



Universitatea BABEȘ-BOLYAI



CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Catedra de Biochimie și Inginerie Biochimică

**Aspecte stereoselective în sinteza chemoenzimatică a
(N-alchil-fenotiazin-3-il)etanolilor**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific:

Prof. Dr. Ing. Florin-Dan Irimie

Doctorand:

Anca Munceanu

Cluj-Napoca

2012

Cuprins

1. Introducere

2. Partea teoretică

3. Obiectivele activității de cercetare

4. Rezultate și discuții

4.1. Sinteza și biotransformarea a N-alkil-fenotiazin-3-il-etanolilor și a esterilor lor

4.1.1. Sinteza chimică

4.1.2. Sinteze enzimatic

4.1.2.1. Biotransformări la scară analitică

4.1.2.2. Sinteza la scară preparativă a enantiomerilor (*R*) și (*S*) ai alcoolilor 2a-d și ai esterilor 3a-d chirali

4.1.3. Determinarea configurației absolute a enantiomerului (*R*)-2b sintetizat prin alcooliza enantiomer selectivă a *rac*-2b

4.2. Sinteza enantiomerilor (*R*) și (*S*) ai 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)etanolului

și a acetatului lui cu ajutorul lipazelor din *Pseudomonas fluorescens*

4.2.1. Sinteze chimice

4.2.2. Biotransformări cu lipaze

4.2.2.1. Transformări enzimatic la scară analitică

4.2.2.2. Creșterea performanțelor biocatalitice prin imobilizarea enzimei

4.2.2.3. Biotransformări la scară preparativă

5. Concluzii

Cuvinte cheie: lipaze, biotransformare, 1-(10*H*-fenotiazin-2,3-il)etanol, rezoluție cinetică enzimatică, imobilizarea lipazelor

1. Introducere

Numeroși alcooli secundari enantiopuri, conținând fragmente heterodidice, sunt cunoscuți pentru activitatea lor biologică¹. Alții sunt intermediari cheie în sinteza unui număr mare de produși farmaceutici².

Pentru sinteza compușilor optici activi s-au dezvoltat diferite metode chemo- și biocatalitice, bazate pe rezoluția cinetică enantiomer-selectivă a racemașilor sau pe transformări enantiotop selective ale substraturilor prochirale³.

Lipazele au fost foarte des folosite în rezoluții cinetice convenționale, rezoluții cinetice dinamice și deracemizări, datorită activității chemo-, regio- și enantioselective ridicate față de o gamă largă de substraturi⁴.

Structurile pe bază de fenotiazine sunt cunoscute pentru activitatea lor biologică, acoperind o abundență de efecte terapeutice (sedative, tranchilizante, agenți antitumorali, bactericide, paraziticide etc.)⁵.

Arhitectura moleculară simplă a etanolilor fenotiazinici 1-substituiți, care permite derivatizarea ulterioară, precum și rezultatele anterioare obținute de colectivul prof. Irimie în sintezele enzimatiche ale unor compuși fenotiazin-3-il-dianhidrine⁶, acizi β -hidroxi propanoici⁷, și fenotiazin-3-il-metanoli⁸, enantiomeric îmbogățiți, au atras interesul nostru în dezvoltarea unor proceduri enzimatiche pentru sinteza **fenotiazin-2,3-il-etanolilor N-alchilați**.

Încurajați de reducerea enantiotop-selectivă, recentă, a 2-acetil-fenotiazinei, în prezența spiroborăților chirali⁹, care furnizează enantiomerul (*R*) pur al fenotiazin-3-il-etanolului a fost investigată mai întâi reducerea celulară mediată de *S. cerevisiae* a derivaților N-alchilați ai fenotiazin-3-il-etanonei. Din păcate s-au realizat conversii mici ale substraturilor (<5%).

Spre deosebire de biotransformarea celulară a cetonei, rezoluția cinetică mediată de lipaze a amestecului racemic de fenotiazin-3-il-etanoli N-alchilați și a esterilor corespunzători s-a dovedit a fi o metodă eficientă de producere de compuși enantiomeric puri. Configurația absolută a acestor compuși enantiomeric puri, a fost determinată prin difracție de raze X

În scopul obținerii de etanoli heterocidici, de puritate enantiomerică ridicată sau optic puri¹⁰, rezoluția cinetică enantiomer selectivă, catalizată de lipaze, a amestecului racemic de alcooli și a acetaților corespunzători, a fost utilizată pentru sinteza ambilor enantiomeri ai 1-(10-etil-10H-fenotiazin-2-il)-1-etanolului.

Pentru aplicarea acestor rezultate în procese industriale este necesară utilizarea unui catalizator ieftin, stabil și eficient.

Lipazele din *Pseudomonas fluorescens* (PFL) aparțin lipazelor comerciale utilizate frecvent în reacțiile biocatalitice. Imobilizarea lor prin utilizarea adsorbției¹¹, prin reticulări enzimatiche cristalizate¹², încapsularea prin tehnica sol-gel¹³, combinarea acestor metode¹⁴ sau alte tehnici¹⁵ a fost extrem de studiată.

Performanțele catalitice cum ar fi activitatea, stabilitatea și selectivitatea biocatalizatorilor pot fi îmbunătățite în mai multe moduri: fie prin modificarea structurii proteinelor și crearea unor enzime artificiale fie prin imobilizarea lor.

În această lucrare de cercetare a fost investigată rezoluția cinetică enzimatică a amestecului racemic al 1-(10-etil-10H-fenotiazin-2-il)-1-etanolului *rac-4b* și a acetatului său *rac-5b*, în prezența lipazei din PFL încapsulată în sol-gel, pentru obținerea ambilor enantiomeri, intermediari valoroși în sinteza de compuși activi chirali. Au fost determinate activitatea catalitică, enantioselectivitatea și reutilizarea preparatului enzimatic. A fost studiată deasemenea și influența celitei și zaharozei folosite ca aditivi, asupra performanțelor și stabilității biocatalizatorului imobilizat, în procesul de rezoluție cinetică enzimatică a heteroalcoolului racemic, *rac-4b*.

2. Partea teoretică (studiu de literatură)

3. Obiectivele activității de cercetare

Activitatea de cercetare s-a axat pe următoarele direcții:

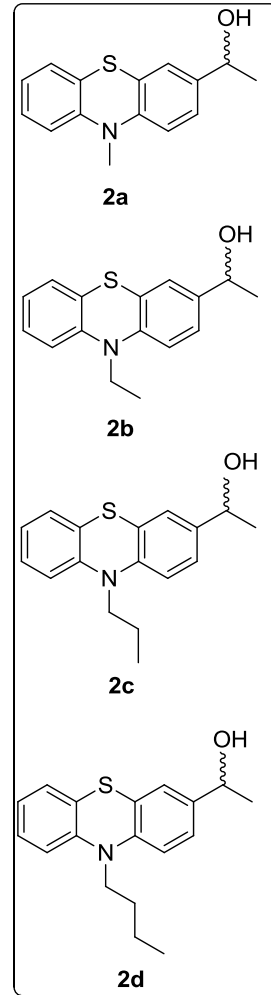
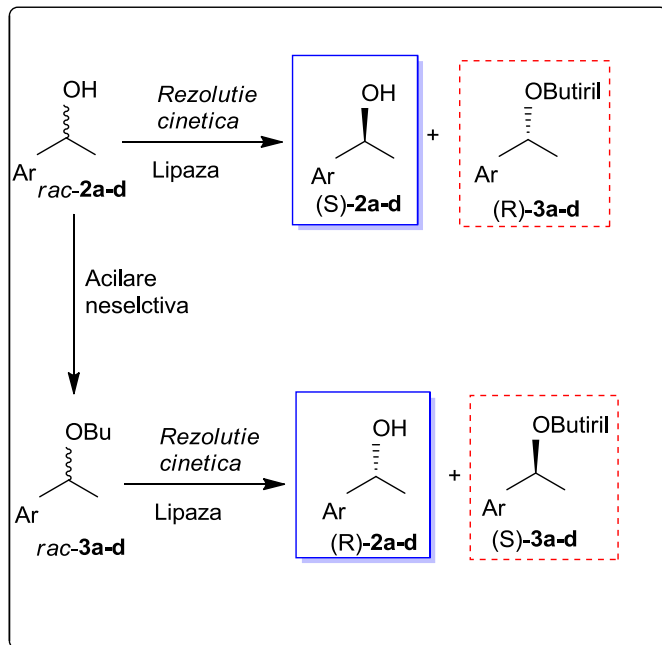
1.a. Elaborarea unei noi metode stereoselective de sinteză a ambilor enantiomeri ai 1-(10-alcil-10*H*-fenotiazin-3-il)etanoliilor **2a-d** diferit substituiți și a butanoatilor lor **3a-d** prin rezoluția cinetică enantiomer selectivă catalizată de lipaze a racemicilor alcoolici și esterici. Datorită conservării enantiopreferinței lipazelor în acilările și în alcoolize enzimatică, prin combinarea acilării enzimatică a unui substrat alcoolic racemic cu alcooliza mediată de aceeași lipază a substratului esteric racemic este posibilă obținerea formelor enantiomerice opuse (*R*)-**2,3a-d** și (*S*)-**2,3a-d** a alcoolilor și esterilor chirali. Rezoluția cinetică mediată de lipaze s-a dovedit deja a fi o metodă eficientă de sinteză a acetaților de fenotiazin-3-il-cianohidrine⁶ cu enantiopuritate ridicată. De asemenea rezoluția cinetică mediată de lipaze a fost aplicată cu succes și în cazul sintezei unor acizi β-hidroxi-β-fenotiazin-3-il-propanoici optici puri⁷.

1.b. Creșterea selectivității enantiomerice și activității catalitice ale enzimei prin selectarea solventului și agenților nucleofili optimi.

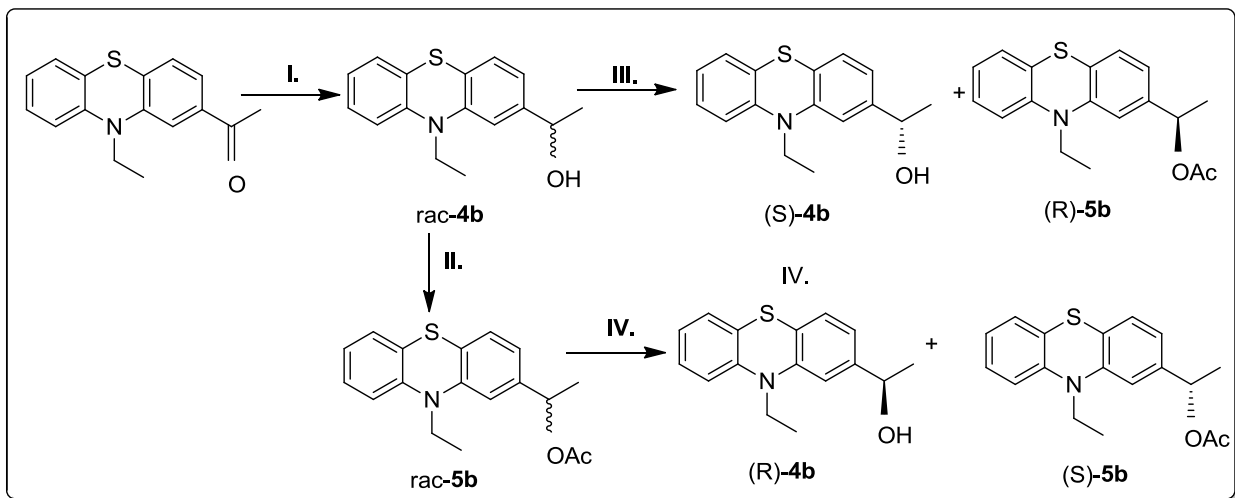
2.a. Obținerea formelor enantiomerice opuse, (*R*) și (*S*) ai 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)-1-etanoliului **4b** respectiv acetatului de 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)-1-etil **5b** prin rezoluția cinetică enzimatică a racemicilor *rac-4b* și *rac-5b*, în prezența lipazei din PFL. Determinarea condițiilor optime ale acilării și alcoolizei mediate de PFL pentru creșterea enantiopurității produsilor rezoluției cinetice.

2.b. Îmbunătățirea proprietăților catalitice ale PFL prin includere într-o matrice sol gel. Determinarea activității catalitice, a enantioselectivității și posibilității reutilizării preparatului enzimatic în procesul de rezoluție cinetică enzimatică a heteroalcoolului racemic, *rac-4b*.

1.



2.



Schema 1. Biotransformarea N-alkil-fenotiazin-3-il-etanolilor și a esterilor lor

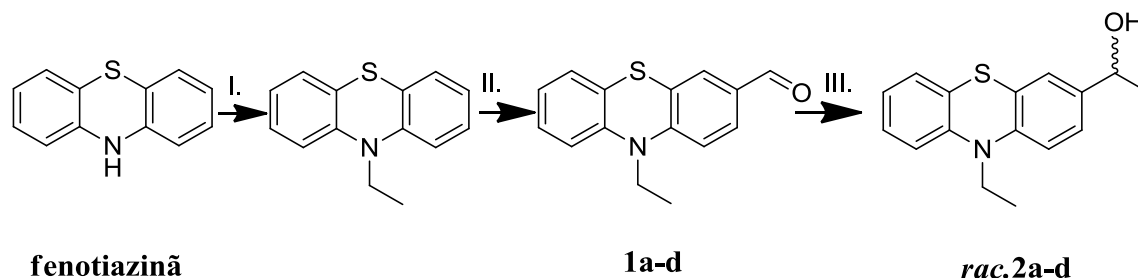
2. Sinteza enantiomerilor (R) și (S) ai 1-(10-etil-10H-fenotiazin-2-il)etanolului și a acetatului lui cu ajutorul lipazelor din *Pseudomonas fluorescens*

4. Rezultate și discuții

4.1. Sinteza și biotransformarea a N-alkil-fenotiazin-3-il-etanolilor și a esterilor lor

5.1. Sinteza chimică

Amestecurile racemice de 1-(10-alkil-10H-fenotiazin-3-il)etanoli, *rac-2a-d*, au fost preparate din heteroaril carbaldehidele **1a-d** corespunzătoare printr-o reacție Grignard. Carbaldehidele N-alkilate **1a-d** au fost obținute din fenotiazină în 2 etape: alchilarea cu iodură de alchil, în prezența hidrurii de sodiu, în DMF, urmată de reacția Vielsmeier Haack a derivaților 10-alkil-10H-fenotiazinici cu tridoxura de fosfor și DMF, în DMF¹⁶.

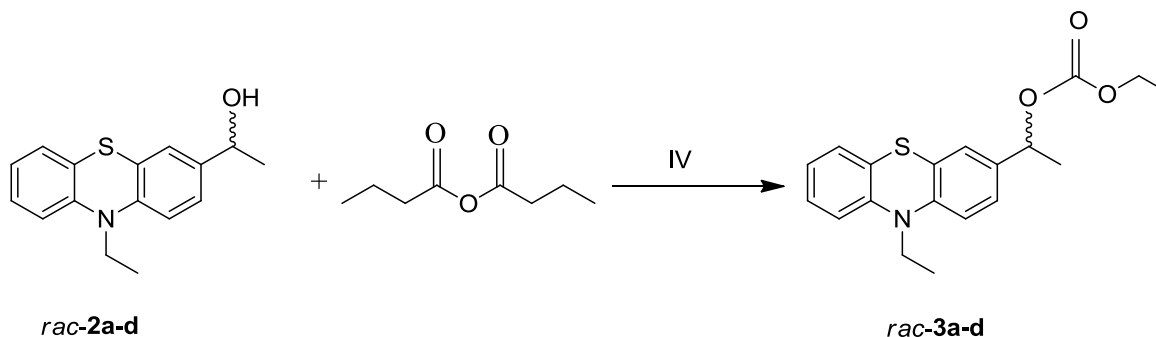


Schema 2. Sinteza chimică a *rac-2a-d*. Reactivi și condiții: (I) NaH, CH₃CH₂I, DMF, tc.; (II) POCl₃, DMF, DMF, (III) CH₃I, Mg, Et₂O.

În timpul experimentului și a procedurilor de purificare s-a observat instabilitatea racemicilor *rac-2a-d*. Fenomenul s-a observat în etapa de separare realizată pe o coloană de silice, folosindu-se didometan ca eluent. În timp ce la temperatura camerei și la un pH neutru, sunt foarte stabili, la temperaturi mai ridicate și la pH-uri mai mici, heteroaril-etanolii *rac-2a-d* încep ușor să se descompună. Eliminarea cu ușurință a apei poate să fie o explicație pentru instabilitatea acestor compuși. Acest fenomen a fost deja relatat¹⁷ în cazul eliminării apei, la temperaturi scăzute, din diferiți feniletanoli în prezența zeoliților sau silicagelului, ambii cu caracter acid, cu formarea compușilor nesaturați corespunzători. A fost testată posibilitatea înlocuirii eluentului și s-a constatat că metanolul ar putea stabiliza parțial alcoolul racemic, dar

fenomenul de descompunere nu a fost eliminat de cat partial. Prin înlocuirea fazei stationare de silicagel cu oxid de aluminiu si efectuarea separarii cromatografice în timp scurt, la vid, problema a fost rezolvată. În timpul izolării prin distilarea la vid a *rac-2a-d* din soluții, stabilitatea compușilor principali a crescut semnificativ prin adăugarea de alcooli alifatici în mediu.

Alcoolii racemici *rac-2a-d* au servit la prepararea esterilor racemici *rac-3a-d*, prin acilarea chimică cu diferite anhidride acide, în didormetan anhidru, în prezența trietilaminei și DMAP în cantități catalitice (Schema 23). Spre deosebire de *rac-2a-d*, compușii *rac-3a-d* au fost stabili la temperaturi ridicate ($t < 80^{\circ}\text{C}$) dar hidrolizează foarte ușor chiar și în prezența acizilor sau bazelor.



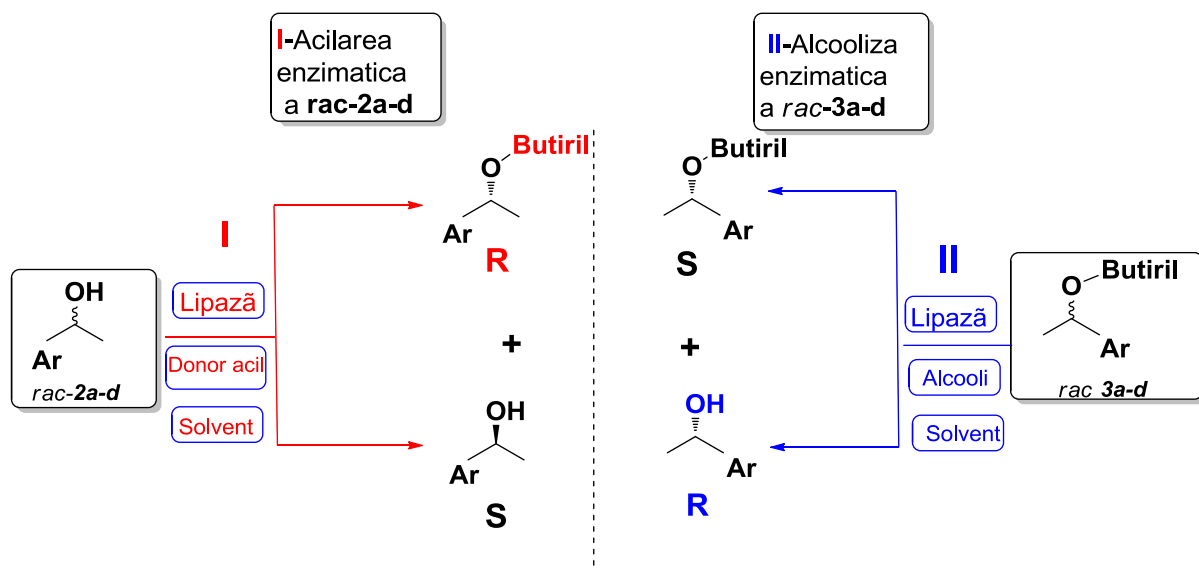
Schema 3. Sinteza chimică a esterilor racemici, *rac-3a-d*. Reactivi și condiții : Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2

4.1.2. Biotransformări enzimatic

Biotransformarea 1-(10-alkil- 10H- fenotiazin-3-il)etanolilor *rac-2a-d* și a esterilor racemici *rac-3a-d* diferit substituiți prin rezoluție cinetică catalizată de lipază s-a desfășurat în 2 etape : acilarea enzimatică selectivă a etanolilor racemici în care s-au obținut (*R*)-heteroarilesterii **3a-d** și (*S*)-heteroariletanolii **2a-d** urmată de alcooliza enzimatică selectivă a acetaților racemici corespunzători care a condus la obținerea formelor enantiomere opuse (*S*)-**3a-d** și (*R*)-**2a-d**

Pentru investigația stereoselectivității rezoluției enzimice și a activității enzimelor în prima etapă au fost separați cromatografic enantiomerii racemidilor *rac-2a-d* și *rac-3a-d*, folosindu-se coloanele HPLC chirale potrivite.

4.1.2.1. Biotransformări la scară analitică

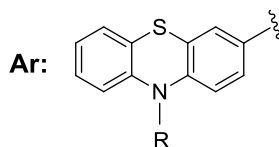


Agentul de acilare : acetat de vinil, propanoat de vinil, butanoat de vinil, pivalat de vinil;
Solvent : diclorometan, cloroform, THF, t-MBE, toluen, acetonitril;
Lipază : CaL-A, CaL-B, L-AK, *Lipozyme TL IM,F*, PPL, *Mucor miehei*, BCL;

Alcooli: MeOH, EtOH, *n*-PrOH, *n*-BuOH;

Solvent: *n*-hexan, acetonitril, dioxan;

Lipază : CaL-B;



Schema 4. Biotransformarea *rac-2a-d* și *rac-3a-d* la scară analitică

Acilarea enzimatică a *rac-2a-d* la scară analitică

Mai întâi, a fost studiată acilarea enzimatică a amestecurilor racemice de 1-(10-alkil-10H-fenotiazin-3-il)etanoli *rac-2a-d* la scară analitică.

Utilizându-se 1-(10-etil-10H-fenotiazin-3-il)etanol *rac-2b* ca și compus model, o selecție de lipaze comerciale a fost testată pentru acilarea enzimatică cu acetat de vinil ca și solvent și ca și agent de acilare (**Schema 24, Tabelul 1**).

Tabel 1. Acilarea catalizată de lipaze a *rac-2b* cu acetat de vinil.

Nr.crt.	Enzimă	Timp (h)	C (%)	ee <i>(R)</i> -3b (%)	ee <i>(S)</i> -2b (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	4	40,5	63,5	88,2	30
2	CaL-B	6	50,4	98,4	>99,5	>>200
3	L-AK	6	50,3	98,8	>99,5	>>200
4	BCL	6	40	99,5	66,9	>200
5	<i>Lypozime TL IM</i>	6	24,5	99,0	32,1	>200
6	Lipase din <i>Mucor miehei</i>	6	30,9	98,6	44,1	200
7	Lipaze F ^a	48	4,8	85,7	4,3	13
8	PPL	6	1,7	86,6	1,5	14

^aSelectivitate inversă

Diferite lipaze comerciale cum ar fi lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B sub numele de Novozym 435), lipaza L-AK, lipazele din *Bulkholderia cepacia* (BCL), *Lypozyme TL IM* și lipazele din *Mucor miehei* au prezentat enantioselectivități și activități catalitice ridicate ($E > 200$, $c = 24-50\%$ după 6h, **Tabelul 1**, liniile 2-6), în timp ce lipaza A din *C. Antarctica* (CaL-A) a catalizat cu viteză mare dar cu selectivitate moderată acilarea *rac-2b* (**Tabelul 1**, linia 1). Lipaza F și

lipazele din pancreasul porcilor (PPL) au avut stereoselectivitate moderată și o activitate scăzută ($E = 13$ și respectiv 14 , vezi **tabelul 1**, liniile 7-8). Lipazele din *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor javanicus* și *Candida lipolytica* s-au dovedit a fi inactiv și neselective ($c < 11\%$, $E < 3$). După cum se aștepta, aproape toate enzimele au urmat predicția regulii lui Kazlauskas de (*R*) enantiomer preferință a lipazei. Doar lipaza F manifestă preferință enantiomerică opusă, formându-se enantiomerul (*S*)-**3b** (**Tabelul 1**, linia 7)

Se știe că natura solventului și a donorului de acil ar putea influența semnificativ, performanțele enzimei. În etapa următoare folosind enzima cea mai eficientă, L-AK, a fost testat efectul solventului pentru acilarea enzimatică a *rac*-**2b** cu acetat de vinil (**Tabel 2**). Cloroformul s-a dovedit a fi cel mai potrivit solvent pentru acilare. Acilarea enzimatică în cloroform, cu acetat de vinil a *rac*-**2b** decurge cu viteză destul de mare (după 9h s-au înregistrat conversii de aproape 49,8%) și cu o enantioselectivitate ridicată ($E \gg 200$) (**Tabelul 2**, linia 2)

Tabel 2. Influența naturii solventului asupra acilării mediată de L-AK, cu acetat de vinil a *rac*-**2b**

Nr.crt.	Solvent	C^a (%)	$ee_{(R)-3b}$ (%)	$ee_{(S)-2b}$ (%)	E
1	Didormetan	44,3	99,3	78,9	>200
2	Cloroform	49,8	99,3	98,5	>200
3	THF	41,9	97,8	70,5	194
4	t-BME	50,4	97,8	99,4	>200
5	Toluen	50,1	98,4	98,7	>200
6	Acetonitril	49,9	98,2	97,6	>200

^a după 9h.

Acilarea racemicului **2b** a fost realizată în continuare, în prezența celei mai eficiente enzime, L-AK, în cel mai eficient solvent, cloroform, cu alți trei donori de acil: propanoat de vinil, butanoatul de vinil și pivalatul de vinil. Cea mai mare selectivitate și reactivitate a enzimei L-AK s-au înregistrat la acilarea cu butanoatul de vinil ($E \gg 200$).

Ceilalți alcooli racemici *rac-2a*, *rac-2c*, *rac-2d* au fost acilați enzimatic în condițiile optime obținute la acilarea compusului model *rac-2b*: în prezența lipazei L-AK, în cloroform, cu butanoatul de vinil ca agent de acilare. Rezultate bune s-au obținut și în cazul acestor acilări (**Tabelul 3**).

Tabel 3. Influența naturii donorului de acil asupra acilării mediată de L-AK în cloroform a *rac-2a-d*

Nr.crt.	Agentul de acilare	Compus	Timp(h)	C(%)	ee ^c _{(R)-3} (%)	ee ^c _{(S)-2} (%)	E
1	Acetat de vinil ^a	2b	9	49,8	99,3	98,5	>200
2	Propanoat de vinil ^a	2b	10	44,9	99,5	81,1	>200
3	Butanoat de vinil ^a	2b	10	42	>99,8	72,6	>>200
4	Pivalat de vinil ^a	2b	50	1	>99,8	1	>200
5	Butanoat de vinil ^b	2a	24	50	>99,8	>99,8	>>200
6	Butanoat de vinil ^b	2b	27	50	>99,8	>99,8	>>200
7	Butanoat de vinil ^b	2c	28	50	>99,8	>99,8	>>200
8	Butanoat de vinil ^b	2d	30	50	>99,8	>99,8	>>200

^aRaport Substrat-L-AK 1:2

^bRaport Substrat-L-AK 1:1

Limita de detecție a analizelor HPLC chirale pentru enantiomerul minor a fost 0,1%

Alcooliza enzimatică la scară analitică a *rac-3a-d*

Este cunoscut că lipazele își conservă enantiopreferința în acilări și alcoolize¹⁸. O consecință a acestui lucru este posibilitatea obținerii formelor enantiomerice opuse prin acilarea enzimatică a amestecului racemic de alcooli și alcooliza enzimatică a amestecului racemic de esteri .

În continuare a fost investigată alcooliza enantiomer selectivă a esterilor racemici *rac-3a-d*. Pentru optimizarea alcoolizei enzimatice, butanoatul de 1-(10-Etil-10*H*-fenotiazin-3-il)etil *rac-3b* a fost ales cași compus model.

Un screening pe un număr mare de lipaze comerciale a fost realizat pentru a se determina enantioselectivitatea alcoolizei enzimatice a *rac-3b* la scară analitică. În procesul de optimizare a alcoolizei enzimatice s-au folosit diferiți agenți nucleofili: metanol, etanol, propanol, butanol. S-au utilizat 10 eq. din fiecare alcool sus-menționat, la un raport substrat-enzimă de 1:1(w/w). Experimentul a continuat în diferiți solvenți: derivați halogenați, hidrocarburi, eteri, hidrocarburi aromatice, cide și saturate, acetonițril și dioxan. Pentru prepararea formelor enantiomerice opuse ale produșilor optic activi (S)-**3b** și (R)-**2b**, cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul alcoolizei mediată de CaL-B în acetonițril sau hexan. Este important de notat că, stereoselectivitatea a fost ridicată pentru toți nucleofili testați (**Tabelul 4**, liniile 1-4) dar raportul enantiomeric a avut cele mai mari valori în cazul metanolizei enzimatice. Condițiilor optime stabilite pentru metanoliza enzimatică a *rac-3b* a fost verificată prin aplicarea a celeași proceduri de screening și la ceilalți esteri racemici *rac-3a-d*. Așa cum era de așteptat, metanoliza catalizată de CALB în acetonițril s-a dovedit a fi cea mai selectivă metodă.

Tabel 4. Alcooliza mediată de CaL-B a *rac-3a-d*, în acetonițril, cu diferiți alcooli

Intrare	Alcool	Compus	Timp(h)	C(%)	ee ^c _{(R)-2} (%)	ee ^c _{(S)-3} (%)	E
1	Metanol	3b	24	49,4	>99,8	97,6	>200
2	Etanol	3b	24	46,6	>99,8	87,3	>200
3	<i>n</i> -Propanol	3b	24	48,2	>99,8	92,9	>>200
4	<i>n</i> -Butanol	3b	24	43,1	>99,8	75,8	>200
5	Metanol	3a	30	50	>99,8	>98,8	>>200
6	Metanol	3b	32	50	>99,8	>98,8	>>200
7	Metanol	3c	31	50	>99,8	>98,8	>>200
8	Metanol	3d	32	50	>99,8	>98,8	>>200

4.1.2.2. Sinteza la scară preparativă a enantiomerilor (R) și (S) ai alcoolilor 2a-d și ai esterilor 3a-d chirali

Folosindu-se condițiile optime, obținute la acilarea enzimatică la scară analitică, a amestecurilor racemice de 1-(10-alkil-10H-fenotiazin-3-il)etanoli *rac-2a-d* și ale metanolizei enzimatică a butanoaților racemici *rac-3a-d*, a fost realizată sinteza la scară preparativă a celor doi enantiomeri (S) și (R)-**2,3a-d**. Pentru a se demonstra utilitatea acestei proceduri enzimatică, s-a utilizat 1g de substrat pentru fiecare rezoluție cinetică enzimatică.

datorită selectivității enantiomerice ridicate a biocatalizatorilor utilizați, (L-AK pentru acilare și Cal-B pentru metanoliză), sintezele ambilor enantiomeri (S) și (R) ai 1-(10-alkil-10H-fenotiazin-3-il)etanoliilor **2a-d** și ai butanoaților corespunzători ((R)- și (S)-**3a-d**) au fost realizate cu $ee > 99,9\%$ și $E >> 200$ pentru fiecare compus. Datele referitoare la randamentele și rotațiile optice ale compușilor formați în această etapă sunt prezentate în **Tabelul 5**.

Tabel 5. Valorile randamentelor și rotațiilor specifice ale produșilor rezoluțiilor cinetice enzimatică a *rac-2a-d* și *rac-3a-d*, la scară preparativă.

Acilare mediată de L-AK a <i>rac-2a-d</i>			Metanoliza mediată de CaL-B a <i>rac-3a-d</i>		
în doroform			în acetoni tril		
Produs	Randament ^a (%)	$[\alpha]_D^b$	Produs	Randament ^a (%)	$[\alpha]_D^b$
(S)- 2a	45	-52,9	(R)- 2a	49	+52,7
(S)- 2b	45	-94,4	(R)- 2b	49	+94,5
(S)- 2c	46	-112,4	(R)- 2c	49	+112,5
(S)- 2d	45	-95,0	(R)- 2d	49	+94,9
(R)- 3a	47	+172,2	(S)- 3a	49	-172,6
(R)- 3b	48	+242,3	(S)- 3b	49	-242,5
(R)- 3c	46	+266,0	(S)- 3c	49	-266,4
(R)- 3d	48	+249,6	(S)- 3d	49	-249,2

În timpul acilării enzimatică la scară preparativă, s-a observat formarea unor produși secundari. Ca o consecință a acestui lucru, randamentele produșilor izolați au scăzut cu 3-4% în comparație cu cele din metanolizele enzimatică. Instabilitatea heteroalcoolilor în prezența unor acizi minerali sau organici este deja cunoscută. Prezența acidului butiric, factor de generare a instabilității alcoolului, în mediul de reacție ar putea fi o explicație a formării acestor produși secundari. Acidul butiric se formează în mod inerent prin hidroliza enzimatică a esterului butiric. Această hidroliză este posibilă datorită prezenței unor cantități mici de apă în preparatul enzimatic. Evaporarea solventului după terminarea reacției s-a realizat la vid în scopul evitării încălzirii excesive a soluției deoarece etanolii enantiomerici puri prezintă instabilitate termică și poate să apară descompunerea lor. Stabilitatea alcoolilor crește prin adăugarea a 5-10 ml metanol în amestecul de reacție, iar îndepărtarea la vid a solventului s-a realizat la temperaturi scăzute ($t < 10^\circ$). Datorită naturii sale slab acide, silicagelul s-a dovedit a fi nefolositor la purificarea compușilor. Separarea și purificarea produșilor de reacție obținuți la scară preparativă a fost realizată pe coloane cu umplutură de oxid de aluminiu neutru prin cromatografie de vid.

4.1.3. Determinarea configurației absolute a enantiomerului (R)-2b sintetizat prin alcooliza enantiomer selectivă a rac-2b

Configurația absolută a compușilor alcoolici sintetizați a fost determinată prin difractometrie de raze X. Cristalografia de raze X a atribuit configurația absolută (R)-enantiomerului (+)-2b. În structura cristalină, s-au observat două molecule independente, în unitatea asimetrică, prezentând două chiralități diferite ale atomului de azot terțiar. Inelele heterociclice din amândouă moleculele, au configurație barcă iar compușii fenotiazinici sunt relați ca și enantiomeri conformaționali.

Configurația absolută a celorlați compuși a fost stabilită prin compararea semnului rotației optice cu (+)-(R)-2b.

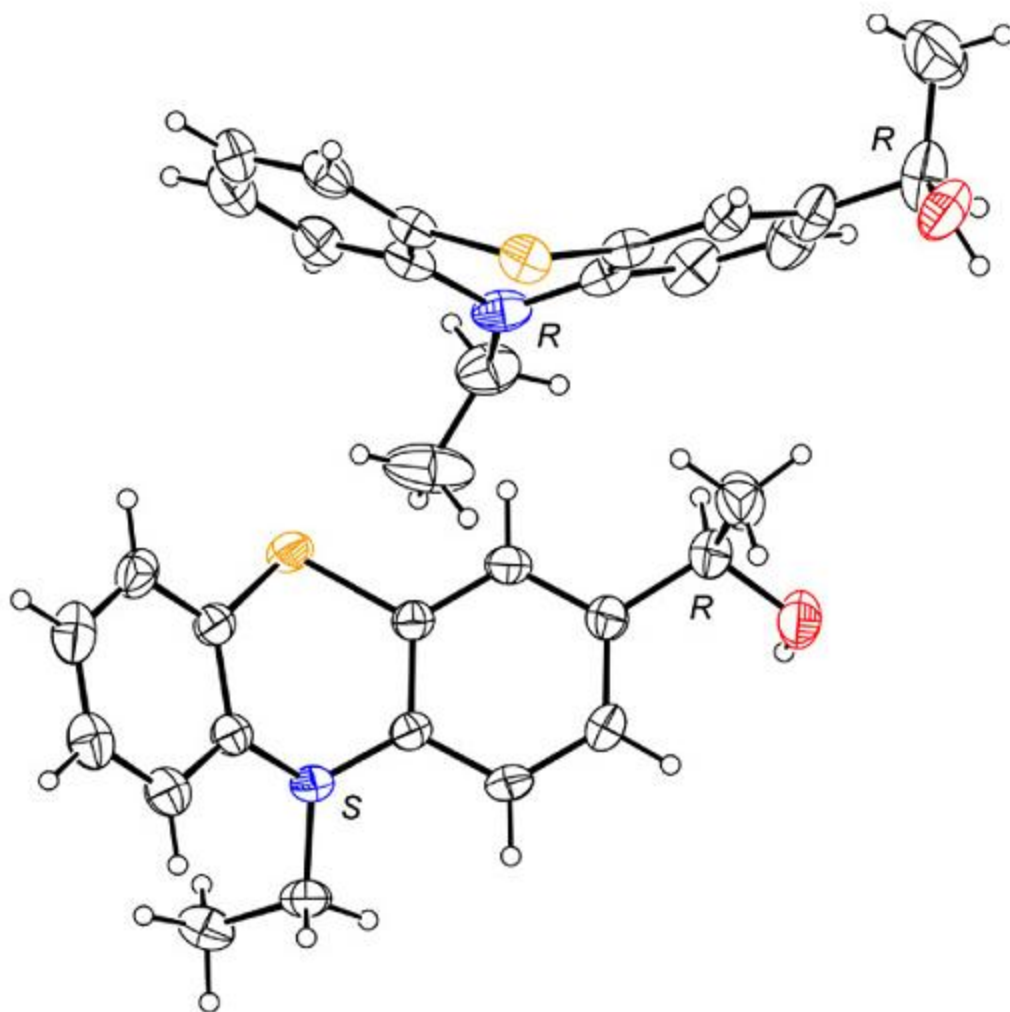


Figura 1. Configurația absolută a celor două molecule independente ale (R)-2b

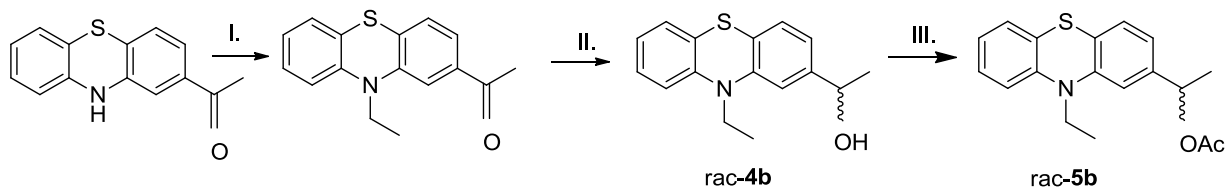
4.2. Sinteza enantiomerilor (*R*) și (*S*) ai 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)etanolului

și a acetatului lui cu ajutorul lipazelor din *Pseudomonas fluorescens*

4.2.1. Sinteza chimică

Pentru prepararea substratului alcoolic, *rac-4b*, 1-(10*H*-fenotiazin-2-il)etanona disponibilă comercial, a servit ca materie primă. Prin alchilarea ei cu iodură de etil, în prezența hidrurii de sodiu, urmată de reducerea chimică a grupării carbonil cu borohidruță de sodiu în metanol, s-a obținut alcoolul racemic, *rac-4b*.

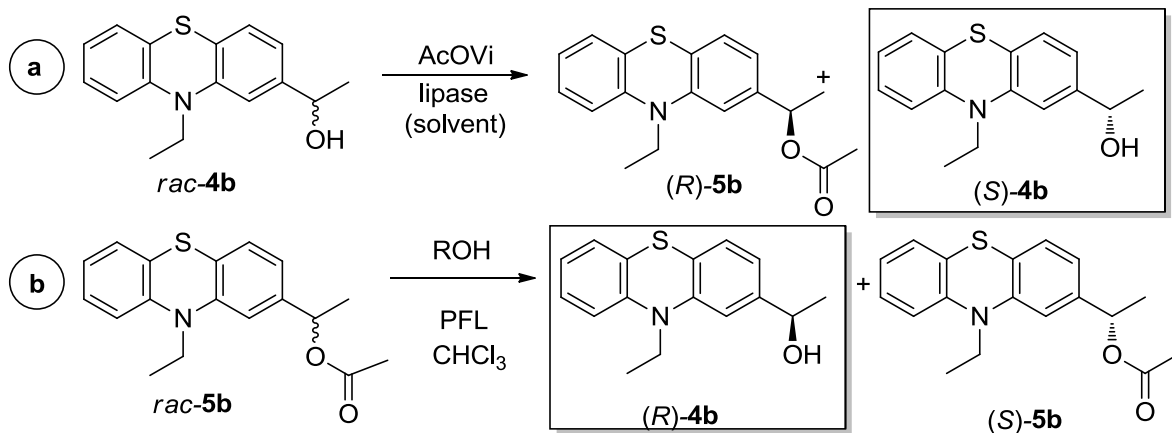
Acetilarea chimică a acestuia, cu dorură de acetil, în prezența catalitică a Et₃N /DMAP, a condus la acetatul racemic *rac-5b* (Schema 26).



Schema 5. (I) NaH, EtI, DMF; (II) NaBH₄/metanol; (III) AcCl, Et₃N, DMAP / CH₂Cl₂

4.2.2. Biotransformări enzimaticе

Amestecurile racemice ale alcoolului *rac-4b* precum și acetatului *rac-5b* au fost supuse unor transformări enzimaticе, catalizate de lipaze comerciale pentru obținerea formelor enantiomerice opuse (*R*) și (*S*) de heteroarii etanoli **4b** respectiv heteroarii acetatți **5b** (Schema 27).



Schema 27. Procesul de rezoluție cinetică enzimatică mediat de lipaze.

4.2.2.1. Transformări enzimaticе la scară analitică

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

O gamă largă de lipaze, disponibile comercial, au fost testate, în reacția de acilare, enantiomer selectivă a 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)- etanolului *rac-4b* cu acetat de vinil.

Majoritatea enzimelor testate au avut un comportament biocatalitic bun: selectivități enantiomerice și activități catalitice bune. Cele mai rapide și mai enantioselective reacții de acilare enzimatică au fost însă cele mediate de lipazele imobilizate B din *Candida antarctica* (CaL-B), comercializată sub numele de Novozym 435, precum și lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (PFL). S-au obținut rapoarte enantiomerice $E \gg 200$ la conversii de 50% (liniile 1-2 din Tabelul 6). Lipaza A din *Candida antarctica* (CaL-A) s-a dovedit a fi, de asemenea stereoselectivă și activă ($E = 198$ la conversii de 48%) în timp ce lipazele din *Candida cylindracea* (CCL) și *Thermomyces lanuginosa* (TLIM) au prezentat selectivitate bună dar au fost mai puțin active (conversii de 15-34% după 24 h). Reactivitate și selectivitate moderată s-a înregistrat în cazul reacțiilor catalizate de *Mucor javanicus* și de lipază din pancreasul porcine ($E = 30-70$, la conversii de 10-25%, Tabelul 6)

Tabel 6. Acilarea *rac-4b* cu diverse enzime în acetat de vinil, după 24h

Nr.	Enzimă	ee _{(R)-5b} (%)	ee _{(S)-4b} (%)	c (%)	<i>E</i>
1	CaL-B	>99	>99	50	>>200
2	PFL	>99	98,4	50	>>200
3	CaL-A	89	98,8	48	198
4	CcL	>99	99,5	15	>200
5	CrL	>99	99,0	25	>200
6	TLIM	>99	98,6	34	>200

A fost studiat în continuare efectul solventului asupra acilării enzimatică a *rac-4b* cu acetat de vinil în prezența PFL, cunoscându-se influența naturii solventului asupra stereoselectivității reacțiilor enzimatică. Cloroformul s-a dovedit a fi solventul optim pentru această acilare, obținându-se selectivitatea maximă ($E > 200$), la o conversie de 50% după 24h. Rezultatele acilării enzimatică la scară analitică a *rac-4b* cu acetat de vinil, catalizată de PFL, în diferiți solvenți, după 24 h, sunt prezentate în **Tabelul 7**.

Tabel 7. Influența naturii solventului la acilarea enzimatică a *rac-4b* mediată de lipaza PFL

Nr.crt.	Solvent	ee _{(R)-5b} (%)	ee _{(S)-4b} (%)	c (%)	<i>E</i>
1	Cloroform	>99	96.3	50	>200
2	<i>n</i> -Hexan	>99	77.1	56	44
3	Toluen	>99	72.7	58	36
4	Tetrahidrofur	>99	87.1	53	85
5	Didorometan	>99	45.9	68	14
6	Acetonitril	95.2	94	50	122

Alcooliza enzimatică a *rac-5b* la scară analitică

Aceeași strategie de optimizare a fost folosită pentru selectarea agentului nudeofil optim pentru alcooliza enantiomerselectivă a *rac-5b*, în doroform în prezența PFL, la scară analitică. Enantioselectivitatea reacțiilor de alcooliză a acetatului racemic *rac-5b* a fost testată cu 4 alcooli: metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol. PFL a s-a dovedit activă și selectivă la etanoliza esterului racemic *rac-5b*. În **Tabelul 8** sunt prezentate selectiv datele obținute la alcooliza enantioselectivă a *rac-5b*.

Tabel 8. Alcooliza enzimatică a *rac-5b* la scară analitică

Nr.crt.	Alcool	ee (<i>S</i>)- <i>5b</i> (%)	ee (<i>R</i>)- <i>4b</i> (%)	c(%)	<i>E</i>
1	Metanol	95	79	45	94
2	Etanol	99	99	50	»200
3	<i>n</i> -Propanol	91	85	48	58
4	<i>n</i> -Butanol	85	75	47	28

4.2.2.2. Creșterea performanțelor biocatalitice prin imobilizarea enzimei

Prepararea biocatalizatorului imobilizat

Pentru îmbunătățirea proprietăților catalitice ale PFL a fost studiată imobilizarea ei prin includere într-o matrice sol-gel. Prin polimerizarea unui monomer sau a unui amestec de monomeri în prezența soluției proteice, se creează o rețea în jurul catalizatorului care conferă enzimei stabilitate mărită, împiedicând inactivarea acesteia. Sol-gelurile formate prin hidroliza acidă sau bazică a precursorilor silanici (amestecuri de tetraalcoxi- și alchiltrialcoxilani) sunt niște suporturi stidoase inerte, cu porozitate, rezistență termică și mecanică mare și cu o hidrofobicitate variabilă, care poate fi modulată prin alegerea precursorilor silanici utilizați.

Induderea enzimelor în matrici sol-gel prezintă o serie de avantaje. O matrice hidrofobă capabilă să îmbunătățească activarea interfațială și activitatea enzimei induse, se poate obține prin utilizarea unor combinații de metiltrimetoxisilan [MeSi(OMe)₃, MTMS] cu tetrametoxisilan [Si(OMe)₄, TMOS].

Obținerea enzimei imobilizate s-a realizat după metoda Reetz¹⁹ modificată de Brem J. și colaboratorii²⁰ prin polimerizarea *in-situ* a silanilor în cataliză bazică, în condițiile optime determinate anterior. Un raport [TMOS]/[MTMS] de 1/5 și de apă/gel de 9/1 (molar) a fost considerat de aceștia ca optim, în cazul preparării silanilor în prezența ionului de fluorură, obținându-se preparate enzimatic active și selective la acilarea enzimatică a racemicului 3-hidroxi-3-fenilpropanoatul de etil²⁰.

Acilarea și etanoliza enzimatică a *rac-4b* respectiv *rac-5b* în prezența lipazei PFL inclusă în matrice sol-gel

Activitatea preparatului enzimatic obținut prin metoda descrisă anterior a fost investigată în reacția de acilare a *rac-4b* (0,1M) cu acetat de vinil, în doroform și în etanoliza *rac-5b* (0,1M) în același solvent. Rezultatele obținute indică o aplicabilitate excelentă a acestui sistem biocatalitic în prezența ambilor aditivi (Celita și zaharoză) în procesul de rezoluție enzimatică studiat ($E \gg 200$).

După cum am menționat anterior reutilizarea enzimei reprezintă un aspect important al preparatelor de enzime imobilizate. Pentru testarea capacității de recirculare a preparatului enzimatic creat, a fost repetată acilarea *rac-4b* (0,1M), cu acetat de vinil (0,2M) în doroform, de 4 ori cu același catalizator, la un conținut constant de proteină (1,5 mg/ml). În fiecare ciclu de reacție procesul a fost perfectat până la atingerea conversiei de 50%. Între cicluri, catalizatorul a fost spălat cu cloroform anhidru și apoi utilizat ca atare, fără uscare prealabilă. Rezultatele obținute (excesul enantiomeric și raportul enantiomeric E) sunt prezentate în **Tabelul 9**.

Tabel 9. Reutilizarea preparatului imobilizat de PFL (1,5 mg proteină/mL) în *O*-acilarea *rac*-**4b** (0.1 M) cu acetat de vinil (0,2M) în dorofom (1 mL) la temperatura camerei

Ciduri de utilizare a PFL imobilizată în sol-gel					
	Liberă	1	2	3	4
Timp (h)	24	20	20	22	22
C(%)	50	49	48	50	49
ee^(S)-4b	96	97	97	96	94
ee^(R)-5b	99	96	96	95	93
E	>>200	>200	>200	183	115

Activitatea enzimatică scade după 3 ciduri ușor, cu 5 % și semnificativ (10%) după 4 ciduri de utilizare. De asemenea s-a constatat că reutilizarea catalizatorului nu influențează în mod semnificativ enantioselectivitatea reacției enzimice, obținându-se compușii (*S*)-**4b** și (*R*)-**5b** cu o puritate enantiomerică înaltă (ee > 95%) chiar și în al 4-lea cidu de reutilizare.

4.2.2.3. Biotransformări la scară preparativă

Sinteza la scară preparativă a ambilor enantiomeri ai 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)etanolului și a acetatului său a avut la bază reacțiile enzimice la scară analitică prezentate în paragraful anterior. Mai întâi s-a realizat acilarea enzimatică enantioselectivă, în prezența lipazei din *Pseudomonas fluorescens*, a 500 mg substrat alcoolic racemic, *rac*-**4b**, în dorofom, obținându-se acetatul (*R*)-**5b** și alcoolul (*S*)-**4b** cu excese enantiomerice ridicate. Fomele enantiomerice opuse, (*R*)-**4b** și (*S*)-**5b**, au fost obținute prin etanoliza a 500 mg substrat acetat

racemic, *rac-5b*, în doriform, în prezența aceleiași enzime . Desfășurarea reacțiilor a fost monitorizată pe TLC și HPLC și oprită la o conversie de aproximativ 50% prin îndepărtarea enzimei prin filtrare. Toate diluțiile, raportul substrat-biocatalizator și condițiile de reacție au fost aceleași ca și în reacțiile la scară analitică.

Valorile randamentelor și exceselor enantiomerice ale enantiomerilor (*S*)-**4,5b** și (*R*)-**4,5b** sunt prezentate în **Tabelul 10**.

Tabel 10. Rezoluția enzimatică *rac-4,5b* cu PFL, în chloroform la scară preparativă

Nr.crt	Substrat	ee (%)		η^* (%)	<i>E</i>	ee (%)		η^* (%)	<i>E</i>
		(<i>R</i>)- 5b	(<i>S</i>)- 4b			(<i>R</i>)- 4b	(<i>S</i>)- 5b		
1	<i>rac-4b</i>	99	96	47	>>200				
2	<i>rac-5b</i>					99	99	48	>>200

Configurația absolută a compușilor enantiopuri a fost atribuită utilizându-se datele publicate pentru enantiomerii optici puri ai 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)etanolului⁹.

5. Concluzii

1. A fost realizată o procedură enzimatică eficientă, de sinteză a unor compuși enantiomeric puri de N-alcil-fenotiazin-3-il-etanoli și a butanoaților lor.

S-au obținut 4 (*R*)-butanoați (*R*)-**3a-d** și 4 (*S*)-alcooli (*S*)-**2a-d** cu randamente și enantiopurități ridicate ($ee > 99,9\%$ și $\eta > 45\%$) prin acilarea mediată de lipaza L-AK a alcoolilor racemici *rac*-**2a-d** iar metanoliza catalizată enzimatic de Ca L-B a racemicului de butanoați *rac*-**3a-d** a condus la formele opuse enantiomerice ale compușilor țintă (*R*)-**2a-d** și (*S*)-**3a-d**.

Configurația absolută a fost determinată prin difractometrie de raze X a compusului optic activ (*R*)-**2b**.

2. Enantiomerii (*R*) și (*S*) ai 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-2-il)etanolului **4b** și acetatului său **5b** au fost sintetizați printr-o metodă chemoenzimatică optimizată de rezoluție cinetică mediată de PFL a racemicilor alcoolici *rac*-**4b** și esterici *rac*-**5b**. Acilarea enzimatică a etanolului racemic **4b** a condus la obținerea enantiomerului (*R*) al acetatului [(*R*)-**5b**] și enantiomerului (*S*) al alcoolului, cu excese enantiomerice ridicate ($ee > 96\%$) iar în etanoliza acetatului racemic *rac*-**5b** s-au obținut formele enantiomerice opuse [(*R*)-**4b** și (*S*)-**5b**].

Au fost îmbunătățite performanțele catalitice ale lipazei PFL prin includerea într-o matrice sol-gel. Au fost investigate activitatea catalitică, enantioselectivitatea și reutilizarea preparatului enzimatic în acilarea și etanoliza enzimatică a *rac*-**4b** și *rac*-**5b**. Biocatalizatorul imobilizat s-a dovedit a fi eficient în ambele procese enzimatic studiate.

3. Preparatul enzimatic își păstrează activitatea enzimatică în 3 cicluri catalitice iar enantioselectivitatea reacțiilor nu este influențată de reutilizarea lui. Compușii (*S*)-**4b** și (*R*)-**5b** au fost obținuți cu o puritate enantiomerică ridicată ($ee > 95\%$) chiar și în al 4-lea ciclu de reutilizare.

Referințe bibliografice

- ¹(a) Hull, K.G.; Visnic, M.; Tautz, W.; Sheffron, A., *Tetrahedron*, **1997**, 53, 12405–2414; (b) Truppo, M.D. Pollard, D.; Devine, P. *Org. Lett.*, **2006**, 9, 335–338; (c) De Martino, G.; La Regina, G.; Di Pasquali, A.; Ragno, R.; Bergamini, A.; Caprini, C.; Sinistro, A.; Maga, G.; Crespan, E.; Artico, M.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4378–4388; (d) Challenger, C.A., *Chiral Drugs*; John Wiley & Sons: New York **2001**; (e) Tanis, S.P.; Evans, B.R.; Nie man, J.A.; Parker, T.T.; Taylor, W.D.; Heasley, S.E.; Herrington, P.M.; Perrault, W.R.; Hohler, R.A.; DoAK, L.A.; Hester, M.R.; Seest, E.P., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 21–54.
- ²Silverman, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Elsevier Academic Press: Burlington, MA, **2004**
- ³Turner, N.J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 114–119
- ⁴Ghanem, A.; Aboul-Enenin, H.Y., *Chirality*, **2005**, 17, 1–15
- ⁵Lin, G.; Midha, K.K.; Hawes, E.M. *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28, 215–219; El-Said, M.K., *Pharmazie* **1981**, 36, 678679; Dominguez, J.N.; Lopez, S.; Charis, J.; Iaruso, L.; Lobo, G.; Semnow, A.; Olson, J.E.; Rosenthal, P.J., *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2726–2732; Raval, J.P.; Desai, K.K., *ARKIVOC*, **2005**, 21–28; Motohashi, N.; Kawase, M.; Saito, S.; Sakagami, H., *Curr. Drug Targets*, **2000**, 1, 237–246; Mosnaim, A.D. Ranade, V.V.; Wolf, M.E.; Puente, J.; Valenzuela, A.M., *Am. J. Ther.*, **2006**, 13, 261273; Trivedi, A.R.; Siddiqui, A.B.; Shah, V.H., *ARKIVOC*, **2008**, 210–217; Aszalos, A., *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2003, 50, 43–53; Kurihara, T.; Motohashi, N.; Sakagami, H.H.; Molnar, J. *Anticancer Res*, **1999**, 19, 4081–4083
- ⁶Paizs, C.; Tahinen, P.; Tosa, M.; Majdik, C.; Irimie, F.D.; Kanyeva, L.T.; *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10533–10540
- ⁷Brem, J.; Tosa, M.I.; Paizs, C.; Vass, E.; Irimie, F.D., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 365–373
- ⁸Irimie, F.D.; Tosa, M.; Paizs, C.; Majdik, C.; Moldovan, P.; Silberg, I.A., *Roumanian Biotechnological Letters*, **2000**, 5, 55–62. Tosa, M.; Paizs, C.; Majdik, C.; Misca, R.; Irimie, F.D.; *Roumanian Biotechnological Letters*, **2001**, 6, 147–54; Tosa, M.; Paizs, C.; Majdik, C.; Novak, L.; Kolonits, P.; Irimie, F.D.; Poppe, L.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 211–221

⁹Stepanenko, V.; De Jesus, M.; Correa, W.; Guzman, I.; Va zquez, C.; Ortiz, L.; Ortiz-Marciales, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2738–2745.

¹⁰Brem, J.; Tosa, M.I.; Paisz, C.; Munceanu, A.; Calogovic, D.M.; Irimie, F.D., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**; *21*, 1993–98

¹¹Vänttinen, E.; Kanerva, L.T., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1994**, *1*, 3459-3463; Långvik, O.; Saloranta, T.; Kirilin, A.; Liljeblad, A.; Mäki-Arvela, P.; Kanerva, L.T.; Murzin, D.Y.; Leino, R. *ChemCat Chem* **2010**, *2*, 1615-1621.

¹²Devi, B.L.A.P.; Guo, Z.; Xu, X. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2009**, *86*, 637-64

¹³Zarcu, C.; Corîdi, L.; Croitoru, R.; Ursoiu, A.; Peter, F., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 79-86; Tomin, A.; Weiser, D.; Hellner, G.; Bata, Zs.; Coridi, L.; Péter, F.; Koczka, B. Poppe, L. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 52-58.

¹⁴Santos, J.C.; Paula, A.V.; Nunes, G.F.M.; de Castro, H.F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52-53*, 49-57.

¹⁵Gorokhova, I.V.; Ivanov, A.E.; Zubov, V.P. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2002**, *28*, 38-43; Mendes, A.A.; Giordano, R.C.; de L.C. Giordano, R.; de Castro, H.F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 109-115; Gorokhova, I.V.; Ivanov, A.E.; Zubov, V.P. *Russ. Chem. B, Int. Ed.* **2001**, *50*, 152-154.

¹⁶Tosa, M.; Paisz, C.; Moldovan, P.; Novak, L.; Kolonits, P.; Szabo, E.; Poppe, L.; Irimie, F.D., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, *17*, 241-248;

¹⁷Zhu, Y.; Fow, K.L.; Chuah, G.K.; Jaenicke, S., *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 541-547; Costa, L.; Coehlo, A.; Lemos, F.; Ribeiro, F.R.; Cabral, A. *J. Appl. Catal.*, **2009**, *354*, 33-37; Nishiguchi, T., Kamio, I., *C.J. Chem. Soc., Perkin Trans*, **1989**, 707-710

¹⁸Bornscheuar, U.T.; Kazlauskas, R.J.; *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2nd Ed., Wiley VCH, **2006**, 61-

¹⁹Reetz, M.T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 301-303; Reetz, M.T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 527-34; Reetz, M.T.; Tielmann, P.; Wiesenhöfer, W.; Könen, W.; Zonta, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 717-728.

²⁰ Brem, J.; Turcu, M.C.; Paizs, C.; Lundell, K.; Tosa, M.I. Irimie, F.D.; Kanerva, L. *Process Biochemistry* **2012**, *47*, 119–126