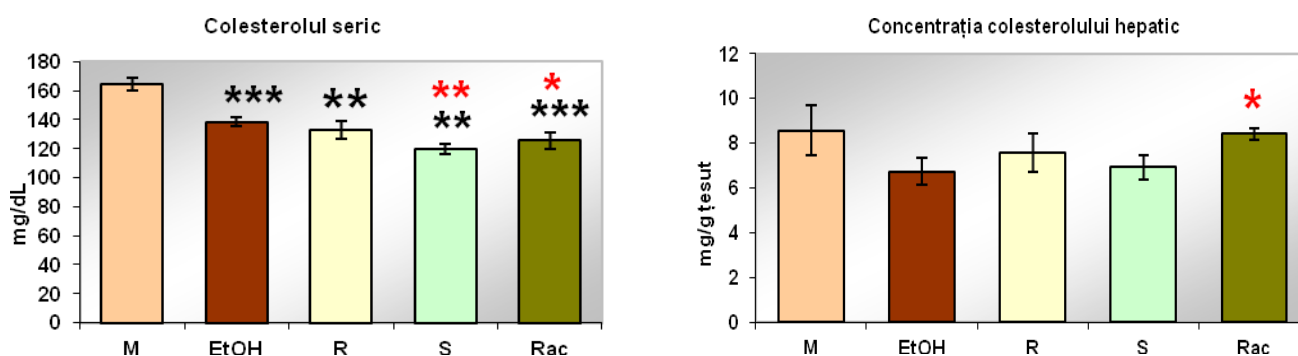


Figura 23. Variația colesterolemiei și concentrației colesterolului hepatic la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu furilbenzotiazol.

Proteinemia a suferit modificări semnificative numai în cazul EtOH-Rac, (tabelul 29, fig. 24) unde se remarcă o creștere accentuată datorată și unei sinteze accentuate a proteinelor hepatice. Acetil-furilbenzotiazolul, chiar administrat pe fondul de EtOH a stimulat sinteza proteinelor hepatice

(semnificativ în cazul enantiomerului (S)- și a racemicului) și exportul proteinelor din ficat în cazul racemicului (tabelul 29, fig. 24).

Tabelul 29. Variația concentrației proteinelor din ser și țesutul hepatic la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu furilbenzotiazol.

Loturi Parametri		M	EtOH	EtOH-R	EtOH-S	EtOH-Rac
Proteine serice (g/dL)	x±ES	6,89±0,07	7,46±0,92	7,40±0,91	7,44±1,10	9,21±1,30
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
	p ₂ (EtOH)			>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
Proteine hepatice (mg/g țesut)	x±ES	245,37±58,54	232,29±45,13	311,45±58,64	340,68±16,23	352,21±24,11
	n	5	5	5	5	5
	p ₁ (M)		>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS	>0,05 NS
	p ₂ (EtOH)			>0,05 NS	< 0,05*	< 0,05*

7.2.2.3. Parametri enzimatici

Enzime antioxidante. Rezultatele noastre privind activitatea catalazei în ser deși neasigurate statistic datorită numărului mic de animale utilizate demonstrează o activitate hemolitică intensă sub acțiunea etanolului (tabelul 33, fig.28), efect mult redus în prezența celor doi enantiomeri și mai ales în prezența racemicului. Aceste date se corelează cu concentrația hemoglobinei. Enantiomerii acetil-furilbenzotiazolului au stimulat activitatea catalazică, aducând-o la valori superioare martorului. În cazul racemicului creșterea este și mai evidentă și asigurată statistic, comparativ cu lotul tratat cu EtOH.

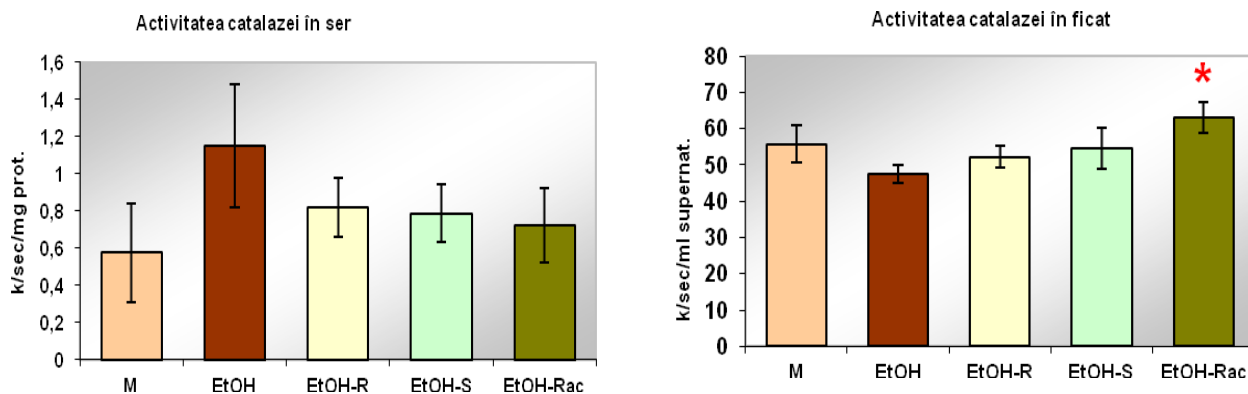


Figura 28. Activitatea catalazei serice și hepatice la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu furilbenzotiazol.

Inflamația produsă de EtOH în tratamentul subcronic a scăzut activitatea tisulară a SOD la toate cele patru loturi care au primit EtOH. Enantiomerii și racemicul acetil- furilbenzotiazolului nu au redus efectul etanolului în privința acestei enzime; enantiomerii (*R*)- și (*S*)- au scăzut și mai mult activitatea enzimei pe fondul etanolului, iar efectul lor cumulat este maxim în cazul lotului EtOH-Rac (tabelul 34, fig. 29).

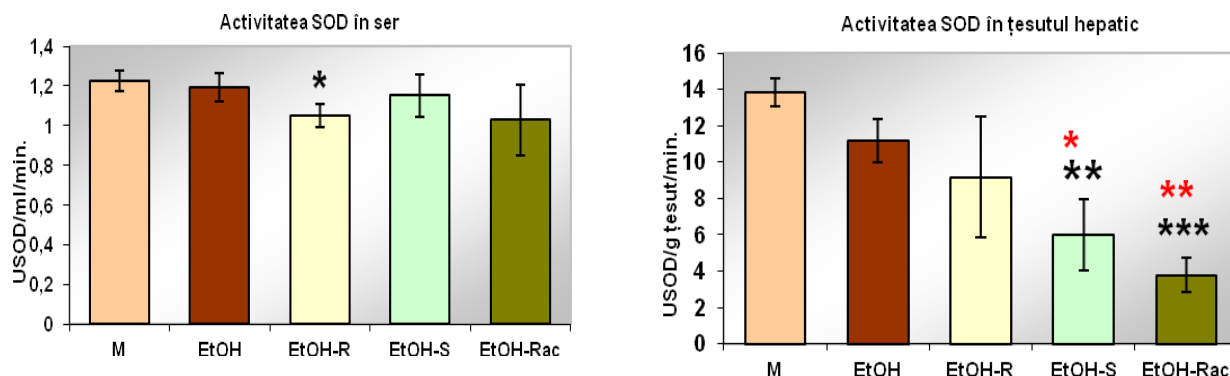


Figura 29. Activitatea superoxid dismutazei serice și hepatice la șobolanii intoxicați cu etanol și tratați cu furilbenzotiazol.

7.2.1.4. Concluzii

1. Efectul protector asupra parametrilor hematologici, exercitat de cei doi enantiomeri ai FBT și de amestecul racemic, s-a concretizat prin restaurarea la nivelul de control a unor parametri alterați de intoxicația etilică: numărul de hematii, concentrația hemoglobinei și hematocritul. Cu toate acestea, enantiomerul (*S*)- a menținut deprimarea funcției imunitare indusă de etanol (scăderea numărului de leucocite). Racemicul a redus reacția inflamatoare prin scăderea neutrofilelor și a stimulat imunitatea specifică prin creșterea numărului de limfocite.

2. La nivelul metabolismului glucidic, cele trei forme de FBT au determinat o încărcare a hepatocitelor cu glicogen, creșterea glicemiei și glucozei hepatice. Atât enantiomerii, cât și amestecul racemic au avut efect hipocolesterolemiant, cel mai evident în cazul enantiomerului (*S*)-. Sinteza hepatică a proteinelor a fost stimulată de toate cele trei forme ale FBT testate, comparativ cu lotul EtOH, valori semnificative fiind obținute în cazul enantiomerului *S* și a racemicului.

3. Creșterea activității ALAT și LDH serice, sub influența EtOH, a fost amplificată de prezența enantiomerilor și a racemicului FBT, ceea ce poate sugera o alterare (cel puțin incipientă) a permeabilității și structurii membranare. Urmează ca aceste date să fie confirmate de microscopia electronică. Activitatea antioxidantă a furilbenzotiazolilor, mai ales a amestecului racemic, s-a concretizat în stimularea activității catalazei hepatice.

Mulțumiri

Activitatea experimentală din cadrul acestei teze s-a desfășurat în cadrul Catedrei de Biochimie de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică și în cadrul Facultății de Biologie, Universitatea Babeș-Bolyai.

Adresez respectuoase mulțumiri **conducătorului științific al lucrării, domnului Prof. dr. Florin Dan Irimie**, pentru competența îndrumare științifică, observațiile critice extrem de prețioase, răbdarea cu care m-a ghidat, sprijinul real și încrederea pe care mi le-a acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a doctoratului.

Mulțumesc d-rei **Conf. dr. Corina Roșioru** pentru că m-a primit în laboratorul domniei sale și mi-a oferit tot sprijinul practic și îndrumarea de specialitate în realizarea părții de testare a efectelor metabolice a furilbenzotiazolului.

Le voi fi întotdeauna recunoscătoare pentru generozitatea de care au dat dovadă și pentru că au trezit în mine dorința de a cerceta în continuare.

Mulțumesc domnului **Conf. dr. Paisz Csaba**, pentru sugestiile oferite și îndrumarea activității mele științifice și în mod special **dr. Bencze Csaba** pentru suportul științific, moral și îi asigur de toată aprecierea și gândurile mele bune.

Sunt în același timp recunoscătoare că după plecarea lui Csaba am întâlnit un alt om minunat, dr. Monica Hriscu, căreia îi mulțumesc pentru tot sprijinul, sfaturile, indicațiile și suportul necondiționat acordat.

Mulțumesc tuturor membrilor Departamentului de Biochimie Conf. dr. Monica Toșa și asist. Univ. dr. Paula Podea pentru discuțiile utile și încurajările permanente acordate pe tot parcursul pregătirii tezei de doctorat. Domnului tehnician Ioan Bodea care m-a sprijinit în activitatea de laborator, întotdeauna la timp cu materialele de care am avut nevoie. Doamnei Ibolya Varga pentru amabilitatea de care a dat dovadă de fiecare dată când i-am cerut ceva.

Mulțumesc tuturor membrilor comisiei de doctorat, domnului Prof. dr. Valentin Zaharia domnului Prof. dr. Ioan Grosu și doamnei Conf. dr. Adela Pinteș pentru răbdarea cu care au analizat lucrarea de față precum și pentru sugestiile formulate.

Mulțumesc tuturor colegilor care m-au sprijinit și încurajat pentru atmosfera prietenească pe au creat-o pe parcursul acestor ani de căutări științifice: dr. Laura Pop, dr. Oana Tudoran, dr. Jurgen Brem, Augustin Cătălin Moț, Laura Chiș, Florina Deac, Cristina Bischin, Mara Naghi, Noemi Kallo, Denisa Hapău, Alexandra Mantu, Sonia Mahuț de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică și Tiberiu Szoke-Nagy, Ionuț Uțiu, Camelia Muntean, Alina Filip de la Facultatea de Biologie. A fost o plăcere să vă cunosc.

Mulțumesc celor din familie: dr. Cosmin Trif, Claudia, Gabi și Călin, Ioana Molnar din Cluj-Napoca, pentru tot ce au făcut pentru mine.

Îi mulțumesc îndeosebi soțului meu pentru dragostea, răbdarea, înțelegerea și încurajările manifestate constant fără de care nu aș fi reușit duc la bun sfârșit această teză.

Mulțumesc din suflet părinților și surorilor mele care au avut grijă de copiii mei în toți acești ani.

Bibliografie

- ¹ Ramandori, G., Moriconi, F., Malik, I., Dudas, J. *J Physiol Pharmacol*, **2008**, 107-117.
- ² Liljebblad, A., Kallinen, A., Kanerva, L. T. *Curr. Org. Synth.* **2009**, 6, 362-379.
- ³ Lutz, S., *Science*, **2010**, 285-287.
- ⁴ Carey, J. S., Laffan, D., Thomson, C., Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2337-2347.
- ⁵ Matsuda T., Yamanaka, R., Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 513-557.
- ⁶ Kamal, A., Azhar, A., Krishnaji, T., Malik, S., Azeeda, S. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 569-592.
- ⁷ Gotor-Fernandez, V., Brieva, R., Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 40, 111-120.
- ⁸ Farina, V., Reeves, J.T., Senanayake, H., Song, J.J. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 2734-2793.
- ⁹ Reddy P, Lin Y, Chang H. *Arkivoc*. **2007**, 113-122.
- ¹⁰ Heo Y, Song Y, Kim B, Heo J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3091-3094.
- ¹¹ Piscitelli F, Ballatore C, Smith A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 644-648.
- ¹² (a). Caner, S., Groner, E., Levy, L., Agranat, I. *Drug Discovery Today*, **2004**, 9, 105-110; (b). Francotte, E.; Lindner, W. *Chirality in Drug Research*, Ed. Wiley-WCH: Weinheim, **2006**, 13-18.
- ¹³ (a) Andreas, S., Bommarius, B., Riebel, R. *Biocatalysis*, Ed. Wiley-WCH, Verlag, **2004**, 2-14; (b) Liese, A., Seelback, K., Wandrey, C. *Industrial biotransformations*, Ed. Wiley-WCH, Verlag, **2006**, 10-43.
- ¹⁴ (a) Paizs, Cs., Tosa, M., Majdik, C., Tähtinen, P., Irimie, F.D., Kanerva, L.T. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 619-627; (b) Paizs, Cs., Toşa, M.I., Majdik, C., Mişca, R., Irimie, F.D. *Roum. Biotechnol. Lett.* **2001**, 6, 325-331.
- ¹⁵ Amnekar, N. *Digest Journal of nanomaterials and Biostructures*, **2010**, 5, 177-184.
- ¹⁶ Aileo, S., Wells, G., Stone, E., Kadri, H., Bazzi, R., Bell, R. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5135-5139.
- ¹³¹ Yang, Y., Zhu, D., Piegat, T.J., Hua, L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 1799-1803.
- ¹⁸ Bencze, L. Cs., Paizs, Cs., Toşa, M. I., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 356-364.
- ¹⁹ Meerwein, H., Buchner, E., Emster, K. *J. Prakt. Chem.* **1939**, 152, 237-266.
- ²¹ (a). Toşa, M. I., Podea, P. V., Paizs, Cs., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 2068-2071. (b). Paizs, Cs., Tähtinen, P., Lundell, K., Poppe, L., Irimie, F.D., Kanerva, L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 1895-1904.
- ²¹ Bencze, L. Cs., Paizs, Cs., Toşa, M. I., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 356-364.
- ²² Paizs, Cs., Toşa, M., Majdik, C., Moldovan, P., Novák, L., Kolonits, P., Marcovici, A., Irimie, F., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 1495-1501.
- ²³ Bencze, L. Cs., Paizs, Cs., Toşa, M. I., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 675-683.
- ²⁵ Paizs, Cs., Toşa, M., Majdik, C., Moldovan, P., Mişca, R., Irimie, F.D., *Roum. Biotechnol. Lett.* **2001**, 325-331.
- ²⁶ Fărcăşan, V., Paiu, F., *Studia Univ. Babeş Bolyai, Chem.* **1966**, 11, 107.
- ²⁷ Jing, Q., Kazlauskas, R. J. *Chirality*, **2008**, 20, 724-735.
- ²⁸ (a) Kazlauskas, R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A., *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2656-2665. (b). Rotticci, D., Haeffner F., Orrenius C., Norin T., Hult K., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **1998**, 5, 267-272. (c). Hwang, B.Y, Scheib, H., Pleiss, J., Kim, B.G., Schmid, R.D. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2000**, 10, 223-231. (d). Schulz, T., Pleiss, J., Schmid, R.D. *Protein Sci.* **2000**, 9, 1053-1062.
- ²⁹ Nagy, V., Tóke, E. R., Keong, L. C., Szatzker, G., Ibrahim, D., Omar, I. C., Szakács, G., Poppe, L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 39, 141-148.
- ³⁰ (a). Dale, J. A., Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 512-519; (b). Sullivan, G. R., Dale, J. A., Mosher, H. S. *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 2143-2147; (c). Merckx, E. M., Vanhoeck, L., Lepoivre, J. A., Alderweireld, F. C., Van Der Veken, B. J., Tollenaere, J. P., Raymaekers, L. A. *Spectr: Int. J.* **1983**, 2, 30; (d) Doesburg, H.M.; Petit, G. H.; Merckx, E. M. *Acta Crystallogr.* **1982**, B38, 1181-1185; (e) Oh, S. S.; Butler, W. H.; Koreeda, M. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4499-4503.
- ³¹ Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4092-4096.
- ³² Dutcher, J. S., Macmillan, J. G., Heathcock, C. H. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 2663-2669.
- ³³ (a). Baskar, B., Pandian, N. G., Priya, K., Chadha, A. *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, 15, 3961-3966; (b). Chen, H., Nagabandi, S., Smith, S., Goodman, J. M., Plettner, E., *Tetrahedron Asymmetry*, **2009**, 20, 449-456.

-
- ³⁴ (a). Dale, J. A., Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519; (b). Sullivan, G. R., Dale, J. A., Mosher, H. S. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 2143-2147; (c). Merckx, E. M., Vanhoeck, L., Lepoivre, J. A., Alderweireld, F. C., Van Der Veken, B. J., Tollenaere, J. P., Raymaekers, L. A. *Spectr: Int. J.* **1983**, *2*, 30; (d) Doesburg, H.M.; Petit, G. H.; Merckx, E. M. *Acta Crystallogr.* **1982**, *B38*, 1181-1185; (e) Oh, S. S.; Butler, W. H.; Koreeda, M. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 4499-4503.
- ³⁴ Chiricuță, I., Bologa, S., Rîșcă, R., Ghergariu, S. *Enciclopedia Oncologică Inst. Oncologic Cluj-Napoca*, **1992**, 19.
- ³⁵ Su, X., Viker, N., Gansshapillai, D., Smith, A., Purohita, M., Reed, N.J., Potter, B.V.L. *Molec. Cell. Endocrinol.*, **2006**, *248*, 214-217.
- ³⁶ Chi, B., Milne, J.C., Carney, D.P., Song, J., Choy, W., Lambert, P.D., Gagne, D.J., Hirsch, M., Cote, A., Davis, M., Lainez, E., Meade, N., Normington, K., Jirousek, M.R., Perni, R.B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 1416-1420.
- ³⁷ Yadav, P.S., Senthilkumar, G.P., *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, **2011**, *3*, 1-7.
- ³⁸ Blomhoff, R., Drevon, C.A., Eskild, W., Helgerud, P., Norum, K.R., Berg, T., *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8898-8903.