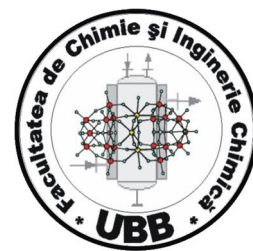




Universitatea Babeş-Bolyai

Cluj-Napoca

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Rezoluția cinetică mediată de lipaze a α - și β -hidroxiacizilor și a derivaților acestora în scopul obținerii lor cu grad ridicat de enantiopuritate

Rezumat teză de doctorat

Student doctorand: Mara Ana Naghi

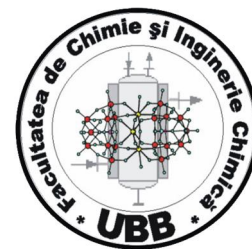
Conducător științific: Prof. Florin Dan Irimie

Cluj-Napoca

2015



**Universitatea Babeş-Bolyai
Cluj-Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**



**Rezoluția cinetică mediată de lipaze a α - și β -
hidroxiacizilor și a derivaților acestora în scopul
obținerii lor cu grad ridicat de enantiopuritate**

Rezumat teză de doctorat

Comisie

Președinte: Prof. Dr. Ion Grosu - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

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

Referenți: Prof. Dr. Ing. Dan Scutaru – Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi", Iași

Prof. Dr. Ing. Mircea Dărăbanțu - Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Conf. Dr. Andrea Bunea - Facultatea de Zootehnie și Biotehnologii, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca

Susținere publică: Iulie 2015

Cuprins

1. Introducere.....	4
1.1. Hidroxiacizii și derivații lor optic puri.....	5
1.1.1. α -Hidroxiacizi.....	5
1.1.2. β -Hidroxiacizi.....	5
1.2. Rezoluție cinetică mediată de lipaze.....	7
1.3. Configurație absolută.....	11
2. Sinteza hidroxiacizilor și a derivaților lor optic puri. Studiu de literatură.....	13
2.1. Sinteza chimică.....	13
2.1.1. α -Hidroxiacizi.....	13
2.1.2. β -Hidroxiacizi.....	14
2.2. Sinteza enzimatică.....	15
2.2.1. α -Hidroxiacizi.....	15
2.2.2. β -Hidroxiacizi.....	16
3. Obiectivele acestui studiu.....	17
4. Rezultate și discuții.....	19
4.1. Sinteza chimică a compușilor racemici.....	19
4.1.1. Sinteza chimică a derivaților α -hidroxiacizilor.....	19
4.1.2. Sinteza chimică a β -hidroxiesterilor și a diesterilor corespunzători.....	20
4.1.3. Sinteza chimică a α -cianhidrinelor.....	21
4.2. Sinteza mediată de enzime compușilor enantiomeric puri.....	22
4.2.1. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a α -hidroxiesterilor și a α -hidroxiesterilor O-acilați.....	22
4.2.2. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a β -hidroxiesterilor și a β -hidroxiesterilor O-acilați optic puri.....	31
4.2.3. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a α -cianhidrinelor.....	39
5. Concluzii generale.....	45
6. Partea experimentală.....	46
6.1. Metode analitice.....	46
6.2. Reactivi și solvenți.....	46
6.3. Sinteza compușilor racemici.....	47
6.3.1. Sinteza α -hidroxiacizilor.....	47
6.3.2. Sinteza β -hidroxiesterilor.....	48
6.3.3. Sinteza α -cianhidrinelor.....	49
6.3.4. Sinteza α -hidroxiesterilor.....	51
6.3.5. Sinteza α -hidroxiesterilor O-acilați.....	52
6.3.6. Sinteza β -hidroxiesterilor O-acilați.....	53
6.3.7. Sinteza α -cianhidrinelor O-acilate.....	54
6.3.8. Reacții de derivatizare.....	54
6.4. Reacții enzimatiche.....	55
6.4.1. Reacții de acilare.....	55
6.4.2. Reacții de hidroliză.....	56
6.4.3. Reacții de alcooliză.....	56

6.4.4. Reutilizarea enzimei.....	56
6.5. Reacții la scară preparativă.....	56
7. Mulțumiri.....	57
8. Listă de publicații.....	59
9. Referințe.....	61

Cuvinte cheie: lipaze, biocataliză, hidroxiacizi, rezoluție cinetică, sinteză organică

1. Introducere

Chiralitatea este una dintre cele mai intrigante fenomene din natură. În general, aceasta conduce la activități specifice și proprietăți care diferențiază stereoizomerii. Drept rezultat, există o cerere mare pentru compuși intermediari chirali, iar căutarea de metode noi și eficiente pentru sinteza compușilor enantiomeric puri ocupa o arie mare de cercetare în domeniul chimiei.

Complexitatea structurală a medicamentelor noi este în continuă creștere, iar considerând faptul că corpul uman funcționează cu catalizatori chirali, cererea de noi reactanți farmaceutici chirali este în continuă creștere, astfel, în prezent acești compuși chirali sunt obținuți în formă enantiomeric pură.

Biocataliza este utilizată în scopul sintezei de compuși optic puri datorită enantio- și stereospecificității ridicate a catalizatorilor enzimatici. Aceasta a apărut ca un domeniu modern, pentru a rezolva cererile chimiei verzi și a dezvoltării sustenabile. Principalele avantaje ale utilizării biocatalizatorilor (enzime izolate sau celule întregi) sunt costurile energetice reduse (datorită condițiilor blânde de reacție: pH, temperatură, presiune) precum și diminuarea producției și îndepărtării deșeurilor. Enzimele sunt ecologice și compatibile una cu alta, permițând realizarea de reacții secvențiale.

Acizii carboxilici chirali sunt compuși intermediari importanți pentru sinteza multor medicamente și a compușilor naturali, unde substanțele cu grad ridicat de enantiopuritate sunt necesare. Acești compuși sunt folosiți drept intermediari chirali deoarece conțin cel puțin două grupări funcționale (grupările hidroxil și carbonil), care pot fi transformate chimic în alte grupări funcționale.

Rezoluția cinetică are avantajul de a furniza ambii enantiomeri ai unui racemat cu enantiopuritate excelentă, în prezența unei enzime enantioselective. Principalele dezavantaje ale rezoluției cinetice clasice sunt randamentul teoretic de 50% și scăderea excesului enantiomeric (*ee*) odată cu creșterea conversiei peste 50%.

Această teză se adresează domeniului catalizei mediate de lipaze, în mediu organic, utilă dezvoltării de procese ecologice și înalt selective în vederea obținerii de hidroxiacizi enantiopuri.

1.1. Hidroxiacizi optic puri și derivații acestora

Acizii hidroxicarboxilici optic puri pot fi larg utilizați drept precursori chirali din varii motive: conțin cel puțin două grupări funcționale: o grupare hidroxil și o grupare carboxil; grupările funcționale pot fi modificate chimic ușor; un al doilea centru chiral poate fi introdus.

1.1.1. α -Hidroxiacizi

Acizii carboxilici chirali sunt compuși intermediari importanți în sinteza multor medicamente¹ și a compușilor naturali cum sunt feromonii² și pesticidele,³ pentru care substanțele cu grad înalt de enantiopuritate (>99% *ee*) sunt necesare. De exemplu, izomerii puri de acid (*R*)- și (*S*)- α -hidroxi-fenilacetic (acid mandelic) și esterii lor sunt des utilizați în sinteza organică. Acidul (*R*)-mandelic este utilizat în sinteza unor antibiotice cefalosporinice, cum sunt Cephmandole and Cephonicid⁴, peniciline, agenți anti-tumorali și agenți anti-obezitate⁵. Acizii enantiomeric puri mai sunt utilizați și pentru rezoluția racemaților prin precipitare selectivă.⁶ α -Hidroxiacizii optic activi și α -cetoacizii care conțin un substituent cu o grupare aril, cum este cazul acidului fenil-lactic, acidului fenilpiruvic, acidului mandelic, acidului benzoilformic și a derivaților acestora, joacă un rol important ca sintoni în sinteza compușilor biologic activi și a compușilor naturali⁷. Acidul (*R*)-2-Hidroxi-2-(2'-clorofenil)acetic este intermediarul chiral cheie în sinteza (*S*)-clopidogrel, un inhibitor al agregării trombocitare, utilizat în tratamentul atacului de cord.

1.1.2. β - Hidroxiacizi

Acizii β -hidroxi- β -aryl-propanoici și derivații acestora sunt intermediari chirali înalt funcționalizați, dintre care β -hidroxi- β -aryl propionatii optic activi sunt precursori în sinteza farmaceuticelor enantiopure, care acoperă o gamă largă de acțiuni. Acizii β -hidroxicarboxilici și derivații lor care conțin în structura lor diferite fragmente aromatice au fost utilizați drept compuși de bază pentru prepararea de compuși bioactivi enantiopuri, cum sunt vitamine, antibiotice, feromoni și compuși aromați.⁸

β -Hidroxiesterii sunt intermediari chirali versatili în sinteza mai multor medicamente și compuși de sinteză fină. De exemplu, esterii (*R*)-3-hidroxi-butanoați servesc drept materie primă pentru obținerea antibioticelor β -lactamice, inclusiv a carbapenemelor și a penemelor cu spectru larg de acțiune, și pentru dorzolamidă, un inhibitor al anhidrazei carbonice umane II topic activă.⁹

Dintre β -hidroxiesterii aril-substituiți, etil (*S*)-3-hidroxi-3-(tiofen-2-il)-propanoatul este un precursor în sinteza duloxetinei (un inhibitor al asimilării serotonin-norepinefrinei), iar

etil-(*R*)-3-hidroxi-3-fenil propanoatul este un precursor în sinteza atomoxetinei (un inhibitor al asimilării norepinefrinei).¹⁰

1.2. Rezoluția cinetică mediată de lipaze

Lipazele (triacilglicerol acilhidrolazele, EC 3.1.1.3) sunt probabil cele mai utilizate enzime în chimia organică deoarece au avantajele de a avea o specificitate largă de substrat cu regio- și enantioselectivitate ridicate, fiind astfel utilizate drept catalizatori pentru rezoluția cinetică a racemaților (e.g. alcooli secundari racemici, acizi carboxilici racemici).¹¹ Din punct de vedere chimic, lipazele pot fi considerate drept reactivi blânzi și selectivi, capabili să activeze un carboxilat și să-l transfere unui număr mare de nucleofili în diferiți solvenți organici. În cadrul colecției largi de enzime, lipazele au ieșit în evidență drept unele dintre cele mai potrivite enzime pentru procesele de rezoluție cinetică din sinteza asimetrică. Majoritatea lipazelor acceptă un spectru larg de substraturi nenaturale, fiind astfel versatile pentru aplicații în sinteza organică. Lipazele microbiene reprezintă cea mai importantă clasă de biocatalizatori folosiți într-un spectru larg de aplicații în sinteza organică. Unele dintre avantajele folosirii lipazelor sunt reprezentate de faptul că nu necesită cofactori, multe lipaze sunt disponibile în formă nativă și imobilizată, pot fi produse în cantități mari.

Aplicațiile la nivel industrial sunt îngreunate de lipsa stabilității lor operaționale pe termen lung și de dificultatea recuperării și reutilizării enzimei. Aceste dezavantaje pot fi depășite prin imobilizarea enzimei. Printre avantajele imobilizării, se numără manevrarea ușoară a enzimei, separarea ușoară de produs, astfel minimizând contaminarea produsului cu proteină, de asemenea facilitează recuperarea eficientă și re folosirea enzimelor scumpe, pentru viabilitatea economică, și ușurează utilizarea lor în procese continue. Un alt beneficiu îl reprezintă stabilitatea mărită,¹² condițiile de operare, mai exact denaturarea termică, în prezența solvenților organici sau prin autoliză.

Reacțiile enzimatică sunt cunoscute ca fiind sensibile la tipul solventului utilizat, mai ales în sistemele cu solvenți hidrofilii. În general, în comparație cu solvenții hidrofobi, cei hidrofilii pot îndepărta mai ușor “apa esențială” legată de lipază, și care este necesară pentru conservarea flexibilității conformației enzimei; acest fenomen deactivează lipaza.¹³ Hidrofobicitatea unui solvent, definită ca $\log P$ (logaritmul coeficientului de partiție al unui compus între *n*-octanol și apă), este proprietatea fizică a unui solvent, ce descrie cel mai bine efectul solventului asupra activității enzimei.¹⁴

Donorul acil poate influența poziția echilibrului și viteza de acilare/deacilare. Mulți cercetători au presupus că creșterea cantității de donor acil poate ajuta la formarea intermediarului acil-enzimă și astfel poate accelera viteza de reacție¹⁵.

În ceea ce privește transesterificarea esterilor vinilici și a alcoolilor mediate de lipaze, este cunoscut faptul că se formează acetaldehida, care ar putea dezactiva lipazele microbiene, prin modificări structurale cauzate de formarea bazelor Schiff la nivelul reziduurilor lizince accesibile solventului.

Sunt disponibile trei căi principale spre obținerea de compuși enantiopuri: folosirea fondului de compuși chirali, rezoluția (separarea) racemaților și sinteza asimetrică. Strategiile privind generarea de enantiomeri pornind de la racemați includ rezoluția cinetică, rezoluția cinetică dinamică, stereoinversia (via intermediar achiral pentru a obține enantiomerul corespunzător drept produs unic) și procese enantioconvergente (transformarea enantiomerilor substratului prin căi stereochemice opuse, formând un singur produs enantiomeric).¹⁶

Rezoluția cinetică simplă¹⁷ se bazează pe diferența dintre vitezele de reacție ale enantiomerilor cu scopul de a obține produs îmbogățit enantiomeric. Rezoluția cinetică enzimatică se bazează pe diferența dintre vitezele de reacție ale enantiomerilor unui racemat în prezența unei enzime drept catalizator chiral. În condițiile optime ale unei rezoluții cinetice, transformarea unuia dintre enantiomeri în produs are loc în timp ce celălalt enantiomer rămâne nereacționat. Printre avantajele acestor procese se numără vitezele mari de reacție de până la 10^{12} ori (în comparație cu metodele chimice), eficiență îmbunătățită, chemo-, regio- și enantioselectivitate înalte. Factorul de selectivitate este definit ca fiind raportul vitezelor celor două reacții. În absența selectivității, într-o rezoluție cinetică clasică, se va forma un amestec racemic de produși. Ideal, ar fi nevoie de o diferență mare între vitezele de reacție pentru a se obține produs enantiomeric pur cu un randament de 50%, precum și materie primă enantiomeric pură cu un randament de 50%. Un dezavantaj al acestei strategii îl constituie faptul că pentru a obține randamente mari din fiecare enantiomer (~50%) cu enantiopuritate excelentă ($\geq 95\%$ ee), sunt necesari factori de selectivitate mari ($\gg 200$), care sunt greu de obținut.¹⁸

În cazul lipazelor au fost formulate reguli empirice pentru a prezice enantiomerul care reacționează mai repede. Regula propusă de Kazlauskas¹⁹ pentru a prezice enantiomerul care reacționează mai repede dintr-un alcool secundar racemic în urma acilării în prezența lipazei din *Burkholderia cepacia* s-a dovedit a fi valid și pentru alte lipaze. Potrivit acestei reguli, discriminarea enantiomerilor se bazează pe diferența mărimii substituenților (substituent

mediu, substituent mare) atașați la centrul asimetric, care se leagă de diferite buzunare hidrofobe din situsul activ al enzimei.

În cadrul acestei teze, eforturile de creștere a enantiopurității compușilor au fost orientate spre condițiile reacțiilor de rezoluție cinetică mediate de lipaze, care sunt ușor de ajustat într-un laborator de sinteză chimică.

1.3. Configurația absolută

Configurația absolută se referă la aranjamentul spațial al atomilor unei entități moleculare (sau a unui grup) chirale identificată fizic și la descrierea stereochemică (e.g., (*R*) sau (*S*), (*P*) sau (*M*), *D* sau *L*, etc). Determinarea configurației absolute a moleculelor chirale este o problemă de importanță majoră pentru stereochemia moleculară, astfel că au fost dezvoltate multe metode pentru a adresa această problemă. Printre acestea se numără: cristalografia cu raze X, urmată de metode chiroptice (e.g., dicroism circular (DC), dispersie optică rotativă (ORD), sau rotație optică specifică).

Activitatea optică este o metodă folosită de caracterizare a compușilor, din păcate însă, polarimetrele necesită o concentrație mai mare decât cea obținută prin dizolvarea unui singur cristal folosit la măsurătorile de difracție, fiind de mai mare ajutor caracterizarea activității optice în soluția aceluși singur cristal.²⁰ Deoarece măsurarea rotației specifice implică o singură lungime de undă, prezența și efectul impurităților poate trece neobservat, de asemenea, rotația optică poate furniza o măsură a excesului enantiomeric dacă rotația specifică a compusului enantiomeric pur este suficient de puternică și a fost determinată anterior.

Totuși, una dintre cele mai folosite tehnici experimentale este fără îndoială rezonanța magnetică nucleară (RMN). Această tehnică este atrăgătoare din cauza avantajelor ei, care includ: disponibilitatea aparatului în majoritatea laboratoarelor, înțelegerea bună a fundamentelor acestei metode nu este necesară pentru a o putea aplica, este necesară o cantitate mică de probă care poate fi recuperată și metoda este aplicabilă atât la solide cât și la lichide. Analiza derivaților preparați pornind de la substrat și cei doi enantiomeri ai unui agent de derivatizare chiral este cea mai utilizată abordare pentru determinarea configurației absolute, deoarece legătura covalentă formată între substrat și agentul auxiliar produce o specie cu o rigiditate conformațională mai mare, care în schimb produce diferențe mari pe spectrul RMN. Pentru derivatizarea substratului, avem două opțiuni: (a) prepararea celor doi

derivați pornind de la cei doi enantiomeri ai agentului chiral de derivatizare și substrat (derivatizare dublă), și (b) prepararea unui singur derivat pornind de la substrat și unul din enantiomerii agentului chiral de derivatizare (derivatizare simplă). Printre agenții auxiliari folosiți se numără: acidul α -metoxifenilacetic (MPA), acidul α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetic (MTPA), acidul 9-antrilmetoxiacetic (9-AMA), Boc-fenilglicină (BPG), etc.²¹

2. Sinteza hidroxiacizilor optic puri și a derivaților acestora

2.1. Sinteza chimică

2.1.1. α -Hidroxiacizi

Metoda chimică nu e cea mai populară metodă de a prepara α -hidroxiacizi chirali și α -cetoacizi în industrie, pentru că ea nu funcționează eficient în termeni de enantioselectivitate sau randament. Utilizarea catalizatorilor chimici îngreunează producția verde de α -hidroxiacizi și α -cetoacizi. Printre metodele dezvoltate, se numără alchilarea Friedel-Crafts asimetrică a compușilor aromatici cu esterul etilic al acidului glioxilic în prezența (*S*)-6,6'-dibromo-1,1'-binaftalen-2,2'-diolului²², adiția enantioselectivă de vinilsilan catalizată de scandiu ca o abordare nouă la sinteza derivaților enantiopuri de α -hidroxiacizi β,γ -nesaturați²³, sinteza enantioselectivă a α -hidroxiesterilor prin adiție 1,2 a acizilor arilboronici la *t*-butil glioxilat catalizată de ruteniu²⁴ sau reducerea mediată de organocatalizatori²⁵ a ceto-esterilor.

2.1.2. β -Hidroxiacizi

Efortul depus în vederea obținerii β -hidroxiacizilor optic activi sau a derivaților acestora, a dus la dezvoltarea unor metode de sinteză productive. Reacția aldolică e una dintre cele mai importante metode pentru construcția stereoselectivă a moleculelor aciclice complexe. A fost realizată reacția aldolică enantioselectivă a *tert*-butil acetatului folosind complexe de carbohidrat de titanu, obținându-se purități optice mari, de către Duthaler, R. O.*et al*²⁶. Auxiliarul chiral *trans*-2-fenilciclohexanol a furnizat un nivel bun de inducție asimetrică folosit drept reactiv Reformatsky chiral în vederea sintezei enantioselective a β -hidroxiacizilor²⁷. Carbometoxilarea regioselectivă a epoxizilor chirali s-a dovedit a fi o metodă eficientă de obținere a β -hidroxiesterilor enantiomeric puri²⁸. De asemenea, transformarea acizilor β -oxocarboxilici în acizi β -hidroxicarboxilici chirali prin intermediul DIP-Cl™ (B-Clorodiisopinocampheylboran) folosit drept agent reducător, a dus la obținerea unei enantioselectivități ridicate²⁹.

2.2. Sinteza enzimatică

2.2.1. α -Hidroxiacizi

Biocataliza s-a evidențiat ca o strategie puternică pentru producerea de α -hidroxiacizi optic activi datorită stereoselectivității remarcabile și a randamentului ridicat³⁰. S-au dezvoltat diverse abordări biocatalitice în vederea sintezei de α -hidroxiacizi enantiopuri,³¹ inclusiv reducerea asimetrică a ceto-esterilor corespunzători catalizată de reductaze,³² hidroliza enantioselectivă a mandelonitrilului și a derivaților acestora catalizată de nitrilaze³³ și rezoluția mediată de esteraze sau lipaze a *O*-acetaților sau esterilor hidroxiacizilor³⁴. Prin utilizarea rezoluției cinetice dinamice,³⁵ a deracemizării³⁶ substratului racemic sau prin bioreducere³⁷ este posibilă obținerea unui singur enantiomer cu un randament teoretic de 100%. În cazul rezoluției cinetice, este posibilă utilizarea biocatalizatorilor, în special lipazele,^{38,39,40} pentru acilarea selectivă⁴¹ sau hidroliză⁴² cu scopul de a obține substanțele dorite și ambii enantiomeri pot fi obținuți cu puritate optică bună, la un randament teoretic de 50%.⁴³

Oxidarea biocatalitică ar putea constitui o procedură prietenoasă cu mediul, ca un substitut al reacțiilor chimice tradiționale⁴⁴ și mai mult, oxidarea enantioselectivă a α -hidroxiacizilor racemici de către α -hidroxiacid dehidrogenaze (α -HADHs) ar putea produce α -cetoacizii corespunzători și α -hidroxiacizii optic activi cu excese enantiomerice ridicate (*ee*), ca substraturi rămase nereacționate⁴⁵.

Dintre aceste metode, rezoluția enzimatică a hidroxiacizilor *O*-acetați de către esteraze sau lipaze prezintă un potențial ridicat pentru aplicare datorită utilizării lor practice în industria chimică,⁴⁶ astfel că a fost intens studiată.⁴⁷

2.2.2. β -Hidroxiacizi

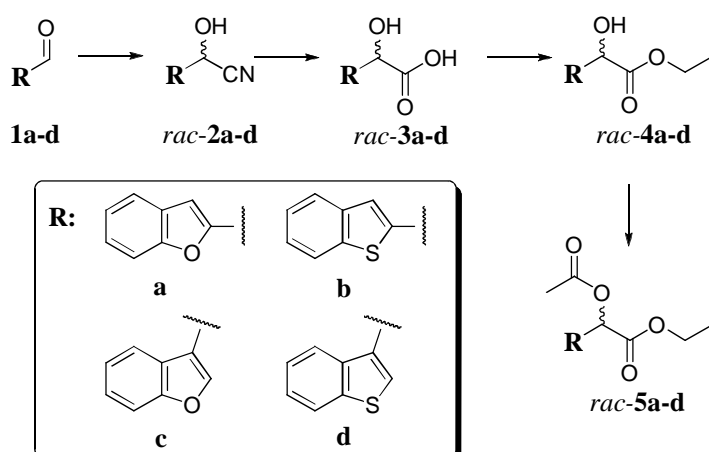
S-a dezvoltat o gamă largă de proceduri chemo- și biocatalitice pentru prepararea enantioselectivă a acizilor β -hidroxipropanoici și a derivaților acestora.⁴⁸

Printre procedurile organometalice și enzimatică se numără: reducerea enantioselectivă a β -cetoesterilor corespunzători; rezoluția cinetică sau rezoluția cinetică dinamică (KR sau DKR) a acizilor β -hidroxicarboxilici racemici și a derivaților acestora; deracemizarea β -hidroxiesterilor.⁴⁹ Rezoluția cinetică enzimatică a diferitor substraturi chirale cu acizi grași sau derivați ai lor drept donori acil precum și hidroliza enzimatică stereoselectivă a esterilor cu acizi grași a fost investigată de către grupul nostru.⁵⁰

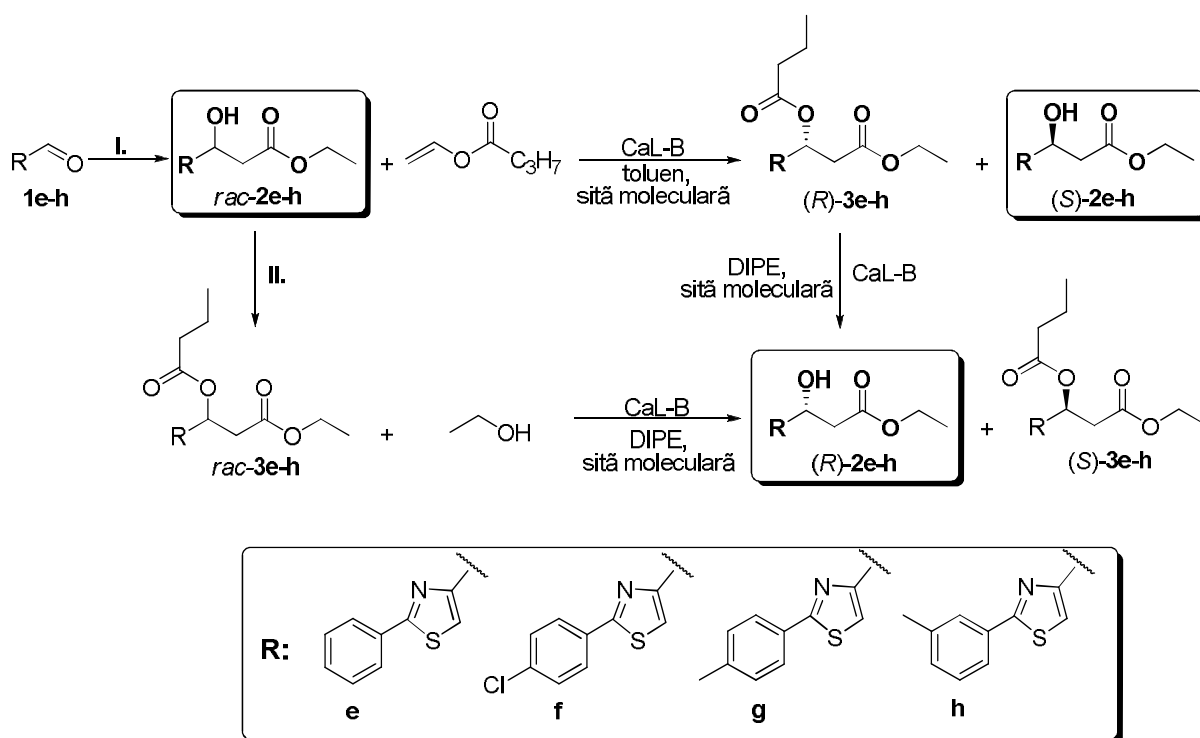
3. Obiectivele acestui studiu

Lipazele sunt frecvent utilizate în rezoluțiile cinetice enzimatică din chimia organică, deoarece acceptă o gamă largă de substraturi și prezintă enantioselectivitate ridicată. Mai mult, din punct de vedere al mediului înconjurător, procesele biocatalitice sunt mai ecologice, mai puțin nocive și cel mai puțin poluante. Astfel că, această teză s-a axat pe sinteza derivaților de α - și β -hidroxiacizi de înaltă enantiopuritate, prin intermediul rezoluției cinetice mediate de lipaze. În acest scop, următoarele obiective au fost propuse și realizate:

1. Sinteza a patru α -hidroxiesteri heteroaromatici diferiți și a compușilor *O*-acilați corespunzători, urmată de rezoluția acestora mediată de către lipaze, în scopul obținerii α -hidroxiacizilor corespunzători cu grad înalt de enantiopuritate.

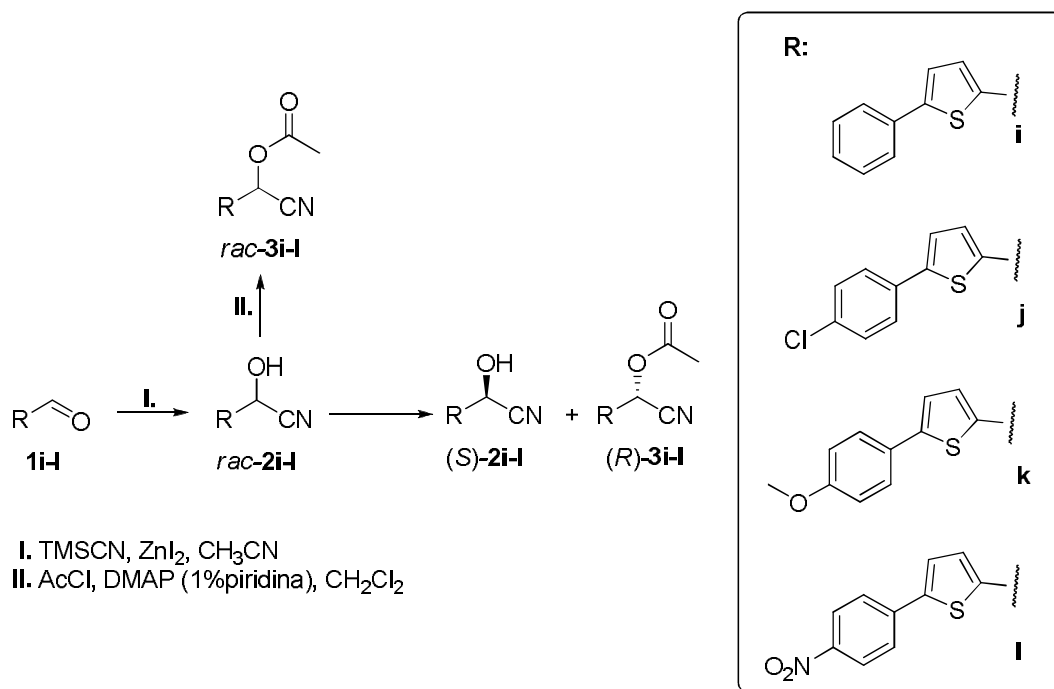


2. Sinteza a patru β -hidroxiesteri heteroaromatici diferiți și a compușilor *O*-acilați corespunzători, urmată de rezoluția acestora mediată de către lipaze, în scopul obținerii enantiomerilor (*R*)- și (*S*) ai β -hidroxiesterilor corespunzători cu grad înalt de enantiopuritate.



I. Etil 2-bromoacetat, Zn, THF, reflux; II. CH_2Cl_2 , anhidridă butanoică, trietilamină, DMAP

3. Sinteza a patru α -cianhidrine heteroaromate diferite și a compușilor *O*-acilați corespunzători, urmată de rezoluția acestora mediată de către lipaze, în scopul obținerii enantiomerilor (*R*)- și (*S*) ai α -cianhidrinelor corespunzătoare cu grad înalt de enantiopuritate.

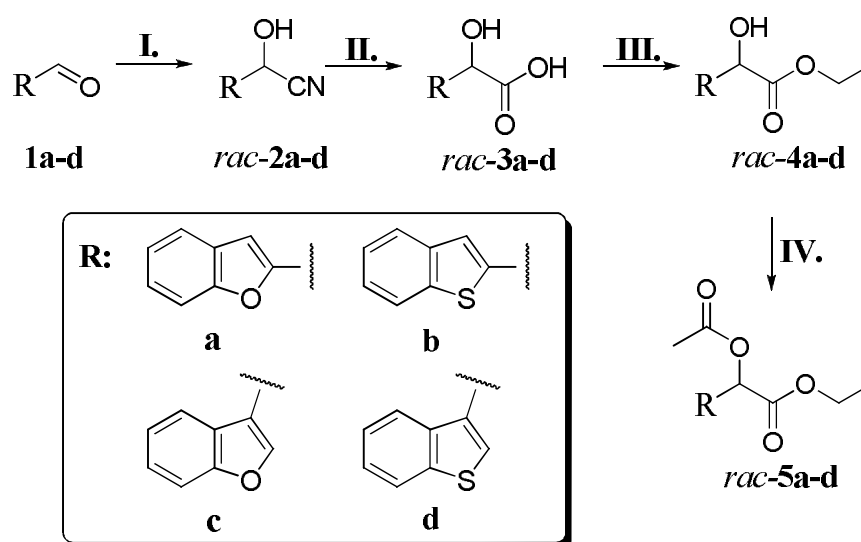


4. Rezultate și discuții

4.1. Sinteza chimică a compușilor racemici

4.1.1. Sinteza chimică a derivaților de α -hidroxiacizi

După cum e ilustrat în **Schema 1**, sinteza cianhidrinelor racemice *rac-2a-d* pornind de la aldehidele corespunzătoare **1a-d** a fost realizată folosind trimetilsilil cianură în prezența unei cantități catalitice de ZnI_2 în diclormetan. Cianhidrinele racemice *rac-2a-d* obținute, au fost hidrolizate folosind HCl conc. în 1,4-dioxan la reflux, de unde au rezultat acizii 2-heteroaril-hidroxiacetici *rac-3a-d*, care în etanol și o cantitate catalitică de $SOCl_2$ s-au transformat în etil-2-heteroaril-hidroxiacetații racemici *rac-4a-d*. În final, *rac-4a-d* au fost acilați chimic pentru obținerea etil 2-acetoxi-heteroaril-2-acetaților racemici *rac-5a-d*, folosind clorură de acetil în diclormetan și o cantitate catalitică de 4-*N,N*-dimetilamino-piridină 1% în piridină.



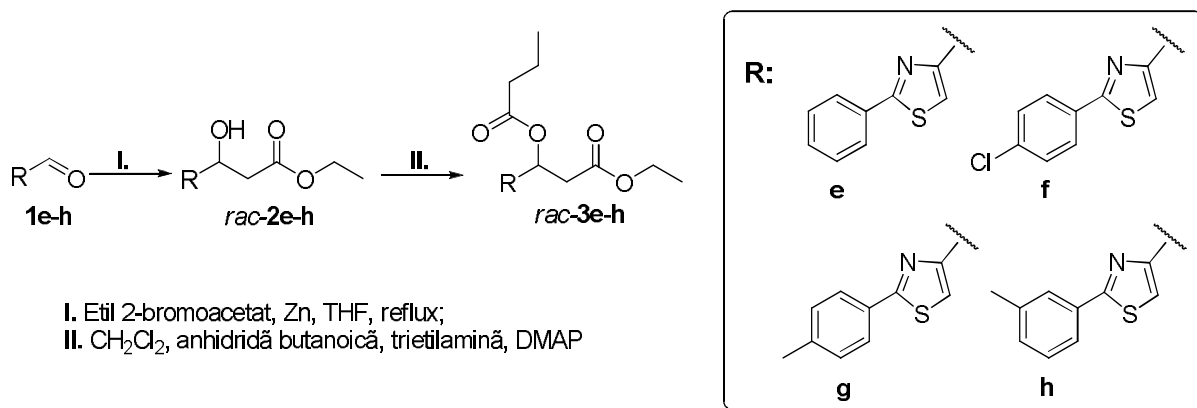
I. 1.TMSCN; 2.HCl/MeOH; II. HCl conc./1,4-dioxan; III. Etanol, $SOCl_2$; IV. AcCl, DMAP 1%.

Schema 1. Sinteza chimică a racemicilor *rac-5a-d*

4.1.2. Sinteza chimică a β -hidroxiesterilor și a diesterilor corespunzători

β -Hidroxiacizii racemici pot fi obținuți prin mai multe metode: prin intermediul reacției Reformatsky a aldehidelor corespunzătoare în prezența β -bromoesterilor, iar dacă β -bromoesterii nu sunt disponibili, atunci prin utilizarea acizilor carboxilici dianionici; folosind etil diazoacetat și diferiți acizi Lewis drept catalizatori, urmată de reducerea hidroxiesterilor corespunzători. Ulterior, β -hidroxiesterii pot fi hidrolizați la β -hidroxiacizii corespunzători.

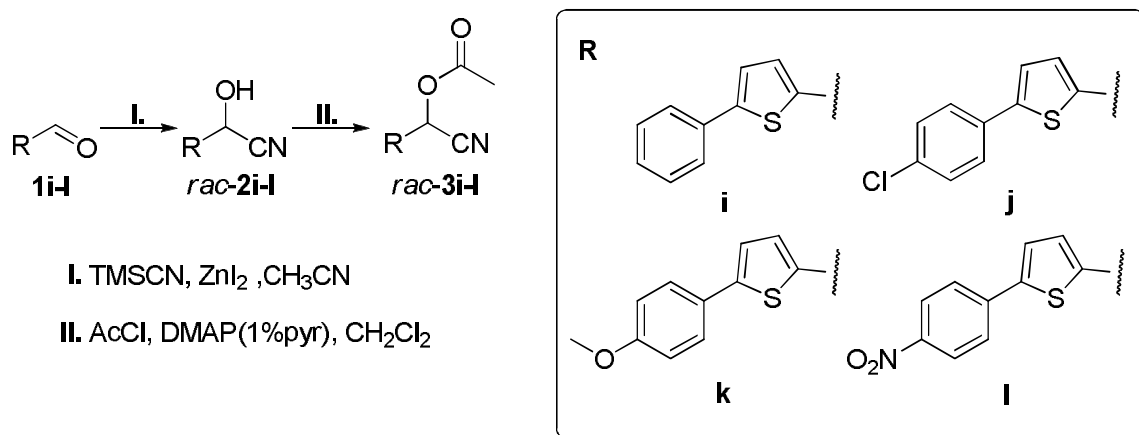
Etil 3-hidroxi-3-(2-aryl-tiazol-4-il)propanoatii (*rac-2e-h*) au fost obținuți prin reacția Reformatsky, pornind de la aldehydele corespunzătoare **1e-h**. În urma reacției de acilare a *rac-2e-h* folosind anhidridă butanoică în prezența trietilaminei și a unei cantități catalitice de 4-*N,N*-dimetilamino piridină (DMAP) în diclormetan, s-au obținut diesterii racemici *rac-3e-h*, după cum e prezentat în **Schema 2**.



Schema 2. Sinteza chimică a *rac-2e-h* și a *rac-3e-h*

4.1.3. Sinteza chimică a α-cianhidrinelor

După cum e ilustrat în **Schema 3**, a fost realizată sinteza cianhidrinelor racemice *rac-2i-l* pornind de la aldehydele corespunzătoare **1i-l** folosind trimetilsilil cianura în prezența unei cantități catalitice de ZnI₂ anhidră, în acetonitril sau diclormetan. Cianhidrinele racemice *rac-2i-l* au fost acilate cu clorură de acetyl, în prezența unei cantități catalitice de 4-*N,N*-dimetilamino-piridină (DMAP) în diclormetan, obținându-se acetații racemici corespunzători *rac-3i-l*.



Schema 3. Sinteza chimică a cianhidrinelor *rac-2i-l* și a esterilor *O*-acilați *rac-3i-l*

4.2. Sinteza catalizată de enzime a compușilor cu grad mare de enantiopuritate

4.2.1. Rezoluția cinetică mediată de enzime a α -hidroxiesterilor și a α -hidroxiesterilor *O*-acilați

Pentru a investiga stereoselectivitatea rezoluției cinetice enzimaticice și activitatea enzimelor, mai întâi s-a stabilit separarea cromatografică a enantiomerilor. S-a realizat separarea enantiomerilor *rac*-**3,4,5a-d** pe HPLC, folosind coloane chirale și un amestec de *n*-hexan și 2-propanol (v:v) ca eluent.

Acilarea enzimatică la scară analitică a *rac*-**4a-d**

Pentru a obține (*R*)-etil 2-acetoxi-heteroaril-2-acetați enantiomeric puri, s-au testat mai multe lipaze disponibile comercial în formă imobilizată sau nu, în diferiți solvenți organici, în reacția de acilare enantioselectivă cu acetat de vinil ca donor acil ireversibil a etil-2-heteroaril-hidroxiacetaților racemici *rac*-**4a-d**.

Mai întâi, a fost studiată reacția de acilare enantioselectivă catalizată de enzime la scară analitică a etil-2-heteroaril-hidroxiacetaților racemici *rac*-**4a-d**, folosind *rac*-**4a** ca și compus model. Astfel, s-a realizat acetilarea *rac*-**4a** în prezența mai multor lipaze, folosind acetatul de vinil drept agent de acilare. Majoritatea enzimelor testate, cum sunt CaL-B, lipaza F, lipaza AK, lipaza din *Pseudomonas cepacia* (LPS), și lipaza din *Mucor miehei* au fost catalitic inactive, lipaza din *Candida rugosa* a prezentat enantioselectivitate și activitate reduse ($ee_p = 46\%$ pentru (*R*)-**5a**, $c = 4\%$ după 24h). Doar lipaza A imobilizată din *Candida antarctica* (CaL-A) s-a dovedit a fi activă și un catalizator selectiv, totuși, performanța catalitică a acestei enzime a fost puternic influențată de tipul de imobilizare. Reacțiile în prezența CaL-A reticulată cu glutaraldehidă (CaL-A CLEA) sau atașată covalent de acrilați (IMMCALA) au prezentat excese enantiomerice slabe ale produsului de reacție, chiar și la conversii mici. Folosind lipaza A din *Candida antarctica* adsorbită pe Celită (CaL-A), reacția a decurs mai repede și selectivitatea a fost vizibil îmbunătățită ($ee > 90\%$ pentru ambii produși la o conversie de $\sim 50\%$). În urma investigării influenței raportului substrat:biocatalizator asupra enantioselectivității și a conversiei, am găsit raportul 1:2 (w:w) substrat:biocatalizator ca fiind cel mai potrivit. Natura solventului și a nucleofilului pot de asemenea să influențeze activitatea și selectivitatea reacțiilor de acilare enzimaticice enantioselective. Astfel, am testat mai mulți solvenți pentru acilarea *rac*-**4a** cu acetat de vinil, mediată de CaL-A (**Tabel 1**). DIPE și MTBE (**Tabel 1**, intrările **1** și **2**) s-au dovedit a fi cei mai buni solvenți pentru acetilarea *rac*-**4a** ($E = 70$ la conversie 51 % după 2h). În CH_2Cl_2 și acetonitril, selectivitatea a fost moderată (**Tabel 1**, intrările **3** și **4**), în timp ce în cloroform și THF catalizatorul nu a fost

eficient. A fost studiată și acilarea mediată de CaL-A a *rac-4a* cu butanoat de vinil și acetat de izopropenil în DIPE, dar nu s-au găsit schimbări considerabile ale selectivității reacției comparativ cu cele obținute la folosirea acetatului de vinil ($E = 21$ la $c = 40\%$ pentru butanoat de vinil, $E = 19$ la $c = 30\%$ pentru acetatul de izopropenil și $E = 39$ la $c = 45\%$ pentru acetatul de vinil, după 2h). S-au realizat reacțiile de acetilare cu acetat de vinil la scară analitică, mediate de CaL-A, pentru *rac-4-b,c,d* în DIPE, în concordanță cu condițiile optime găsite pentru compusul *rac-4a* (Table 1, intrările 5, 6, 7), obținându-se reactivități și selectivități bune.

Tabel 1. Acilarea enantioselectivă a *rac-4a-d* cu acetat de vinil și CaL-A în diferiți solvenți

Intrare	Substrat	Solvent	Timp (h)	c (%)	ee_S (%)	ee_P (%)	E
1	<i>rac-4a</i>	DIPE	2	51	95	90	70
2	<i>rac-4a</i>	MTBE	2	23	23	74	8
3	<i>rac-4a</i>	CH ₂ Cl ₂	23	34	44	85	19
4	<i>rac-4a</i>	CH ₃ CN	23	42	62	84	21
5	<i>rac-4b</i>	DIPE	2	50	93	90	65
6	<i>rac-4c</i>	DIPE	4	49	95	97	>200
7	<i>rac-4d</i>	DIPE	3	49	98	99	»200

Alcooliza enzimatică la scară analitică a compușilor racemici *rac-5a-d*

Lipazele rețin de obicei preferința lor enantioselectivă în hidroliză sau alcooliză.^{1-3,6} În consecință, în urma acestor reacții ar trebui să rezulte formele enantiomerice opuse ale etil 2-heteroaril-2-hidroxiacetaților **4a-d** și ale etil 2-acetoxi-2-heteroaril-acetaților **5a-d** enantiopuri decât cele găsite în urma reacțiilor de acilare mediate de lipaze. Astfel că, am considerat necesar să studiem reacțiile de alcooliză și hidroliză ale etil 2-acetoxi-2-heteroaril-acetaților racemici *rac-5a-d*.

Datorită solubilității lor reduse în apă, am studiat mai întâi alcooliza enzimatică a *rac-5a-d*. A fost testată aceeași gamă de lipaze disponibile comercial ca și cele folosite la reacțiile de *O*-acilare. Mai întâi, am realizat experimentele în metanol, etanol, propanol și butanol anhidri, urmate de experimente în care am folosit aceleași enzime în toți solvenții folosiți la reacțiile de esterificare și am adăugat 5 echivalenți de alcool în mediul de reacție. Datorită faptului că în toate cazurile, alcooliza enzimatică s-a dovedit a fi total ineficientă (randamente

< 5% după 2 zile cu PLE, LPS și esteraza din *Rhizopus oryzae*), am continuat studiile cu reacții de hidroliză enzimatică ale racemicilor **rac-5a-d**.

Hidroliza enzimatică la scară analitică a compușilor *rac-5a-d*

Experimentele au fost realizate în diferiți solvenți organici saturați cu apă, cu scopul de a mări viteza de hidroliză. Deoarece diisopropileterul (DIPE) s-a dovedit a fi la fel de bun ca și la reacțiile de acilare enzimatică, l-am utilizat mai departe în experimentele noastre în raport de 18:1 (v:v) cu apa și un raport substrat:enzimă 1:2 (w/w).

În continuare, am testat separat enzimele, atât pentru benzofuranil-2-il cât și pentru benzofuranil-3-il, folosind lipaze, esteraze și acilaze, iar după câteva ore, rezultate au prezentat doar LPS, CaL-A, CrL și PLE, în timp ce CaL-B și Acilaza I nu prezintă activitate pentru **rac-5a,c**. Toate enzimele studiate au prezentat selectivitate pentru enantiomerul (*R*), cu excepția CrL care s-a dovedit a fi (*S*) selectivă. Hidroliza enzimatică a substraturilor **rac-5a,c** a arătat la produși prezența hidroxiesterului, hidroxiacidului și a hidroxiacidului *O*-acilat. Aceste rezultate pot fi explicate prin regioselectivitățile diferite ale hidrolazelor utilizate. În urma rezultatelor prezentate în **Tabel 2**, mai departe am utilizat LPS pentru hidroliza **rac-5b** și CaL-A pentru hidroliza **rac-5d**, rezultatele obținute fiind prezentate în **Tabel 3**. Astfel, prin utilizarea reacției de acilare enzimatică a **rac-4a-d** urmată de hidroliza mediată de LPS sau CaL-A a (*R*)-**5a-d**, pot fi obținuți hidroxiesterii (*R*)-**4a-d** enantiomeric puri.

Tabel 2. Hidroliza enzimatică a *rac-5a,c* în DIPE:apă 18:1 (v:v), monitorizată prin TLC și HPLC :

Intrare	Substrat	Enzima	Config ^a	Prođuși		
				Hidroxiester	Hidroxiacid <i>O</i> -acetilat	Hidroxiacid
1	<i>rac-5a</i>	CaL-A	(<i>R</i>)	++	- ^b	- ^b
2	<i>rac-5a</i>	LPS	(<i>R</i>)	+++	- ^b	- ^b
3	<i>rac-5a</i>	CrL	(<i>S</i>)	++	- ^b	+
4	<i>rac-5a</i>	PLE	(<i>R</i>)	+	+	++
5	<i>rac-5c</i>	CaL-A	(<i>R</i>)	+++	- ^b	- ^b
6	<i>rac-5c</i>	LPS	(<i>R</i>)	- ^b	- ^b	+
7	<i>rac-5c</i>	CrL	(<i>S</i>)	++	- ^b	+
8	<i>rac-5c</i>	PLE	(<i>R</i>)	- ^b	+	++

^a configurația absolută a enantiomerului mai reactiv pentru substraturile **5a,c**

^b - nedetectat ($c < 2\%$)

Prezența acestor produși este notată de la 1 până la 3 plusuri (+), în funcție de concentrația lor, iar absența e notată cu (-).

Tabel 3. Hidroliza enzimatică a *rac-5a-d* în DIPE:apă 18:1 (v:v):

Intrare	Substrat	Enzima	Timp (h)	<i>c</i> (%)	<i>ee_S</i> (%)	<i>ee_P</i> (%)	<i>E</i>
1	<i>rac-5a</i>	LPS	22	50	95	94	120
2	<i>rac-5b</i>	LPS	22	49	94	97	>200
3	<i>rac-5c</i>	CaL-A	12	45	78	99	100
4	<i>rac-5d</i>	CaL-A	12	48	80	92	>200

Hidroliza enzimatică la scară analitică a compușilor *rac-4a-d*

Pentru hidroliza enzimatică a hidroxiesterilor *rac-4a-d*, am folosit *rac-4a* ca și compus model și am testat enzimele PLE, lipaza din *Pseudomonas cepacia* (LPS), PPL, CaL-A, CaL-B, CrL, L-AK, lipaza F, lipaza BUTE, lipaza *Mucor miehei*, Acilaza I din rinichi de porc și din *Aspergillus*, esteraza F din *Rhizopus oryzae* întrun amestec apa:DIPE 1:1(v:v). CaL-B a prezentat cea mai mare activitate și valori mari ale selectivității, în timp ce PLE, esteraza F din *Rhizopus oryzae* și Acilaza I au prezentat valori mici ale activității și selectivității. A fost

interesant de observat faptul că, doar esteraza F a prezentat enantiopreferință pentru enantiomerul (*R*) al substratului. Astfel, rezoluția cinetică a *rac*-**4b,c,d** a fost realizată prin intermediul hidrolizei mediate de CaL-B, obținându-se valori ale enantioselectivității de la moderat la excelent (**Tabel 4**).

Produșii (*R*) și (*S*)-**3a-d** au fost derivatizați cu alcool *t*-amilic și s-a investigat metoda cromatografică de separare a enantiomerilor pentru a putea verifica stereoselectivitatea rezoluției cinetice enzimaticice și activitatea enzimelor.

Tabel 4. Hidroliza enzimatică a *rac*-**4a-d** în DIPE:apă 1:1 (v:v):

Intrare	Substrat	Enzima	Config ^a	Timp (h)	<i>c</i> (%)	ee _S (%)	ee _P (%) ^b	<i>E</i>
1	<i>rac</i> - 4a	PLE	(<i>S</i>)	40	42	52	72	10
2	<i>rac</i> - 4a	Esterase F	(<i>R</i>)	40	11	10	75	11
3	<i>rac</i> - 4a	Acylase I	(<i>S</i>)	40	2	2	63	101
4	<i>rac</i> - 4a	CaL-B	(<i>S</i>)	17	42	70	97	124
5	<i>rac</i> - 4b	CaL-B	(<i>S</i>)	15	45	80	93	>200
6	<i>rac</i> - 4c	CaL-B	(<i>S</i>)	14	50	98	96	»200
7	<i>rac</i> - 4d	CaL-B	(<i>S</i>)	40	51	98	95	153

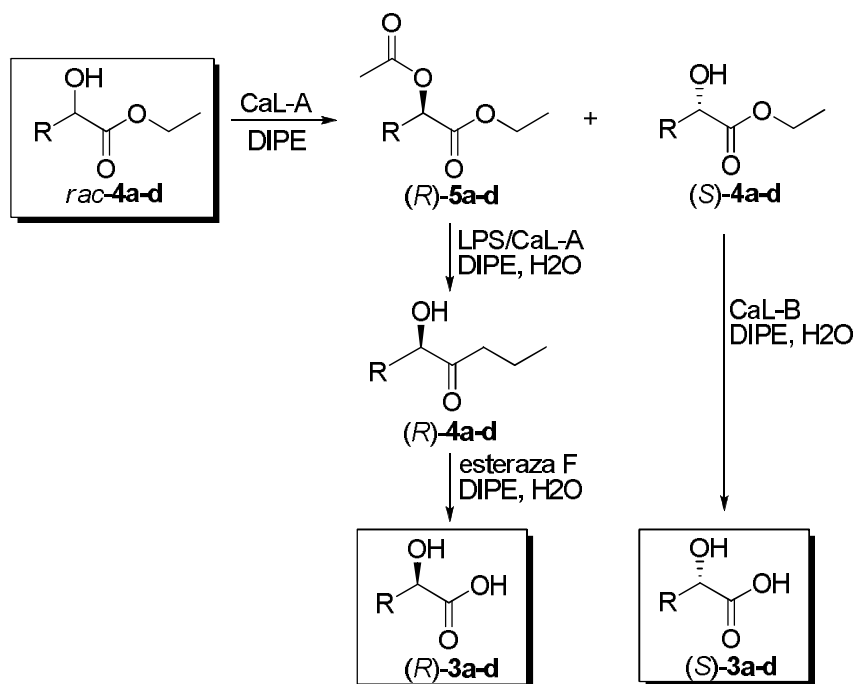
^a configurația absolută a enantiomerului mai reactiv

^b excesul enantiomeric al acizilor optic puri **3a-d** a fost determinat după derivatizarea acidului cu 2,2-dimetil-1-propanol la esterul 2-hidoxi neopentil corespunzător

Sinteza la scară preparativă

În **Schema 4**, este prezentată sinteza la scară preparativă a (*R*)- și (*S*)- **3a-d**. Toate diluțiile, raportul substrat:biocatalizator și condițiile de reacție sunt aceleași ca în cazul reacțiilor la scară analitică.

Pornind de la *rac*-**4a-d**, pe care îi acilăm în prezența CaL-A în DIPE, obținem (*R*)-**5a-d** și (*S*)-**4a-d**. (*S*)-**4a-d** sunt hidrolizați în prezența CaL-B, care prezintă (*S*) selectivitate, în amestec DIPE:apă, obținându-se (*S*)-**3a-d**, în timp ce (*R*)-**5a-d** sunt mai întâi hidrolizați în prezența LPS sau CaL-A la hidroxiesterii (*R*)-**4a-d** corespunzători și apoi, în prezența esterazei F, care prezintă selectivitate (*R*), la (*R*)-**3a-d**. În acest mod, putem obține ambii enantiomeri optic puri ai α -hidroxiacizilor.



Schema 4: Calea enzimatică spre obținerea α -hidroxiacizilor heteroaromatici optic puri

Tabel 5. Excesele enantiomerice și rotațiile specifice ale **3,4,5a-d** izolați în formă enantiomeric pură:

Compus	η (%)	ee [%]	$[\alpha]_D^a$
(R)-3a	90	99	+26
(S)-3a	89	99	-27
(R)-3b	92	99	-26.1
(S)-3b	94	99	+25
(R)-3c	91	99	+3
(S)-3c	90	99	-2.7
(R)-3d	90	99	+46
(S)-3d	88	98	-48.3
(R)-4a	90	95	-38.5
(S)-4b	96	82	-37.1
(R)-4c	92	75	-68.5
(R)-4d	95	98	-103.7

(<i>S</i>)- 5a	86	92	+131.4
(<i>R</i>)- 5b	92	83	+81.3
(<i>S</i>)- 5c	89	93	+80.3
(<i>S</i>)- 5d	93	99	+100.8

^a10⁻¹ deg cm² g⁻¹; c 1.0, CHCl₃, T = 25°C.

Concluzii

A fost realizată sinteza acizilor (*R*)- și (*S*)-2-benzofuranil- și 2-benzo[b]tiofenil-2-hidroxiacetici cu grad mare de enantiopuritate (*ee* până la 99%) prin rezoluția cinetică mediată de CaL-A a α -hidroxiesterilor racemici, urmată de hidroliza mediată de CaL-B a enantiomerului netransformat al substratului (*S*)-**4a-d** pentru a obține (*S*)-**3a-d** și o hidroliză enzimatică în două etape, mai întâi a diacetatului optic pur (*R*)-**5a-d** în prezența LPS sau CaL-A până la hidroxiesterul (*R*)-**4a-d** și apoi, folosind esteraza F, care a prezentat selectivitate (*R*), obținem α -hidroxiacizii optic puri (*R*)-**3a-d**.

4.2.2. Sinteza mediată de lipaze a β -hidroxiesterilor și a β -hidroxiesterilor *O*-acilați optic puri

Pentru a putea investiga stereoselectivitatea reacțiilor enzimaticice ale 3-hidroxi-3-(2-aryl-tiazol-4-il)propanoatilor racemici și a diesterilor acestora, mai întâi s-a investigat separarea cromatografică a enantiomerilor acestora.

Acilarea enzimatică la scară analitică a *rac*-**2e-h**

În efortul de a obține produși de rezoluție cu grad mare de enantiopuritate, am testat mai multe lipaze disponibile comercial (25 mg/mL), în diferiți solvenți organici la temperatura camerei, pentru a găsi condițiile optime ale acilării enantioselective a 3-hidroxi-3-(2-feniltiazol-5-il)propanoatului racemic *rac*-**2e** (0.025M) cu acetat de vinil și butanoat de vinil ca donori acil ireversibili (0.1M). Au fost testate ca potențiali biocatalizatori: lipaza A din *Candida antarctica* imobilizată prin adsorbție pe Celită (CaL-A Celită), CaL-B (Novozyme 435), lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată prin adsorbție pe nanotuburi de carbon cu perete simplu (CaL-B-SWCNT), lipaza din *Candida rugosa* (CrL nativă), lipaza nativă din *Pseudomonas cepacia* (LPS nativă) și lipaza AK imobilizată prin adsorbție pe celită (AK pe Celită) în solvenți organici uscați. Experimentele au fost realizate în prezența sitei moleculare, deoarece chiar și urmele de apă pot produce reacții de hidroliză, rezultând astfel produși secundari nedorți sau o scădere a enantiopurității produșilor.

Natura solventului și a nucleofilului pot influența puternic activitatea și selectivitatea reacției de acilare mediate enzimatic. Astfel, solvenții folosiți au fost selectați deoarece sunt în general acceptați de către lipaze. Printre enzimele testate pentru reacția de *O*-acilare a compusului model *rac-2e*, lipaza AK pe Celită și lipaza *Pseudomonas cepacia* (L-PS nativă) au fost catalitic inactive în toți solvenții studiați, în timp ce CrL, a prezentat selectivitate și activitate diferite în funcție de agentul de acilare folosit. În cazul acilării mediate de CrL cu acetat de vinil în solvenți ca MTBE, DIPE, hexan și toluen, atât viteza de reacție cât și selectivitatea au fost scăzute (**Tabel 6**, intrările **10-13**), iar în cazul acilării cu butanoat de vinil, reacția decurge cu selectivitate scăzută în MTBE, DIPE și hexan (**Tabel 7**, intrările **6-8**). Reacțiile de *O*-acilare cu acetat de vinil au prezentat enantioselectivități moderate în prezența CaL-A pe Celită pentru compusul model *rac-2e* în eteri cum sunt MTBE și DIPE sau în solvenți nepolari cum sunt hexanul, toluenul și acetonitrilul (**Tabel 6**, intrările **1-5**). Atunci când, în aceleași experimente, s-a folosit butanoatul de vinil ca donor acil, CaL-A pe Celită a prezentat o scădere a activității în MTBE (**Tabel 7**, intrarea **1**), iar în restul solvenților a fost inactivă. În termeni de activitate și selectivitate, *O*-acilarea cu acetat de vinil mediată de CaL-B în toți solvenții studiați (**Tabel 6**, intrările **6-9**) s-au obținut rezultate similare cu cele găsite în cazul CaL-A pe Celită. Totuși, o îmbunătățire majoră a selectivității s-a obținut în cazul *O*-acilării cu butanoat de vinil mediate de CaL-B, folosind ca solvenți *n*-hexan și toluen (**Tabel 7**, intrările **4-5**), rezultând produși de rezoluție cu enantiopurități ridicate la o conversie de 50%. Este interesant de remarcat faptul că, CaL-B-SWCNT s-a dovedit inactiv pentru scopul prezent, deși a prezentat activitate și selectivitate ridicate în cazul *O*-acilării selective a *rac*-1-feniletanolului.

Tabel 6. Teste pe diferite lipaze și solvenți pentru *O*-acilarea selectivă a substratului racemic *rac-2e* folosind acetat de vinil, după 17h

Intrare	Enzima	Solvent	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{(R)-3e}	<i>ee</i> _{(S)-2e}	<i>E</i>
1	CaL-A Celită	MTBE	35.3	64	35	6
2	CaL-A Celită	DIPE	78.3	26	94	5
3	CaL-A Celită	CH ₃ CN	68	45	96	9
4	CaL-A Celită	Hexan	72.4	38	>99	14
5	CaL-A Celită	Toluen	29.6	64	27	6
6	CaL-B	MTBE	35.6	47	26	3.5

7	CaL-B	DIPE	32.3	65	31	6.3
8	CaL-B	Hexan	53.7	62	72	8.9
9	CaL-B	Toluen	24.5	74	24	8.4
10	CrL	MTBE	5.2	36	2	2
11	CrL	DIPE	27.2	40	15	2.7
12	CrL	Hexan	33.8	47	24	3.5
13	CrL	Toluen	12.8	68	10	5.8

Tabel 7. Teste pe diferite lipaze și solvenți pentru *O*-acilarea selectivă a substratului racemic *rac-2e* folosind butanoat de vinil, după 17h

Intrare	Enzima	Solvent	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{(R)-3e}	<i>ee</i> _{(S)-2e}	<i>E</i>
1	CaL-A Celită	MTBE	81.9	13	59	2
2	CaL-B	MTBE	51.6	91	97	89
3	CaL-B	DIPE	52.6	89	99	89.7
4	CaL-B	Hexan	52.8	89	>99	127.8
5	CaL-B	Toluen	50	>99	>99	»200
6	CrL	MTBE	20	32	8	2
7	CrL	DIPE	39.6	35	23	2.5
8	CrL	Hexan	54.9	41	50	3.8
9	LPS nativă	Hexan	47.7	80	73	19.5

Alcooliza enzimatică la scară analitică a *rac-3e-h*

Lipazele își rețin de obicei enantiopreferința găsită la acilarea stereoselectivă a alcoolilor chirali inclusiv în cazul hidrolizei sau alcoolizei esterilor corespunzători. În consecință, aceste reacții formează enantiomerii opuși ai etil 3-hidroxi-3-(2-aril-tiazol-4-il)propanoatilor **2e-h** și ai diesterilor acestora **3e-h** decât cei obținuți prin acilarea enzimatică a *rac-2e-h*. În continuare, am studiat alcooliza enzimatică a *rac-3e*, folosit ca și compus model. Experimentele au fost realizate folosind aceleași enzime în toți solvenții testați pentru acilarea enzimatică, prin adăugarea a 5 echivalenți de etanol sau butanol în amestecul de reacție. Cele

mai mari activități și selectivități le-a prezentat etanoliza mediată de CaL-B folosind ca solvenți MTBE (**Tabel 8**, intrare **5**) și DIPE (**Tabel 8**, intrare **6**). Datorită activității mai mari a enzimei în DIPE, acesta a fost utilizat în experimentele următoare.

Tabel 8. Testele pe diferiți alcooli, lipaze și solvenți pentru alcooliza selectivă a diesterului racemic *rac-3e*, după 14h

Intrare	Alcool	Enzima	Solvent	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{(R)-2e}	<i>ee</i> _{(S)-3e}	<i>E</i>
1	EtOH	CaL-A	MTBE	11.1	64	8	4.9
2			DIPE	32.2	59	28	5
3			CH ₃ CN	8.3	77	7	8.2
4			Hexan	19.3	71	17	7
5		CaL-B	MTBE	49.7	97	96	>200
6			DIPE	48.4	>99	93	»200
7			Toluen	6.6	>99	7	>200
8		CRL	Hexan	9.8	55	6	3.6
9	BuOH	CaL-A	CH ₃ CN	3	>99	3	>200
10		CaL-B	DIPE	83	19	94	4
11			Hexan	39.3	71	46	9
12			Toluen	16.6	85	17	14
13		CrL	DIPE	13.1	53	8	3.5
14			Hexan	14.5	47	8	3

Acilarea enzimatică a *rac-2e-h* și etanoliza *rac-3e-h* la scară preparativă

Folosind condițiile optime găsite în urma biotransformărilor la scară analitică atât a *rac-2e* cât și a *rac-3e*, s-a realizat acilarea la scară preparativă mediată de CaL-B a *rac-2e-h* cu butanoat de vinil în toluen (**Tabel 9**, intrările **1-4**) și etanoliza mediată de CaL-B a *rac-3e-h* în DIPE (**Tabel 9**, intrările **5-8**) cu activitate și selectivitate bune (*E* »200, 99% *ee*_s pentru majoritatea produșilor la o conversie de aprox. 50%). Toate diluțiile, raportul substrat:biocatalizator și condițiile de reacție au fost aceleași ca și în cazul reacțiilor la scară

analitică. Randamentele, excesele enantiomerice și rotația specifică ale produșilor sunt date în Tabel 9.

Tabel 9. Acilarea enzimatică la scară preparativă a *rac-2e-h* și etanoliza *rac-3e-h*

Intrare	Substrat	Timp (h)	Produși						<i>E</i>
			<i>ee</i> _{(R)-3}	η (%)	$[\alpha]_D^a$	<i>ee</i> _{(S)-2}	η (%)	$[\alpha]_D^a$	
1	<i>rac-2e</i>	19	99	47	+78.5	99	46	-56.8	»200
2	<i>rac-2f</i>	19	98	45	+75.2	>99	47	-53.5	»200
3	<i>rac-2g</i>	19	99	45	+72.8	99	45	-51.3	»200
4	<i>rac-2h</i>	17	99	46	+86.2	>99	45	-60.4	»200
				<u><i>ee</i>_{(R)-2}</u>			<u><i>ee</i>_{(S)-3}</u>		
5	<i>rac-3e</i>	17	>99	48	+57.2	98	48	-76	»200
6	<i>rac-3f</i>	48	98	46	+49.8	>99	45	-74.1	»200
7	<i>rac-3g</i>	48	>99	45	+51.9	>99	45	-68.5	»200
8	<i>rac-3h</i>	17	>99	45	+59.8	99	46	-83	»200

Concluzii

Am reușit dezvoltarea unei noi proceduri enzimatică de sinteză a etil 3-hidroxi-3-(2-aryl-tiazol-4-il)propanoatilor enantiomeric puri (*ee* 99%). Prin utilizarea rezoluției cinetice enzimatică, au fost sintetizați cu randamente bune ambii enantiomeri optic puri ai patru etil 3-hidroxi-3-(2-aryl-tiazol-4-il)propanoati **2e-h** și patru butanoati **3e-h**. CaL-B s-a dovedit a fi biocatalizatorul optim atât pentru reacția de acilare cu butanoat de vinil a *rac-2e-h* în toluen, cât și pentru etanoliza *rac-3e-h* în DIPE, menținându-și activitatea și stereoselectivitatea de-a lungul a 10 cicluri de reutilizare.

4.2.3. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a α -cianhidrinelor și a α -cianhidrinelor *O*-acilate

Pentru a putea investiga stereoselectivitatea reacțiilor care implică derivații chirali ai 2-hidroxi-2-(5-feniltiofen-2-il)acetonitrilului și a esterilor lor, a fost stabilită mai întâi separarea cromatografică a enantiomerilor *rac*-**2,3i-1** pe HPLC, folosind coloane chirale și diferite amestecuri de *n*-hexan și 2-propanol (v/v) ca eluent.

Acilarea enzimatică la scară analitică a *rac*-**2i-1**

Au fost testate mai multe lipaze disponibile comercial în solvenți organici în vederea obținerii (*R*)-ciano(5-heteroaril-2-il)metil acetatilor enantiomeric puri prin intermediul acilării enantioselective a 2-heteroaril-2-hidroxiacetonitrililor racemici *rac*-**2i-1**. Mai întâi a fost studiată acilarea catalizată enzimatic cu acetat de vinil a *rac*-**2i** la scară analitică, în prezența diferitor lipaze și solvenți. Majoritatea enzimelor testate au fost catalitic inactive după 3 ore, printre care și CaL-B (CaL-B, Novozym 435), lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AK) imobilizată pe sol-gel și lipaza din *Candida rugosa* (CrL). Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AK) imobilizată prin adsorbție pe Celită a prezentat enantioselectivitate și activitate bune în MTBE după 3 ore ($ee_p = 98\%$ și $ee_s = 72\%$ la $c = 42\%$). Prin utilizarea CaL-A imobilizată pe Celită, reacția decurge mai repede și selectivitatea e mărită ($ee > 83\%$) pentru ambii produși ai reacției la o conversie de 48%.

În urma testelor de determinare a influenței raportului substrat:biocatalizator asupra enantioselectivității și conversiei, ne-am oprit asupra unui raport optim substrat:biocatalizator 1:5 (w:w). Natura solventului și a nucleofilului pot influența activitatea și selectivitatea acilării enzimatică enantioselective. Astfel, a fost testată reacția de *O*-acilare cu acetat de vinil mediată de CaL-A a *rac*-**2i** în diferiți solvenți organici (**Tabel 10**). Acetonitrilul s-a dovedit a fi cel mai adecvat solvent (**Tabel 10**, intrare **1**). În CH₂Cl₂ și acetat de etil, selectivitatea și activitatea au fost moderate după 3 ore (**Tabel 10**, intrări **2** și **3**), în timp ce în MTBE și metil-THF, enzima a fost inactivă. Au fost studiate și reacțiile de acilare a *rac*-**2i** mediată de CaL-A, cu mai mulți donori acil: acetat de isopropenil ($ee_p = 81\%$ la $c = 20\%$ după 42h), etil-metoxiacetat, etil-etoxiacetat, pivaloat de vinil în acetonitril, dar fără schimbări semnificative sau chiar inactivi comparativ cu acilarea cu acetat de vinil.

Tabel 10. Acilarea enantioselectivă mediată de diferite enzime a *rac-2i* cu acetat de vinil, în diferiți solvenți

Intrare	Enzima	Solvent	Timp(h)	c (%)	ee _S (%)	ee _P (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	CH ₃ CN	3	46	85	99	>200
2		Acetat de etil	3	22.7	21.5	73.1	7.9
3		MTBE	3	28.8	18.8	46.3	3.2
4		CH ₂ Cl ₂	3	15.8	16.5	87.4	17.6
5		Metil-THF	17	34	22.8	44.3	3.2
6	L-AK	MTBE	3	42	72	98	>200
7		Metil-THF	3	12.6	14	98	121
8		CH ₂ Cl ₂	17	44.6	80	99	>200
9	CaL-B	CH ₂ Cl ₂	17	23	28	91	29
10	L-AKsolgel	MTBE	17	9.5	10	98	109

În cazul 2-hidroxi-2-(5-(4-metoxifenil)tiofen-2-il)acetonitrililor *rac-2j-1*, testele pentru cele mai bune condiții de rezoluție cinetică enzimatică a dat rezultate diferite (**Tabel 11** intrare 3; **Tabel 12**, intrare 9; **Tabel 13** intrare 2). Căutarea condițiilor optime pentru rezoluția cinetică a *rac-2k* a inclus utilizarea acetatului de vinil, butanoatului de vinil și a decanoatului de vinil ca donori acil ireversibili, dar cele mai bune activități și selectivități ale lipazelor au fost obținute în prezența acetatului de vinil (**Tabel 12**).

Tabel 11. Testele cu diferite lipaze și solvenți pentru rezoluția cinetică a *rac-2j* folosind acetatul de vinil ca agent de acilare

Intrare	Enzima	Solvent	Timp (h)	c (%)	ee _S (%)	ee _P (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	MTBE	3	2	6	22	1.6
2	CaL-A	CH ₃ CN	3	41	62	89	32
3	L-AK	CH ₂ Cl ₂	3	50	99	>99	»200
4	L-PS	MTBE	3	14.5	17	99	>200

Tabel 12. Testele cu diferite lipaze și solvenți pentru rezoluția cinetică a *rac-2k* folosind acetatul de vinil ca agent de acilare

Intrare	Enzima	Solvent	Timp (h)	<i>c</i> (%)	<i>ee_S</i> (%)	<i>ee_P</i> (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	CH ₃ CN	3	47	74.4	82	23.3
2		CH ₂ Cl ₂	3	38.6	38.6	90	27.8
3		MTBE	3	67	67	66	9.5
4		Metil-THF	17	14	14	86	15.4
5		DIPE	3	14.9	14.9	21	1.8
6	CaL-B	CH ₂ Cl ₂	3	63	93	54	10.6
7		DIPE	17	54.7	84	69	14.8
8	L-AK	CH ₃ CN	3	4	4	96.5	58.8
9		CH ₂ Cl ₂	17	49	99	99	>200
10		MTBE	3	48.5	83	88	41.7
11		Metil-THF	3	44.6	78.7	97	>200
12		DIPE	3	52	83.6	77	20.2
13	L-PS	CH ₂ Cl ₂	17	49.6	93	94	110
14		DIPE	3	0.1	94	0.1	52

Tabel 13. Testele cu diferite lipaze și solvenți pentru rezoluția cinetică a *rac-2l* folosind acetat de vinil ca agent de acilare

Intrare	Enzima	Solvent	Timp (h)	<i>c</i> (%)	<i>ee_S</i> (%)	<i>ee_P</i> (%)	<i>E</i>
1	L-AK	CH ₃ CN	17	53	99	85	189
2	L-AK	CH ₂ Cl ₂	17	50	99	99	»200
3	L-AK	MTBE	3	52	99	90	>200

Luând în considerare rezultatele obținute la scară analitică pentru cianhidrinele heteroaromatice substituie, pentru reacțiile de acilare la scară preparativă am folosit L-AK în CH₂Cl₂ în cazul substraturilor *rac-2j-1*, în timp ce pentru substratul *rac-2i* reacția de *O*-acilare cu acetat de vinil a fost mediată de CaL-A, în acetonitril (**Tabel 14**).

Tabel 14. Acilarea enzimatică la scară preparativă a *rac-2i-1* folosind condițiile optime găsite la scară analitică și rotațiile specifice ale **2,3i-1** izolați în formă enantiomeric pură

Intrare	Substrat	Timp (h)	Prođuși						<i>E</i>
			<i>ee</i> _{(R)-3}	η (%)	$[\alpha]_D^a$	<i>ee</i> _{(S)-2}	η (%)	$[\alpha]_D^a$	
1	<i>rac-2i</i>	17	99	47	+62.1	80	45	+18.5	>200
2	<i>rac-2j</i>	17	99	45	+16.4	99	47	+156.1	»200
3	<i>rac-2k</i>	17	99	45	+2.6	99	45	+81.46	»200
4	<i>rac-2l</i>	17	99	46	+23.7	99	45	+59.8	»200

^a 10^{-1} deg cm² g⁻¹; c 1.0, CHCl₃, CH₂Cl₂ sau MeOH, T = 25 °C. Randamentele sunt bazate pe randamentul maxim ce poate fi recuperat pornind de la materia primă racemică.

Concluzii

Am dezvoltat o nouă metodă de rezoluție cinetică enzimatică, pornind de la α -cianhidrine racemice, cu scopul obținerii lor și a α -cianhidrinelor *O*-acilate corespunzătoare cu grad mare de enantiopuritate. Pentru trei din cele patru α -cianhidrine heteroaromatice testate, *rac-2j-1*, s-au obținut enantiopurități mari în urma acilării enzimatic mediată de L-AK în diclormetan, iar pentru α -cianhidrina *rac-2i* s-a dovedit a fi mai eficientă acilarea enzimatică mediată de CaL-A în acetonitril.

5. Concluzii generale

Această teză descrie potențialul lipazelor ca și catalizatori chirali cu mare aplicabilitate pentru obținerea α - și β -hidroxiacizilor și a derivaților acestora în formă enantiomeric pură.

Prin exploatarea enantioselectivității diferite a mai multor lipaze, s-a realizat o nouă procedură de rezoluție cinetică secvențială pentru obținerea acizilor (*R*)- și (*S*)-2-benzofuranil- și 2-benzo[b]tiofenil-2-hidroxiacetici cu enantiopuritate mare (*ee* până la 99%).

Am dezvoltat o nouă metodă pentru rezoluția cinetică mediată de lipaze a unei serii de β -hidroxiesteri heteroaromatici substituiți diferit, și am obținut excese enantiomerice mari ale produșilor formați (*ee* 99%). CaL-B s-a dovedit a fi biocatalizatorul potrivit atât pentru reacțiile de *O*-acilare, cât și pentru cele de etanoliză, în diferite medii de reacție.

Au fost obținute cu excese enantiomerice mari o serie de patru (*S*)- α -cianhidrine cu schelet feniltiofenic substituit diferit și (*R*)-*O*-acilații corespunzători, prin rezoluția cinetică a α -cianhidrinelor racemice, mediată de CaL-A sau L-AK.

7. Mulțumiri

Munca experimentală a fost realizată în laboratoarele grupului de cercetare de Biochimie și Inginerie Biochimică condus de Prof. Florin Dan Irimie, în cadrul Departamentului de Chimie, la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai.

În primul rând as vrea să-mi exprim recunoștința față de conducătorul meu științific Prof. Florin Dan Irimie pentru că m-a introdus în domeniul biocatalizei, pentru că m-a supravegheat și îndrumat în timpul anilor de doctorat și pentru că m-a încurajat să accept provocările care mi-au permis să-mi îmbunătățesc aptitudinile științifice și să-mi largesc orizonturile.

Mulțumiri speciale adresez și Conf. Dr. Ing. Habil. Paizs Csaba, Conf. Dr. Ing. Monica Ioana Toșa, Conf. Dr. Ing. Gabriel Katana, Lect.Dr. Paula Podea, Asist. Univ. Csaba Laszlo Bencze, Dr. Brem Jürgen, pentru că au împărtășit din cunoștințele lor cu mine, pentru că au creat un mediu propice de lucru și pentru atitudinea lor pozitivă de-a lungul studiilor mele doctorale.

Îmi exprim recunoștința și față de colaboratorii noștri, Prof. László Poppe de la Universitatea Eötvös Lóránd și Prof. Valentin Zaharia de la Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu pentru că au împărtășit din expertiza și substanțele lor. Îi mulțumesc Prof. Liisa Kanerva de la Universitatea din Turku pentru cadoul generos de enzime și pentru sfaturile utile. De asemenea, mulțumesc referenților acestei teze pentru comentariile și sfaturile utile.

Am avut privilegiul să lucrez în cadrul unui grup de cercetare cu oameni pasionați, care au contribuit la dezvoltarea mea profesională și cărora le sunt recunoscătoare pentru ajutorul acordat la realizarea experimentelor, pentru prietenia lor și pentru acele momente de la pauzele de cafea cu discuțiile interesante care erau întreruperi binevenite în zilele de muncă: Alexandra Mantu, Andrea Varga, Hajnal Vari-Bartha, Botond Nagy, Norbert Dima, Mădălina Elena Moisă, Denisa Hathazi, Alina Filip, Annamaria Varga, Denisa Hapău, Dr. Melinda Fustos, Dr. Laura Pop, Dr. Laura Chiș, Dr. Györfi Zoltán Attila, Dr. Maria Trif, Dr. Monica Hriscu, Dr. Augustin Cătălin Moț, Dr. Florina Violeta Deac, Dr. Cristina Bischin, Kallo Noemi-Hajnalka.

Le mulțumesc colegilor din celelalte grupuri de cercetare pentru ajutorul acordat în problemele de natură științifică întâlnite. Apreciez ajutorul Asist. Univ. Emese Gal pentru

analizele MS, și al Dr. Dan Porumb și Dr. Alpár Pöllnitz pentru ajutorul acordat la măsurarea probelor de RMN.

Mulțumesc pentru suportul financiar acordat de Programul Operațional Sectorial de Dezvoltare a Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat de către Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/132400 și pentru suportul financiar acordat de către Ministerul Educației și Cercetării în cadrul proiectului PN II ID PCE 3-0775/2011.

Nu în ultimul rând, vreau să mulțumesc familiei mele pentru atitudinea lor iubitoare, încrezătoare, încurajatoare și răbdătoare de-a lungul studiilor mele doctorale.

Sincere mulțumiri prietenilor mei, pentru că au fost alături de mine oricând am avut nevoie, indiferent dacă a fost un moment fericit sau un moment trist din viața mea.

8. Lista de publicații

Această teză se bazează pe următoarele publicații, menționate în text cu numeralele I și III. Sunt incluse și date care nu au fost publicate încă.

Publicații științifice:

- I. Varga A., Naghi M. A., Füstös M., Katona G., Zaharia V.: CaL-B mediated synthesis of optically pure (*R*)- and (*S*)- ethyl 3-hydroxy-3-(2-aryl-thiazol-4-yl)propanoates, *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, 25, 298-304.
- II. Toma A., Hapau D., Naghi M., Vlase L., Mogoșan C., Zaharia V.: Synthesis and antiinflammatory activity of new polyheterocyclic Schiff bases and Mannich bases, *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* **2013**, 2, 93-104.
- III. Naghi M. A., Bencze L.C., Brem J., Paizs C., Irimie F. D., Tosa M. I.: Sequential enzymatic procedure for the preparation of enantiomerically pure 2-heteroaryl-2-hydroxyacetic acids, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 181–187.
- IV. Brem J., Naghi M., Tosa M. I., Boros Z., Poppe L., Irimie F. D., Paizs C.: Lipaze mediated sequential resolution of aromatic β -hydroxy esters using fatty acid derivatives, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1672–1679.
- V. Trif M., Kallo N. H., Naghi M. A., Bencze L. C.: Stereoselective bioreduction of 1-(5-phenylfuran-2-yl)-ethanones mediated by baker's yeast, *Biocatalysis and Biotransformation* **2011**, 30(2), 177-183.

Publicații la conferințe:

- I. Naghi M.A., Tosa M.I., Paizs C., Irimie F.D.: Lipaze-mediated kinetic resolution towards enantiomerically enriched α - and β -hydroxy acids and derivatives, Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Warsaw, **2014** (prezentare orală).
- II. Naghi M. A., Vari J.H., Tosa M.I., Paizs C., Irimie F.D.: CaL-A mediated kinetic resolution of racemic 2-hydroxy-2-(5-phenylthiophen-3-yl)acetonitrile and its derivatives, 13th Symposium and Summer School on Bioanalysis (13th ISSSB), Debrecen, Hungary, **2013** (poster).
- III. Naghi M.A., Paizs C., Irimie F.D., Tosa M.I.: A sequential enzymatic methodology as a new approach for the synthesis of optically pure heteroaryl- α -hydroxy acids, "Centenary of Education in Chemical Engineering" International Conference, Iasi, Romania, **2012** (poster).
- IV. Naghi M. A., Lăcățus M., Nagy B., Brem J., Irimie F. D.: Biocatalytic synthesis of various optically active (hetero)aryl- β -hydroxy-propanoic acid derivatives, 7th International Conference "Students for students", Cluj-Napoca, Romania, **2011** (poster).

9. Referințe

- ¹ Zaks, A.; Dodds, D. R. *Drugs Discovery Today* **1997**, *2*, 513–531.
- ² Höberg, H. E.; Berglund, P.; Edlund, H.; Fagerhag, J.; Hedenström, E.; Lundh, M.; Nordin, O.; Servi, S.; Vörde, C. *Catal. Today* **1994**, *22*, 591–606.
- ³ Ariens, E. J.; van Rensen, J. J. S.; Welling, W. *Stereoselectivity of Pesticides: Biological and Chemical Problems*, Elsevier: Amsterdam, **1988**.
- ⁴ Savidge, T. A. In *Biotechnology of Industrial Antibiotics*; Vandamme, E. J., Ed.; Marcel Decker: New York, **1984**, 177–224.
- ⁵ Yadav, G. D.; Sivakumar, P. *Biochem. Eng. J.* **2004**, *19*, 101–107.
- ⁶ Wilen, S. H.; Allinger, N. L.; Eliel, E. L. In *Top. Stereochem.* **1971**.
- ⁷ (a) Bousquet, A., Musolino, A. **2003**. Hydroxyacetic ester derivatives, preparation method and use as synthesis intermediates. US 6573381 B1; (b) Hashimoto, Y., Kobayashi, E., Endo, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1279–1283.
- ⁸ (a) Ren, Q.; Ruth, K.; Thöny-Meyer, L.; Zinn, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 41–52; (b) Kallergi, M.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *20–21*, 3946–3950.
- ⁹ (a) Kobayashi, R.; Konomi, M.; Hasegawa, K.; Morozumi, M.; Sunakawa, K.; Ubukata, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 889–894; (b) Turcu, M. C.; Kiljunen, E.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1682–1687; (c) Hung, H.; Pan, X.; Tan, N.; Zeng, G.; Ji, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 365–372; (d) Turcu, M. C.; Rantapaju, M.; Kanerva, L. T. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5594–5600.
- ¹⁰ (a) Zhang, S.; Norrflow, O.; Wawrzynczyk, J.; Dey, E. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 6776–6782; (b) Ratovelomanana-Vidal, V.; Girard, C.; Touati, R.; Tranchier, J. P.; Ben Hassine, B.; Genet, J. P. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 261–274.
- ¹¹ (a) Garcia-Urdiales, E.; Rebollo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3047–3052; (b) Reetz, M. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145–150.
- ¹² Cabral, J. M. S.; Kennedy, J. F. *Thermostability of Enzymes*, (Ed.: M. N. Gupta), Springer Verlag, Berlin, **1993**, 163–179.
- ¹³ Klibanov, A. M. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 97–101.
- ¹⁴ Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81–87.
- ¹⁵ Yang, G.; Wu, J. P.; Xu, G.; Yang, L. R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 847–853.
- ¹⁶ Schober, M.; Faber, K. *Trends in Biotechnology* **2013**, *31*, 8.
- ¹⁷ (a) Keith, J. M.; Larrow, J. F. and Jacobsen, E. N. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 5–26; (b) Cook, G. R. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 869–885.
- ¹⁸ Kagan, H. B. and Fiaud, J. C. *Topics in Stereochemistry*, ed. E. L. Eliel and J. C. Fiaud, Wiley, New York, **1988**, *18*, 249–330.
- ¹⁹ Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56* (8), 2656–2665.
- ²⁰ Flack, H. D.; Bernardinelli, G. *J. Appl. Cryst.* **2000**, *33*, 1143–1148.
- ²¹ Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (8), 4603–4641.
- ²² Huang, Z.; Zhang, J.; Zhou, Y.; Wang, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2011*, 843–847.
- ²³ Evans, D. A.; Aye, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11034–11035.
- ²⁴ Yamamoto, Y.; Shirai, T.; Miyaura, N. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2803–2805.

-
- ²⁵ (a) Sterk, D.; Stephan, M. S.; Mohar, B. *Tetrahedron* **2004**, *45*, 535-537;(b) Meng, Q.; Sun, Y.; Ratovelomanana-Vidal, V.; Genet, J. P.; Zhang, Z. *ChemInform* **2008**, *39*.
- ²⁶ Duthaler, R. O.; Herold, P.; Lottenbach, W.; Oertle, K.; Riediker, M. *Angew. Chem.Int. Ed.* **1989**, *28*, 495-497.
- ²⁷ Basavaiah, D.; Bharathi, T. K. *Tetrahedron letters* **1991**, *32*, 3417-3420.
- ²⁸ Hinterding, K.; Jacobsen, E. N. *J. org. chem.* **1999**, *64*, 2164-2165.
- ²⁹ Wang, Z.; Zhao, C.; Pierce, M.E.; Fortunak, J.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 225-228.
- ³⁰ Wohlgemuth, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724.
- ³¹ Groger, H. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 547-558.
- ³² (a)Ema, T.; Ide, S.; Okita, N.; Sakai, T. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2039-2044; (b) Ma, H.M.; Yang, L.L.; Ni, Y.; Zhang, J.; Li, C.X.; Zheng, G.W.; Yang, H.Y.; Xu, J.H. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1765-1772;(c) Ni, Y.; Pan, J.; Ma, H.M.; Li, C.X.; Zhang, J.; Zheng, G.-W.; Xu, J.H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4715-4717.
- ³³ Zhang, C.S.; Zhang, Z.J.; Li, C.X.; Yu, H.L.; Zheng, G.W.; Xu, J.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 91-99.
- ³⁴ (a)Miyazawa, T.; Imagawa, K.; Yamada, T. *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 291-298. (b) Ma, J.B.; Wu, L.; Guo, F.; Gu, J.; Tang, X.L.; Jiang, L.; Liu, J.; Zhou, J.H; Yu, H.W *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 4897- 4906.
- ³⁵ (a)Turner, N., J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114-119;(b) Lee, J. H.; Han, K.; Kim, M. J.; Park, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015.
- ³⁶ (a)Strauss, U. T.; Faber, K. *Tetrahedron:Asymmetry* **1999**, *10*, 107-117; (b) Chadha, A.; Baskar, B. *Tetrahedron: Asymmetry***2002**, *13*, 1461-1464.
- ³⁷ Lavandera, I.; Kern, A.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; Wildeman, S.; Kroutil, W. *J. Org. Chem.***2008**, *73* (15), 6003-6005.
- ³⁸ (a)Bencze, C.L.; Paizs, C.; Tosa, M.I.; Vass, E.; Irimie, F.D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 443-450;(b) Ryu, D.H.; Corey, E.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8106-8107.
- ³⁹ Edegger, K.; Stampfer, W.; Seisser, B.; Faber, K.; Mayer, S. F.; Oehrlein, R.; Hafner, A.; Kroutil, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1904-1909.
- ⁴⁰ (a)Kanerva, L. T.; Liljeblad, A. *Transesterification-Biological in Encyclopedia of Catalysis* **2010**, John Wiley & Sons; (b) Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.
- ⁴¹ Takashi, E.; Kunihiro, Y.; Yuji, W.; Nobuaki, T.; Masanori, U.; Takashi , S. *Chemistry Letters* **2000**, *7* , 782 - 783.
- ⁴² (a) Mori, K.; Akao, H. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 91-96;(b) Simeo, Y.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 402-409.
- ⁴³ (a) Raminska, J.E.; Smigielski, K.; Lobodzinska, D.; Gora, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1211-1215; (b) Virsu, P.; Liljebad, A.; Kanerva, A.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *12*, 2447-2455.
- ⁴⁴ (a)Babiak, P., Kyslikova, E., Stepanek, V., Valesova, R., Palyzova, A., Maresova, H., Hajicek, J., Kyslik, P. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 7621-7626; (b) Wu, J., Wang, J.L., Li, M.H., Lin, J.P., Wei, D.Z. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8936-8941.

-
- ⁴⁵ (a)Gao, C., Qiu, J., Li, J., Ma, C., Tang, H., Xu, P. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1878–1880;(b)Gao, C., Zhang, W., Ma, C., Liu, P., Xu, P. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 4595–4599.
- ⁴⁶ Bornscheuer, U. T. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**.
- ⁴⁷ (a)Campbell, R. F.; Fitzpatrick, K.; Inghardt, T.; Karlsson, O.; Nilsson, K.; Reilly, J. E.; Yet, L. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5477– 5481; (b) Ma, B.D.; Yu, H.L.; Pan, J.; Liu, J.Y.; Ju, X.; Xu, J.H. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 354–360.
- ⁴⁸ (a)Brem, J.; Tosa, M. I.; Paizs, C.; Vass, E.; Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 365–373;(b) Brem, J.; Paizs, C.; Tosa, M.I.; Vass, E.; Irimie, F.D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 489–496;(c)Patel, J.M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61*, 123–128;(d)Wang, P. Y.; Tsai, S. W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *59*, 70–75.
- ⁴⁹ (a)Brem, J.; Liljeblad, A.; Paizs, C.; Tosa, M. I.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 315–322;(b)Huerta, F.F.; Bäckvall, J.E. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1209–1212;(c)Milagre, C.D.F.; Milagre, H.M.S.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1410–1418;(d)Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. *Tetrahedron:Asymmetry* **2009**, *20*, 513–557.
- ⁵⁰ (a)Brem, J.; Naghi, M.; Tosa, M.I.;Boros, Z.;Poppe, L.;Irimie, F.D.; Paizs, C.*Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1672–1679;(b)Liaquat, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 59–65;(c)Santaniello, E.; Casati, S.; Ciuffreda, P.; Meroni, G.; Pedretti, A.; Vistoli, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1833–1836;(d)Torres-Gavilán, A.; Escalante, J.; Regla, I.; López- Munguía, A.; Castillo, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2621–2624.