



Universitatea Babeş-Bolyai
Cluj-Napoca



Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Școala Doctorală Chimie

**Noi procese biocatalitice pentru sinteza amino-
alcoolor și a α - și β -aminoacizilor optic puri**

Rezumatul tezei de doctorat

Student doctorand: Botond NAGY

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Monica Ioana TOȘA

Cluj-Napoca

2017



Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca



Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Școala Doctorală Chimie

Noi procese biocatalitice pentru sinteza amino- alcoolor și a α - și β -aminoacizilor optic puri

Rezumatul tezei de doctorat

Student doctorand: Botond NAGY

Comisie:

Președinte:

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Monica Ioana TOȘA – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Referenți: Prof. Dr. Ing. Francisc PÉTER, Universitatea Politehnică Timișoara, Timișoara

Prof. Dr. Eng. Mircea DĂRĂBANȚU, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Prof. Dr. Eng. Adela PINTEA, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca

Cluj-Napoca

2017

Cuprins

1. Introducere generală	4
2. PART I. Sinteza bufuralolului	5
2.1. Importanța amino alcoolilor vicinali	5
2.1.1. Bufuralolul.....	5
2.2. Obiectivele studiului.....	6
2.3. Sinteza (<i>R</i>)- și (<i>S</i>)-bufuralolului prin biotransformări catalizate de drojdie	6
2.4. Rezoluția cinetică a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)-etanolului mediată de lipaze	7
2.5. Concluzii	8
3. PART II. Sinteza α -și β -aminoacizilor	9
3.1. Importanța α -și β -aminoacizilor	9
3.2. Sinteza α -aminoacizilor	9
3.2.1. Sinteza α -aminoacizilor mediată de amoniac liaze.....	9
3.2.2. Sisteme microfluidice (Magne-Chip)	9
3.2.3. Obiectivele studiului.....	10
3.2.4. Sinteza chimică a acizilor 2-amino-3-(hetero)aril propionici racemici și a acizilor (<i>E</i>)-acrilici corespunzători	10
3.2.5. Biotransformări în Magne-Chip	10
3.2.6. Concluzii.....	12
3.3. Sinteza β -amino acizilor	12
3.3.1. Introducere.....	12
3.3.2. Obiectivul studiului	13
3.3.3. Sinteza chimică a esterilor etilici ai acizilor 3-amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propionici....	13
3.3.4. Rezoluția cinetică enzimatică prin hidroliză enantioselectivă	13
3.3.5. Biotransformări la scară preparativă.....	14
3.3.6. Concluzii.....	15
4. Concluzii generale	16
6. Mulțumiri.....	17
7. Publicații științifice.....	18
8. Referințe	20

1. Introducere generală

În zilele de azi compușii organici cu azot și derivații acestora sunt din ce în ce mai răspândiți în chimia farmaceutică, în industria agro-chimică și agroalimentară, respectiv în electronică și optică. Pe de altă parte, ei apar în structura multor macromolecule active din punct de vedere biologic. Aminoalcoolii sunt utilizați drept auxiliari chirali în sinteză *in-vitro* a biomoleculelor, iar aminoacizii, atât sub formă protejată cât și neprotejată, joacă un rol important în proiectarea și dezvoltarea peptidelor artificiale.

De asemenea, cercetătorii din domeniul chimiei coordinative și organometalice depun un efort enorm în vederea dezvoltării unor liganzi organici polifuncționali care conțin în structura lor azot.[1]

Au fost dezvoltate în vederea obținerii compușilor enantiopuri o gamă largă de metode chimice și biochimice. Biocataliza oferă numeroase avantaje față de reacții catalitice convenționale, cum ar fi: stereo-, regio-, și chemoselectivitate ridicată, condiții de reacții blânde, respectiv posibilitatea transformării compușilor inerti la metodele chimice tradiționale.

În procesele chemo-enzimatice biocatalizatorii pot fi folosiți atât ca celule întregi, cât și ca enzime izolate, purificate. În cazul celulelor întregi, biocatalizatorul funcționează în mediul lui natural, astfel stabilitatea este mai ridicată, și în plus, dacă ne gândim la enzimele cofactor-dependente, regenerarea cofactorului este asigurată de celula proprie. Acest sistem are însă dezavantajul de a oferi o selectivitate scăzută și un control dificil al procesului datorită prezenței altor enzime în celulă. Spre deosebire de celulele întregi enzimele izolate sunt, de regulă, înalt selective dar și mai sensibile la condițiile de reacție și nu au activitate suficientă pentru a asigura o productivitate ridicată.

Modificarea la nivel de genă a enzimelor native prin tehnici de mutagenză punctuală sau evoluție direcționată oferă posibilități multiple pentru obținerea de enzime adaptate bioprosesării substraturilor nenaturale. Imobilizarea este o altă metodă frecvent utilizată pentru stabilizarea enzimelor, pe lângă acestea. Biocatalizatorii astfel obținuți au stabilitate ridicată, activitate mai consistentă și reciclabilitate, ceea ce contribuie semnificativ la scăderea costului unui proces tehnologic.

Teza este structurată în două părți.

Prima parte a tezei prezintă două procese chemo-enzimatice pentru sinteza totală a ambilor enantiomeri ai bufuralolului. Primul proces se bazează pe capacitatea celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* de a transforma α -hidroxi și α -acetoxi cetonele cu stereopreferință opusă, producând diolii vicinali enantiopuri, intermediari în sinteza bufuralolului. Al doilea proces implică *O*-acilarea enantioselectivă a 7-etilbenzofuran-bromo etanolului mediată de lipaze. Enantiomerul acilat, respectiv enantiomerul netransformat pot fi folosiți în continuare pentru sinteza enantiomerilor corespunzător ai bufuralolului.

Partea a doua a tezei vizează dezvoltarea unor metode enzimatiche de obținere a α - și β -aminoacizilor naturali și nenaturali, optic activi. Pentru transformarea L-fenilalaninei și a altor cinci α -aminoacizi nenaturali a fost conceput un sistem microfluidic continuu, care conține patru celule de reacție umplute cu fenilalanină amoniac-liaza din *Petroselinum crispum* (PcPAL) imobilizată pe nanoparticule magnetice (MNP).

A fost de asemenea dezvoltată o metodă chemo-enzimatică pentru obținerea enantioselectivă a unor β -aminoacizi fenilfuranici prin hidroliza enantioselectivă a β -aminoesterilor sub formă de clorhidrat catalizată de lipaze imobilizate covalent.

2. PART I. Sinteza bufuralolului

2.1. Importanța amino alcoolilor vicinali

Numeroși 1,2-aminoalcooli (amino alcooli vicinali sau β -amino alcooli) enantiopuri posedă importante activități biologice, fiind extrem de importanți în procesele chimice, biochimice și biologice de obținere a macromoleculilor bioactive, respectiv pentru reproducerea moleculelor naturale care nu sunt accesibile în cantități necesare [2].

O gamă largă de β -amino alcooli alifatici și aromatici se obțin prin diferite metode de sintetiză asimetrică, cum ar fi: modificarea grupării funcționale a aminoacizilor [3], introducerea restului de amino alcool pe un schelet de carbon preexistent [4], sau cuplarea a două molecule [5]. Pe lângă procesele organocatalitice, popularitatea proceselor biocatalitice este în creștere continuă deoarece biocataliza oferă o alternativă eficientă și durabilă pentru obținerea moleculelor de interes. De exemplu, lipazele [6] și transaminazele [7] au fost folosite cu succes pentru sinteza asimetrică a 2-amino-1-arietanolilor.

2.1.1. Bufuralolul

Bufuralolul este un β -aminoalcool cu schelet benzofuranic descoperit de Fothergill și dezvoltat de La Roche [8]. Bufuralolul este un antagonist al receptorilor β -adrenergici, adică un β -blocant puternic, neselectiv. Receptorii β -adrenergici se găsesc în număr mare în inimă, vase, rinichi, plămâni și sistemul nervos central. Antagonizând efectele fiziologice ale catecolaminelor, β -blocantele reduc activitatea inimii, adică au efect vasodilatator.[9] Bufuralolul a fost folosit cu succes în tratarea hipertensiunii arteriale [10] și prezintă efect inhibitor asupra testosteron 6 β -hidroxilazei în membranele bacteriene.[11]

Metabolismul bufuralolului este destul de complex și presupune procese de oxidare citocrom P-450 dependente din microzomii ficatului uman.[12] Metaboliții alcoolici și cetonicii rezultați în urma proceselor de oxidare posedă, de asemenea, activitate β -blocantă.[13] Prin urmare, bufuralolul se

utilizează pentru studii de polimorfism ale acestor complexe enzimatică.[14] Cu toate că enantiomerul (*S*) al bufuralolului are o activitate β -blocantă mai semnificativă, (*R*)-bufuralolul este și el important, fiind utilizat ca marker pentru activitate hepatică a enzimei CYP2D6 [15], motiv pentru care obținerea ambii enantiomeri optic puri ai bufuralolului este de mare interes.

2.2. Obiectivele studiului

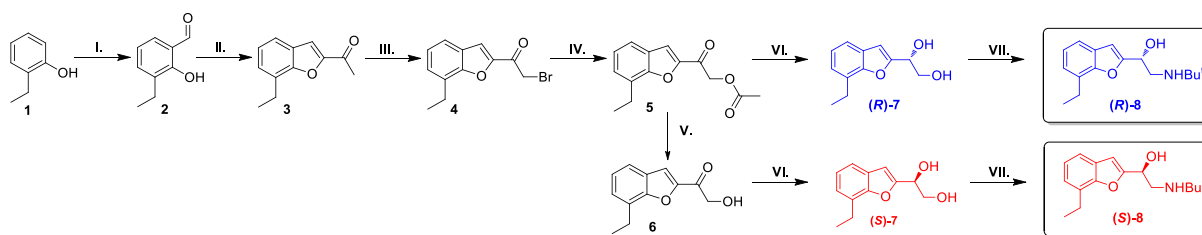
Studiul a vizat sinteza asimetrică a ambilor enantiomeri ai bufuralolului prin două metode biocatalitice: prin reducerea enantiotop selectivă a acetatului de 1-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-oxoetil **5** și a 1-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-hidroxi-etanonei **6** mediată de drojdia alimentară (*Saccharomyces cerevisiae*) cu obținerea (*R*)- și (*S*)-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etan-1,2-diolului care se vor transforma ulterior în (*R*)- sau (*S*)-bufuralol, respectiv prin rezoluția cinetică a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanolului **9** catalizată de lipaze. Intermediarii astfel obținuți pot fi transformați ulterior în enantiomerul corespunzător a bufuralolului.

2.3. Sinteza (*R*)- și (*S*)-bufuralolului prin biotransformări catalizate de drojdie

Utilitatea drojdiei este cunoscută de mii de ani. Celulele de drojdie sunt folosite în procese de fermentare, pentru producerea unor alimente cum ar fi pâinea, berea sau vinul. Ulterior ele s-au răspândit și în procese biocatalitice deoarece au un cost redus, necesită condiții de reacție blânde, respectiv asigură stabilitatea enzimelor. Oxidoreductazele și hidrolazele din drojdie oferă selectivitate ridicată și pot transforma o gamă largă de substraturi.

S-a demonstrat experimental că celulele de *Saccharomyces cerevisiae* transformă α -hidroxi cetonele respectiv α -acetoxi-metil cetonele în dioli cu stereopreferință opusă.[16] Reacția α -hidroxi cetonelelor apelează la oxidoreductaze, în timp ce α -acetoxi-metil cetonele utilizează suplimentar hidrolazele de asemenea prezente în celule de drojdie pentru o hidroliză enzimatică.

Sinteza substraturilor **5** și **6** s-a realizat prin procese chimice convenționale (Schema 1). 2-Etilfenolul **1** a fost *o*-formilat cu paraformaldehidă în prezența clorurii de magneziu și trietilamină. 3-Etil-salicilaldehida **2** obținută a fost transformată în 7-etil-benzofuran-2-il-etanonă prin condensare cu cloroacetona și apoi bromurată în poziția α cu tribromura de piridiniu. În continuare, α -acetoxi-metil cetona **5** a fost sintetizată pornind de la bromo-cetona **4**, iar prin etanoliza enzimatică a compusului **5** s-a obținut hidroxi-metil cetona **6** dorită.



I. Paraformaldehide, TEA, MgCl₂, CH₃CN, reflux; II. Chloroacetone, K₂SO₄, CH₃CN, reflux; III. PyrBr₃, CH₃COOH, reflux; IV. CH₃COONa, 18-C-6/1,4-dioxane, reflux; V. Cal-B/ EtOH, 300 rpm, r.t; VI. Baker's yeast, water/methanol, r.t; VII. a) *p*-TsCl, Bu₂SnO, TEA, CH₂Cl₂, r.t; b) ^tBuNH₂, ethanol, reflux

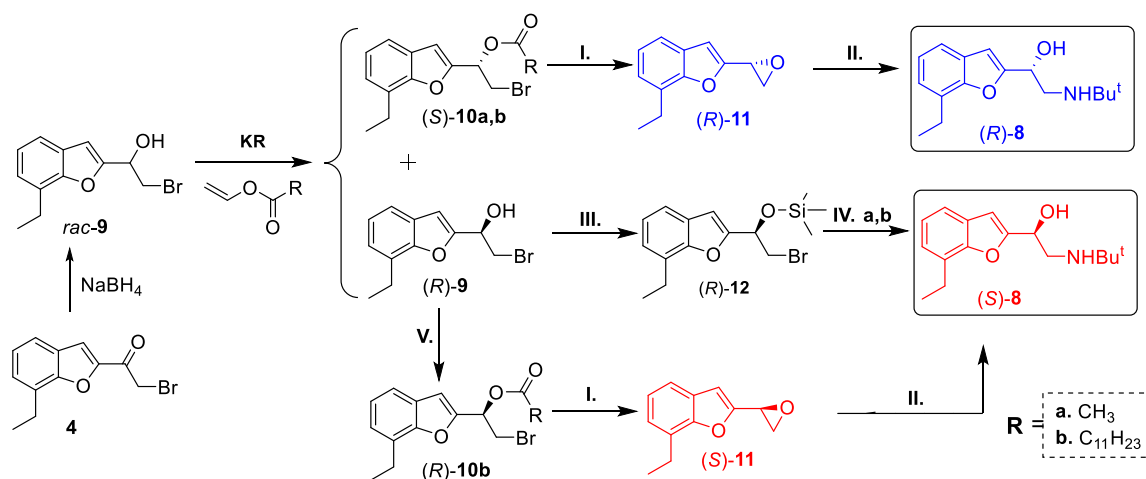
Schema 1. Sinteza chemoenzimatică a enantiomerilor bufuralolului prin biotransformări catalizate de *Saccharomyces cerevisiae*

Enantiotop selectivitatea celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* menționată mai sus s-a dovedit valabilă și pentru compușii **5** și **6**. Reacțiile enzimatice au fost realizate atât în condiții fermentative cât și nefermentative. Luând în considerare faptul că aditivii introduși în mediul de reacție pot să îmbunătățească performanțele enzimei, experimentele au fost efectuate în prezența unor aditivi cu efect benefic potențial asupra activității enzimelor țintă. Progresul reacțiilor a fost monitorizat prin cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) pe coloane chirale, utilizând metoda de separare dezvoltată pentru 1,2-diolul racemic *rac*-**7** (obținut prin reducerea compusului **6** cu borohidruură de sodiu).

(*R*)- și (*S*)-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etan-1,2-diol ((*R*)- and (*S*)-**7**) izolați în urma reacțiilor enzimatice au fost transformați în enantiomerul corespunzător al bufuralolului prin tosilarie regioselectivă cu clorura acidului *para*-toluensulfonic (clorura de tosil) în prezența de oxid de dibutil staniu (IV) [17], urmată de înlocuirea grupării tosil cu *terț*-butil amină (Schema 1).

2.4. Rezoluția cinetică a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)-etanolului mediată de lipaze

În a doua abordare stereoselectivitatea a fost introdusă prin reacția de *O*-acilare enantioselectivă a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanolului racemic *rac*-**9** catalizată de lipaze (Schema 2). Compusul *rac*-**9** a fost obținut la rândul lui prin reducerea bromo cetonei **4** cu borohidruură de sodiu.



KR. Enzyme, acyl donor, r.t., 800 rpm; I. LiOH, EtOH, r.t.; II. *tert*-Butylamine, reflux; III. DMCTMS, Et₂O, r.t.; IV. a) *tert*-Butylamine, MeOH, r.t; b) HF, MeOH; V. Vinyl dodecanoate, CaL-A, DIPE

Schema 2. Sinteza (*R*)- și (*S*)-bufuralolului prin rezoluția cinetică a bromoetanolului *rac*-9 catalizată de lipaze

Au fost testate la scară analitică în reacții de *O*-acilare efectuate în diferiți solvenți organici folosind acetatul- respectiv dodecanoatul de vinil drept agenți de acilare mai multe lipaze comerciale. Lipaza din *Candida antarctica* (Cal-B) s-a dovedit de a fi cel mai potrivit catalizator pentru reacțiile investigate. În urma reacțiilor enzimatiche, atât enantiomerul de substrat netransformat ((*R*)-9) cât și enantiomerii produșilor obținuți ((*S*)-10a,b) au fost izolați cu randamente excelente și folosiți în continuare pentru sinteza bufuralolului. În vederea evitării reacțiilor secundare nedorite, respectiv racemizarea enantiomerilor, au fost aplicate pentru sinteza (*R*)- și (*S*)- bufuralolului două metode diferite (Schema 2).

2.5. Concluzii

Au fost dezvoltate două metode diferite pentru sinteza (*S*)- și (*R*)-2-(*tert*-butilamino)-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanolului ((*S*)- și (*R*)-bufuralol), care implică drept etapă biocatalitică fie biotransformări catalizate de celule de *Saccharomyces cerevisiae*, fie reacții de *O*-acilare mediate de lipaze. Celulele de drojdie, respectiv lipaza Cal-B, s-au dovedit biocatalizator eficienți cu ajutorul cărora s-au obținut ambii enantiomeri ai bufuralolului cu enantiopuritate (*ee* 98%) și randamente globale (53%) ridicate.

3. PARTEA II. Sinteza α -și β -aminoacizilor

3.1. Importanța α -și β -aminoacizilor

α -Aminoacizii naturali și nenaturali sunt folosiți în industria alimentară, agrochimică și farmaceutică. Drept exemplu putem aminti aspartamul, un îndulcitor artificial cu structură dipeptidică format din acid L-aspartic și L-fenilalanină.[18] Aminoacizii sunt de asemenea prezenți în structura antibioticelor de semisinteză ampicilina sau amoxicilina [19] sau în Atazanavir, un inhibitor al proteazelor HIV.[20]

Spre deosebire de α -aminoacizi, β -aminoacizii sunt metaboliți secundari.[21] Datorită faptului că β -aminoacizii sunt prezenți în structura peptidelor, glicopeptidelor, alcaloizilor sau terpenelor, ei sunt utilizați intensiv în chimia farmaceutică pentru dezvoltarea antibioticelor peptidice.[22]

3.2. Sinteza α -aminoacizilor

3.2.1. Sinteza α -aminoacizilor mediată de amoniac liaze

Metodele biocatalitice tradiționale folosite pentru producerea aminoacizilor și aminelor chirali, se bazează, în primul rând, pe utilizarea enzimelor din clasa hidrolazelor cum ar fi lipaze, acilaze sau hidantoinaze.[23] Ulterior însă au fost dezvoltate metode alternative noi care vizează deracemizarea aminelor racemice cu amino-oxidaze respectiv *trans*-aminaze.[24]

Amoniac-liazele reprezintă o țintă atractivă pentru sinteza asimetrică a α -aminoacizilor și aminelor. În principiu, reacțiile mediate de amoniac liaze pot fi folosite pentru sinteza stereoselectivă a aminoacizilor prin două căi alternative. Prima posibilitate este utilizarea reacției reversibile, stereoconstructive a amoniac liazelor. Astfel, adiția amoniacului la precursori nesaturați, achirali poate fi folosită la obținerea L-amino acizilor. Pe de altă parte, natura stereodistructivă a reacțiilor mediate de amoniac liaze poate fi exploatată în vederea obținerii enantiomerilor D prin distrugerea enantiomer selectivă a enantiomerilor L din racemații corespunzători. PcPAL are o specificitate largă de substrat, fapt care face ca aceasta să fie un biocatalizator util, capabil să medieze în mod enantiospecific transformarea unor analogi nenaturali ai fenilalaninei.[25], [26]

3.2.2. Sisteme microfluidice (Magne-Chip)

Microfluidica este o tehnologie care manipulează cantități mici de lichide (de ordinul microlitrilor) utilizând dispozitive cu dimensiuni de zeci de micrometri. Combinarea acestor sisteme microfluidice cu enzimele imobilizate oferă posibilități noi atât în diagnosticare cât și în aplicații sintetice și analitice. Magne-Chip este o platformă microfluidică care cuprinde actuatorii (ex. pompe, valve, termostat) și senzorii necesari (ex. senzor de presiune), o unitatea de control și un chip microfluidic care conține un număr de camere de reacție de ordinul microlitrilor. Camerele sunt

adresabile selectiv de un câmp magnetic direcționat care face posibilă manipularea și acumularea de nanoparticule magnetice (MNP) în camera dorită.

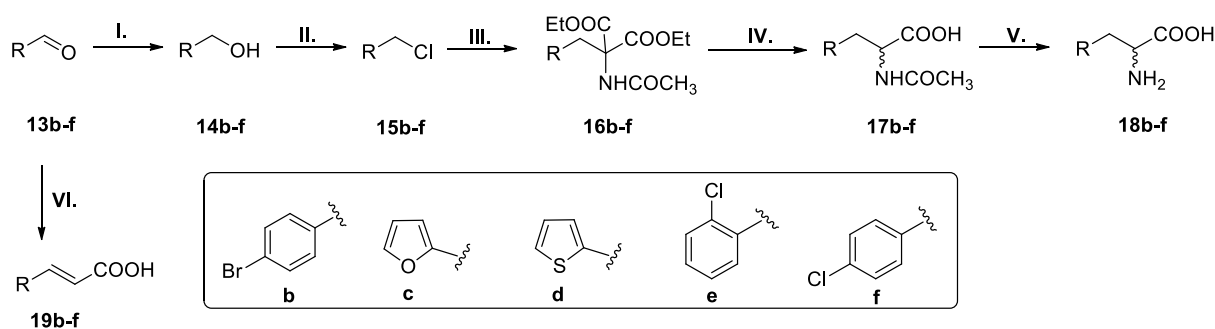
3.2.3. Obiectivele studiului

Obiectivul principal al studiului l-a reprezentat determinarea proprietăților și parametrilor de setare a unui sistem Magne-Chip în biotransformări cu enzima PcPAL, folosind substratul natural L-fenilalanina și cinci aminoacizi nenaturali.

3.2.4. Sinteza chimică a acizilor 2-amino-3-(hetero)aril propionici racemici și ai acizilor (*E*)-acrilici corespunzători

Sinteza compușilor a pornit de la (hetero)aril-aldehidele corespunzătoare (**13b-f**, Schema 3). În prima fază, aldehidele au fost reduse cu NaBH₄ în MeOH. Halogenarea alcoolilor cu clorura de tionil în CH₂Cl₂ în prezență benzotriazolului a condus la cloroderivații **15b-f**, care au format prin cuplare cu 2-acetamido-malonat de dietil dietil-2-acetamido-2-(aril-metil)-malonații **16b-f**. Prin hidroliză bazică cu soluție de NaOH 10%, urmată de decarboxilare în toluen la reflux se obțin acizii 2-acetamido-3-(hetero)aril-propionici **17b-f**. Deprotejarea grupării amino are loc prin hidoliză acidă în 1,4-dioxan.

Acizii (*E*)-acrilici (*E*)-**19b-f** se obțin prin reacția Knoevenagel: condensarea aldehidelor **13b-f** cu acid malonic în piridină (Schema 3).



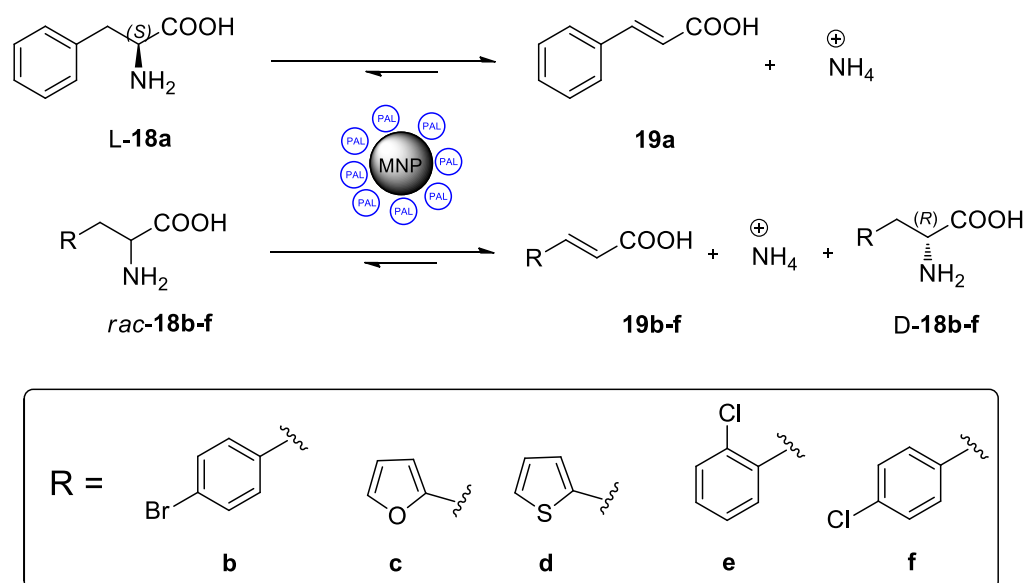
I. NaBH₄, MeOH, r.t; **II.** SOCl₂, 1*H*-benzotriazole, CH₂Cl₂, r.t; **III.** NaH, CH₃CONH(CO₂Et)₂, DMF, 60°C; **IV.** a) 10% NaOH, MeOH, reflux; b) toluene, reflux; **V.** 18% HCl, 1,4-Dioxane, reflux; **VI.** CH₃(COOH)₂, pyridine, reflux, 80°C

Schema 1. Sinteza chimică a arilalaninelor nenaturale racemice și a acizilor acrilici corespunzători

3.2.5. Biotransformări în Magne-Chip

Biotransformările au fost studiate în reactorul Magne-Chip umplut cu PcPAL imobilizat pe MNP. Experimentele includ 4 etape: (1) umplerea camerelor de reacție cu PcPAL-MNP; (2) calibrarea sistemului prin alegerea lungimii de undă corespunzătoare; (3) reacția enzimatică propriu zisă; (4) spălarea cipului. Reacția enzimatică în cip constă la rândul ei dintr-o etapă de reacție, urmată de o etapă de reinițiere. Fiabilitatea și reproductibilitatea experimentelor în platforma Magne-Chip a fost evaluată pe substratul natural L-fenilalanină. S-a studiat și s-a optimizat debitul și concentrația optimă

de substrat, iar metoda dezvoltată a fost extinsă pe substraturile nenaturale racemice *rac-18b-f* (Schema 4).



Schema 2. Eliminarea amoniacului din aminoacizii nenaturali catalizată de PAL-MNP

Măsurătorile efectuate în sistem pot fi considerate fiabile dacă îndeplinesc următoarele condiții:

- produsul reacției enzimatică poate fi măsurat selectiv în UV-VIS
- produsul și substratul pot fi complet îndepărtate în etapa de spălare
- activitatea enzimatică a biocatalizatorului rămâne neschimbată în timpul măsurătorilor
- în reactoarele magnetice stratul de MNP rămâne neschimbat în timpul măsurătorilor

Pentru a testa îndeplinirea condițiilor o măsurătoare de control s-a efectuat după fiecare experiment.

În timpul măsurătorii cipul a fost inspectat optic cu un microscop și o cameră cu viteză de capturare ridicată. Înaintea evaluării secvenței de măsurare perspectiva de plan a cipului s-a stocat ca și referință. La sfârșitul unui ciclu de reacție perspectiva de plan a cipului s-a înregistrat din nou și s-a comparat cu referința. Schimbările față de referință apar ca și pixeli albi. Numărul total al pixelilor albi se definește ca scorul diferenței de celule (cell difference score, SC), folosit ca și marker pentru a descrie schimbările în aranjamentul stratului de MNP.

Stratul de MNP poate fi deteriorat la debite ridicate în reactoarele magnetice datorită forțelor de antrenare interne, a bulelor de aer formate în timpul reacției sau a bulelor de aer nedorite provenite din surse externe, care pot intra în interiorul chipului în timpul măsurătorilor.

Inspecția vizuală a camerei oferă măsurarea continuă a schimbărilor majore în structura stratului de MNP. SC caracterizează aranjarea actuală a stratului în comparație cu imaginea inițială (de referință). În practică, valori ale SC sub 2000 indică schimbări neglijabile. Valori $SC > 3000$ pot indica însă schimbări structurale majore ale stratului de MNP, de exemplu datorită prezenței bulelor de aer. Simulările numerice au arătat că profilul vitezei devine asimetric datorită trecerii bulelor, iar debitul

global prin stratul poros de MNP scade semnificativ. În plus, bulele pot deplasa particule, scăzând astfel masa biocatalizatorului. Astfel, activitatea biocatalitică a celulei scade, iar măsurătorile devin nefiabile.

În ceea ce privește reproductibilitatea măsurătorilor s-a studiat în prima fază omogenitatea suspensiei de MNP în cameră, respectiv efectul umplerii camerelor cu MNP. Rezultatele sugerează că nici omogenitatea suspensiei de MNP, nici procedura de umplere a camerelor nu a avut efect remarcabil asupra reproductibilității experimentelor. Diferența semnificativă dintre valorile activităților enzimatiche specifice (U_B) sugerează o reacție mai eficientă în Magne-Chip.

Realizarea reacției la diferite debite de substrat indică faptul că activitatea biocatalitică nu este influențată semnificativ de intensitatea debitului. Prin creșterea debitului a crescut și viteza de reacție, până s-a ajuns la saturație la cca. $25 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. De asemenea s-a constatat că reacția urmează o cinetică de ordinul întâi până la $[S]=3 \text{ mM}$ și se saturează la $[S]=20 \text{ mM}$.

În ultima etapă s-a realizat evaluarea eficienței metodei dezvoltată anterior de biotransformare a celor cinci aminoacizi nenaturali racemici *rac* -**18b-f**. Surprinzător, s-au observat activități biocatalitice mai ridicate în cazul substraturilor nenaturale (*rac*-**18b,c,e,f**) decât pentru substratul natural L-**18a**.

3.2.6. Concluzii

A fost caracterizat un dispozitiv microfluidic care constă din mai multe camere de reacție de ordinul microlitrilor, umplute cu nanoparticule magnetice învelite cu fenilalanin ammoniac-liază din pătrunjel. S-a arătat că nici omogenitatea suspensiei de MNP nici procedura de umplere a camerelor nu au un efect remarcabil asupra reproductibilității. Efectul bulelor de aer s-a investigat atât experimental cât și prin metode numerice. S-a constatat că bulele de aer afectează reproductibilitatea și duce la creșterea valorii SC.

În acest studiu s-a testat activitatea biocatalitică în chip a biocatalizatorului PcPAL-MNP prin transformarea celor cinci substraturi. În comparație cu sisteme discontinue (batch), reacțiile în chip au depășit productivitatea biocatalizatorului PcPAL-MNP cu mai mult de trei ordine de mărime.

3.3. Sinteza β -amino acizilor

3.3.1. Introducere

β -aminoacizii optic puri sunt elementele structurale a multor compuși bioactivi cu potențial farmaceutic, cum ar fi medicamentele taxol [27] și bleomicină [28], folosite pentru tratarea cancerului, sau dolastatine și mulți alții.[29] În plus, ei sunt elemente cheie în structura β -peptidelor și a foldamerelor [21],²²[30] datorită faptului că, odată incluși în peptide, β -aminoacizii măresc stabilitatea acestora față de enzimele proteolitice prezente în organism.[31]

Au fost dezvoltate nenumarate metode chimice și biochimice pentru sinteza asimetrică, stereocontrolată a β -aminoacizilor.[32] Ammonia-liazele și aminomutazele,[33] hidantoinazele,[34] β -transaminazele,[35] ω -transaminazele[36] și lipazele[37] s-au dovedit a fi catalizatori eficienți pentru prepararea β -aminoacizilor enantiopuri.

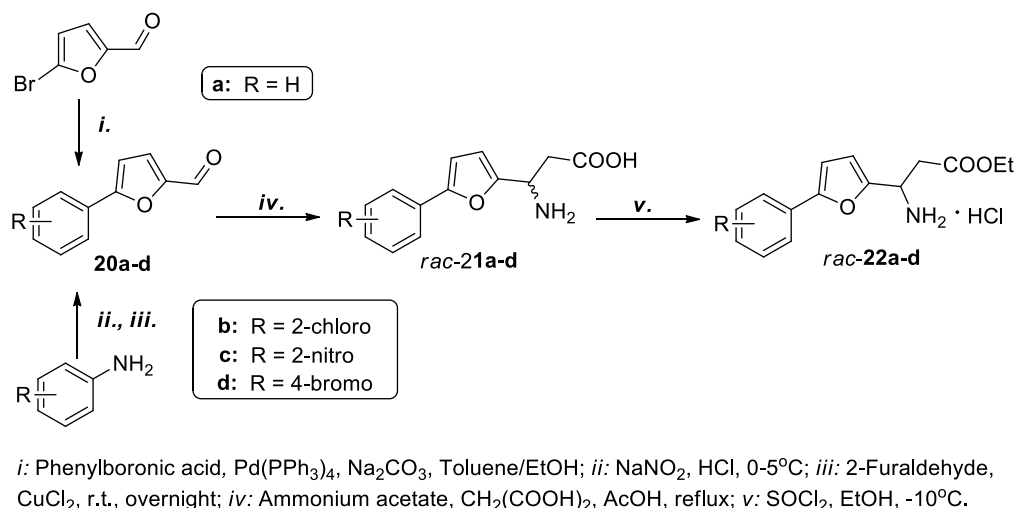
Compușii cu structură fenilfuranică sunt cunoscuți grupului nostru. Au fost dezvoltate cu succes metode chemo-enzimatice pentru obținerea 1,2-diolilor și α -aminoacizilor cu structură fenilfuranică folosind drept biocatalizatori atât celule întregi de drojdie, cât și lipaze comerciale.[38],[39]

3.3.2. Obiectivul studiului

Studiul a avut ca obiectiv dezvoltarea unei metode chemo-enzimatice pentru rezoluția cinetică a unor β -aminoesteri heteroaromatici cu structură fenilfuranică (*rac*-**22a-d**·HCl) prin hidroliză enantioselectivă catalizată de lipaze.

3.3.3. Sinteza chimică a esterilor etilici ai acizilor 3-amino-3-(5-fenilfuran-2-il)propionici

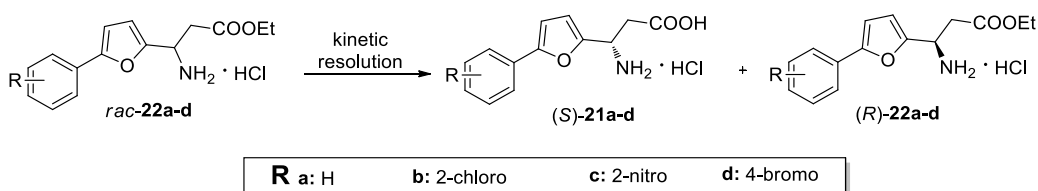
5-Fenilfurfuralul **20a** s-a obținut prin reacția Suzuki-Miyaura care presupune condensarea 5-bromofurfuralului cu acid fenilboronic în prezența catalizatorului tetrakis(trifenilfosfină) de paladiu(0). Derivații substituiți **20b-d** au fost sintetizați prin cuplarea furfuralului cu sarea de fenildiazoni în prezență de CuCl₂. β -aminoacizii au fost obținuți prin reacția de tip Rodionov modificată, iar prin esterificarea aminoacizilor cu etanol și clorură de tionil s-au produs β -aminoesterii racemici sub formă de clorhidrat *rac*-**22a-d**·HCl (Schema 5).



Schema 3. Sinteza chimică a esterilor acizilor 3-amino-3-(5-fenilfuran-2-il)propionici

3.3.4. Rezoluția cinetică enzimatică prin hidroliză enantioselectivă

Au fost investigați pentru prima dată β -aminoesterii *rac*-**22a-d** sub formă de clorhidrat (*rac*-**22a-d**·HCl, Schema 6), deoarece aminele libere sunt instabile și se pot descompune rapid.



Schema 4. Hidroliză enantioselectivă catalizată de lipaze

Au fost testate diferite enzime disponibile comercial pentru transformarea *rac-22a*·HCl în toluen la 45 °C. Cantități diferite de trietilamină (TEA) au fost adăugate în vederea eliberării *in-situ* a aminoesterilor din clorhidrat. Enantioselectivități excelente au fost observate utilizând lipaza LPS imobilizată pe pământ diatomic (LPS-Diat). Au fost evaluați drept mediu de reacție diferiți solvenți, cum ar fi apă bidistilată, diisopropil eter, metil-*tert*-butil eter, 2 metil-tetrahidrofuran și 1,4-dioxan utilizând enzima LPS-Diat. În eteri ciclici nu a fost detectată nici o activitate catalitică, în timp ce în solvenți aciclici vitezele de reacție au fost excelente, însă enantioselectivitățile scăzute.

Rezultate cele mai promițătoare au fost obținute în apă. Acest sistem are însă următoarele dezavantaje: în mediu apos hidroliză chimică a esterului etilic poate fi semnificativă ceea ce conduce la scăderea purității optice a produșilor, respectiv enzimele utilizate, fiind imobilizate fizic, prin adsorbție, pot fi desorbite de pe suport. Prin urmare, stabilitatea și activitatea enzimatică pot să scadă considerabil. Pentru diminuarea acestor efecte a fost setată la 30 °C temperatura de lucru (temperatura optimă la care hidroliză chimică e minimă), respectiv enzimele LPS și LAK au fost imobilizate covalent pe un suport copolimeric de tip polimer metacrilat cu unități oxiranice, ImmoBead IB-150P. În plus, luând în considerare faptul că stabilitatea enzimelor în mediu apos este dependentă de tăria ionică a soluției, a fost controlat pH-ul prin folosirea de soluții tampon în loc de apă distilată, de concentrație bine definită.

Experimentele astfel realizate s-au dovedit a fi eficiente, permițând obținerea de viteze de reacție ridicate cu excese enantiomerice și enantioselectivități excelente. Biocatalizatorii utilizați au fost stabili și și-au păstrat activitatea chiar și după 12 cicluri.

3.3.5. Biotransformări la scară preparativă

Reacțiile cantitative au fost realizate în condițiile dezvoltate la scară analitică. (*R*)-aminoesterii (*R*)-**22a-d**·HCl nereacționați, respectiv (*S*)-aminoacizii (*S*)-**21a-d**·HCl formați în urma reacțiilor enzimatică au fost separați prin cromatografie preparativă și au fost caracterizați corespunzător (cu excepția (*R*)-**21a**).

Configurația absolută a compușilor optic activi separați prin rezoluția cinetică a fost determinată prin compararea spectrelor ¹H RMN ale diastereomerilor rezultați din reacția esterului (+)-**22d** cu enantiomerii (*R*) și (*S*) a clorurii acidului Mosher.

3.3.6. Concluzii

A fost dezvoltată o metodă chemo-enzimatică pentru obținerea enantioselectivă a unor β -aminoacizi fenilfuranici. Metoda se bazează pe hidroliza enantioselectivă a β -aminoesterilor sub formă de clorhidrat catalizată de LPS și LAK în soluție tampon acetat de amoniu 20 mM la pH 5.8. Lipazele au fost în prealabil immobilizate covalent pe Immobead IB-150P. Enantiomerii compușilor investigați au fost obținuți cu conversii și excese enantiomerice ridicate și au fost caracterizați corespunzător

4. Concluzii generale

Teza vizează dezvoltarea unor metode chemo-enzimatice noi, atât în sisteme discontinue cât și continue, pentru sinteza enantioselectivă unor amino alcooli și aminoacizi cu structură aromatică sau heteroaromatică, care pot avea aplicabilitate în domeniul științific dar și în industria alimentară, chimică sau farmaceutică.

Biotransformări catalizate de lipaze și amoniac-liaze, combinate cu metode convenționale de sinteză au permis prepararea ambilor enantiomeri ai bufuralolului, un antagonist ai receptorilor β -adrenergici, respectiv la sinteza unor α - și β -aminoacizi (hetero)aromatici valoroși.

Enantiomerii bufuralolului au fost obținuți atât prin biotransformări catalizate de celule de drojdie, cât și prin rezoluția cinetică catalizată de lipaza CaL-B.

Transformarea L-fenilalaninei prin intermediul fenilalanin amoniac-liazei imobilizată pe nanoparticule magnetice a fost studiată într-un reactor microfluidic Magne-Chiop. Metoda dezvoltată s-a dovedit a fi o alternativă eficientă și fiabilă și a fost folosită cu succes pentru transformarea altor cinci α -aminoacizi, analogi nenaturali ai fenilalaninei.

5-Fenilfuran-2-il- β -aminoesteri au fost rezolvați, pentru prima dată, sub formă de clorhidrat prin hidroliză enantioselectivă în mediu apos, mediată de lipaze din specia *Pseudomonas*. Stabilitatea enzimelor utilizate a fost asigurată prin imobilizarea covalentă a acestora pe suport polimeric. S-au obținut astfel biocatalizatori cu proprietăți superioare.

6. Mulțumiri

În primul rând aș dori să-mi exprim recunoștința față de conducătorul meu științific, Prof. Habil. Dr. Ing. Monica Ioana Toșa pentru îndrumare, ajutorul acordat și răbdare pe timpul anilor de doctorat.

Le adresez mulțumiri speciale Prof. Habil. Dr. Ing. Csaba Paizs, Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie, Lect. Dr. Paula Veronica Podea, Lect. Dr. László Csaba Bencze, Dr. Ing. Brem Jürgen, pentru ajutorul lor acordat pe timpul studiilor.

Aș dori să mulțumesc Prof. Dr. Ing. László Poppe de la Universitatea Tehnică și Economică, Budapesta, Ungaria, respectiv Prof. Dr. Ferenc Fülöp și Dr. Enikő Forró de la Institutul de Chimie Farmaceutică, Szeged, Ungaria pentru ajutorul lor și pentru oportunitățile de stagiu în cadrul grupurilor lor de cercetare.

Mulțumiri le adresez și colegilor mei pentru ajutorul acordat și pentru prietenia lor: Dr. Ing. Mara Ana Naghi, Dr. Ing. Alexandra Radu (Mantu), Dr. Ing. Andrea Varga, Dr. Hajnal Judith Bartha-Vári, Dr. Melinda Füstös, Dr. Róbert Tötös, Dr. Nóra Szarvas, Dr. Galla Zsolt (Institutul de Chimie Farmaceutică, Szeged), Ing. Norbert-Arthur Dima, Alina Filip, Ing. Mădălina-Elena Moisă, Ing. Mihai Lăcătuș, Ing. Ioan Bodea, Ibolya Varga.

Aș dori să mulțumesc membrilor comisiei pentru interesul acordat acesei teze.

Mulțumesc pentru suportul financiar Fundației Székely Forerunner , Programului Collegium Talentum și Programului Operațional Sectorial de Dezvoltare a Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat de către Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/132400.

Îi mulțumesc din suflet soției mele, Zsuzsa Nagy, părinților și surorii mele care au fost mereu alături de mine oferindu-mi încredere și sprijin.

7. Publicații științifice

1. **B. Nagy**, N. Dima, C. Paizs, J. Brem, F.D. Irimie, M.I. Toșa: New chemo-enzymatic approaches for the synthesis of (*R*)- and (*S*)-bufuralol, *Tetrahedron:Asymmetry* **2014**, 25, 1316-1322, I.F. = 2.155
2. F. Ender, D. Weiser, **B. Nagy**, C.L. Bencze, C. Paizs, P. Pálóvics, L. Poppe: Microfluidic multiple cell chip reactor filled with enzyme-coated magnetic nanoparticles – An efficient and flexible novel tool for enzyme catalyzed biotransformations, *Journal of Flow Chemistry*, **2016**, 6(1), 43-52, I.F. = 1.942
3. **B. Nagy**, Z. Galla, L.C. Bencze, M.I. Toșa, C. Paizs, E. Forró, F. Fülöp, Covalently immobilized lipases are efficient stereoselective catalysts for the kinetic resolution of novel *rac*-(5-phenylfuran-2-yl)- β -alanine-ethyl ester hydrochlorides, *European Journal of Organic Chemistry*, **2017**, 20, 2878-2882, I.F. = 3.068

Conferințe

1. **B. Nagy**, Z. Galla, C. Paizs, E. Forró, F. Fülöp, Synthesis and enzymatic kinetic resolution of novel 3-amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propanoic acid ethyl esters, *International Symposium on Synthesis and Catalysis*, September 2nd – 4th, 2015, Evora, Portugal
2. **B. Nagy**, N. Dima, M.I. Toșa, C. Paizs, F.D. Irimie, Alternative Approaches for the Enantioselective Synthesis of (*S*)- and (*R*)-bufuralol, 13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, June 27th – July 7th, 2013, Debrecen, Hungary

Alte activități științifice

Publicații

- B. Nagy , M.E. Moisă, A. Filip, L.C. Bencze, M.I. Toșa, Lipase catalyzed parallel kinetic resolution of ibuprofen, *Studia Universitatis Babes Bolyai Chemia*, LXI, **2016**, 4, 255-266
- Varga, G. Bánóczy, B. Nagy, L.C. Bencze, M.I. Tosa, Á. Gellért, F.D. Irimie, J. Rétey, L. Poppe, C. Paizs, Influence of the aromatic moiety in α - and β -arylalanines on their biotransformation with phenylalanine 2,3-aminomutase from *Pantoea agglomerans*, *RSC Advances* **2016**, 6, 56412-56420
- Munceanu, B. Nagy, M. Trif., N. Dima, *Pseudomonas fluorescens* lipase as biocatalyst in the enzymatic kinetic resolution of chiral phenothiazine ethanols, *Studia Universitatis Babes Bolyai Chemia*, LIX, **2014**, 1, 35-46
- L. Pop, P. Lassalas, C. L. Bencze, M. I. Tosa, B. Nagy, F. D. Irimie, C. Hoarau, Chemo-enzymatic synthesis of highly enantiomerically enriched secondary alcohols with a thiazolic core, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 474-481.

Conferințe

- COST Action CM1303 “SysBiocat” Training School, **2016**, Certosa di Pontignano, Italy, poster
- 29th Annual Symposium of The Protein Society, **2015**, Barcelona, Spain, poster
- 14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, **2014**, Bratislava-Smolenice, Slovakia, poster
- COST Action CM1303 “SysBiocat” Training School, **2014**, Certosa di Pontignano, Italy, poster
- 4th International Conference on Novel Enzymes, **2014**, Ghent, Belgium, poster
- PhD Conference, **2014**, Szeged, Hungary, oral presentation
- 19th. International Conference on Chemistry, **2013**, Baia Mare, Romania, oral presentation
- Biostruct course on basics in protein crystallization and crystallography, **2013**, Budapest, Hungary, oral presentation

8. Referințe

- [1] F.Fache, E. Schulz, M.L. Tommasino, M. Lemaire, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2159-2231
- [2] a) D.J. Ager, I. Prakash, D.R. Schaad, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-875; b) S.C. Bergmeier, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2561-2576.
- [3] a) M.J. McKennon, A.I. Meyers, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3568-3571; b) S. Wei, R. Messerer, S.B. Tsogoeva, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14380-14384; c) S. Inuki, K. Sato, Y. Fujimoto, *Tetrahedron Letters* **2015**, *56*, 5787-5790
- [4] a) B. Olofsson, P. Somfai, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8574-8583; b) G. Li, H.-T. Chang, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 451-454
- [5] a) B.M. Trost, J. Jaratjaroonphong, V. Reutrakul, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2778-2779; b) Y.-W. Zhong, Y.-Z. Dong, K. Fang, K. Izumi, M.-H. Xu, G.-Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11956-11957; c) S. Torssell, M. Kienle, P. Somfai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3096-3099; d) A.W. Buesking, J.A. Ellman, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1983-1987; e) J.A. Birrell, E.N. Jacobsen, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2895-2897
- [6] a) A. Alalla, M. Merabet-Khelassi, O. Riant, L. Aribi-Zouiouche, *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27*, 1253-1259; b) K. Lundell, L.T. Kanerva, *Chimica oggi* **2007**, *25*(5), 26-30
- [7] a) A. Nobili, F. Steffen-Munsberg, H. Kohls, I. Trentin, C. Schulzke, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 757-760; b) J.-D. Zhang, H.-L. Wu, T. Meng, C.-F. Zhang, X.-J. Fan, H.-H. Chang, W.-L. Wei, *Analytical Biochemistry* **2017**, *518*, 94-101
- [8] a) G.A. Fothergill, R.J. Francis, T.C. Hamilton, J.M. Osbond, M.W. Parkes, *Experientia* **1975**, *31*, 1322; b) G.A. Fothergill, J.M. Osbond, J.C. Wickens, *Arzneim.-Forsch. Drug. Res.* **1977**, *27*, 978-981;
- [9] T.C. Hamilton, M.W. Parkes, *Arzneimittelforsch.* **1977**, *27*, 1410-1417
- [10] a) D. Magometschnigg, J. Bonelli, G. Hitzenberger, G. Kaik, A. Korn, *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1978**, *16*, 54-58; b) D. Magometschnigg, J. Bonelli, G. Kaik, H. Rameis, *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1979**, *17*, 334-340
- [11] D.N. Li, P.M. Pritchard, S.P. Hanlon, B. Burchell, C.R. Wolf, T. Friedberg, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 661-667.
- [12] D.C. Mankowski, *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1024-1028
- [13] S.K. Hwang, A. Juhasz, S.H Yoon, N. Bodor, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1525, 1532
- [14] a) J. Kim, Y.R. Lim, S. Han, J.S. Haan, Y.J. Chun, C.H. Yun, C.H. Lee, D. Kim, *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 1500; b) T. Hiroi, T. Chow, S. Imaoka, Y. Funae, *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 970-976; c) X.Q. Li, A. Björkman, T.B. Andersson, L.L. Gustafsson, C.M. Masimirembwa, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *59*, 429-442; d) P.J. Machin, D.N. Hurst, J.M. Osbond, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1648-1651; e) S. Ren, J. Zeng, Y. Mei, J.Z.H. Zhang, S.F. Yan, J. Fei, L. Chen, *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 60-71
- [15] T. Pruksaritanont, L.M. Dwyer, A.E. Cribb, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1521-1525
- [16] a) P.V. Podea, C. Paizs, M.I. Toșa, F.D. Irimie, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1959-1964; b) L.C. Bencze, C. Paizs, M.I. Toșa, F.D. Irimie *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 356-364

- [17] J.M. Martonelli, K.N. Nayyar, D.E. Moher, P.U. Dhokte, M.J. Pawlak, R. Vaidyanathan, R., *Org. Lett.* **1999**, *1*, 447–450
- [18] K. Oyama, *Chirality in Industry 1992* (eds A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 237–247
- [19] J. Kamphuis, W.H.J. Boesten, B. Kaptein, H.F.M. Hermes, T. Sonke, Q.B. Broxterman, W.J.J. Van den Tweel, H.E. Schoemaker, *Chirality in Industry 1992* (eds A.N. Collins, G.N. Sheldrake, and J. Crosby), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 187–208
- [20] G. Bold, A. Fässler, H.G. Capraro, R. Cozens, T. Klimkait, J. Lazdins, J. Mestan, B. Poncioni, J. Rösel, D. Stover, M. Tintelnot-Blomley, F. Acemoglu, W. Beck, E. Boss, M. Eschbach, T. Hurlimann, E. Masso, S. Roussel, K. Ucci-Stoll, D. Wyss, M. Lang, *J. Med. Chem* **1998**, *41*, 3387–3401
- [21] P. Spiteller, F. von Nussbaum, *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids* (eds V. Soloshonok and E. Juaristi), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 19–91
- [22] D.L. Steer, R.A. Lew, P. Perlmutter, A.I. Smith, M.I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 811–822
- [23] a) V. Gotor-Fernandez, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812; b) F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 501-519; c) J. Altenbuchner, M. Siemann-Herzberg, C. Sylđatk, *Curr. Opin. Biotechnol* **2001**, *12*, 559-563
- [24] a) V. Koehler, K.R. Bailey, A. Znabet, J. Raftery, M. Helliwell, N.J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed* **2010**, *49*, 2182-2184; b) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol* **2010**, *28*, 324-332
- [25] A. Gloge, J. Zon, A. Kővári, L. Poppe, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3386-3390
- [26] C. Paizs, A. Katona, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2739-2744; b) C. Paizs, M.I. Toşa, L.C. Bencze, J. Brem, F.D. Irimie, J. Rétey, *Heterocycles* **2011**, *82*, 1217-1228
- [27] M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327
- [28] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi and Y. Okami, *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209
- [29] E. Juaristi, H. López-Ruiz, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 983-1004
- [30] a) D. Seebach, T. Kimmerlin, R. Sebesta, M.A. Campo, A.K. Beck, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7455-7506; b) T.A. Martinek, F. Fülöp, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 687-702
- [31] a) P. Zubrzak, H. Williams, G.M. Coast, R.E. Isaac, G. Reyes-Rangel, E. Juaristi, J. Zabrocki, R.J. Nachman, *Peptide Science* **2007**, *88*, 76-82; b) J. Frackenhohl, P.I. Arvidsson, J.V. Schreiber, D. Seebach, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 445-455
- [32] a) F. Fülöp, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181–2204; b) A. Liljeblad, L.T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854; c) L. Kiss, F. Fülöp, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1116-1169
- [33] a) N.J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*(2), 234-240; b) M.M. Heberling, B. Wu, S. Bartsch, D.B. Janssen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*(2), 250-260
- [34] M. O’Neill, B. Hauer, N. Schneider, N.J. Turner, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1014-1016

- [35] . Kim, D. Kyung, H. Yun, B.K. Cho, J.H. Seo, M. Cha, B.G Kim, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1772–1782
- [36] a) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332; b) H.S. Bea, H.J. Park, S.H. Lee, H. Yun, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5894-5896
- [37] a) M. Shakeri, K. Engström, A.G. Sandström, J.E. Bäckvall, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 534-538; b) M. Rodríguez-Mata, E. García-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 395-406; c) M. Fitz, E. Forró, E. Vigóczki, L. Lázár, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1114-1119
- [38] a) P. Hara, M.C. Turcu, R. Sundell, M. Toşa, C. Paizs, F.D. Irimie, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 142-150; b) L.C. Bencze, C. Paizs, M.I. Toşa, F.D. Irimie, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 356-364; c) L.C. Bencze, C. Paizs, M.I. Toşa, F.D. Irimie, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 675-683
- [39] L.C. Bencze, B. Komjáti, L.A. Pop, C. Paizs, F.D. Irimie, J. Nagy, L. Poppe, M.I. Toşa, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 1095-1101