



Universitatea Babeș-Bolyai
Cluj-Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Lipaze proiectate pentru dezvoltarea de bioprocese

Rezumatul Tezei de Doctorat

Doctorand: MĂDĂLINA ELENA MOISĂ

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Eng. MONICA IOANA TOȘA

Cluj-Napoca

2019



Universitatea Babeş-Bolyai

Cluj-Napoca

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Mădălina Elena Moisă

Lipaze proiectate pentru dezvoltarea de bioprocese

Rezumatul Tezei de Doctorat

Comisia de Doctorat:

Președinte: Prof. Dr. ION GROSU, membru corespondent al Academiei Române – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Ing. MONICA IOANA TOȘA – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Referenți: Cercetător senior Dr. Ing. CARMEN BOERIU – Wageningen University and Research Centre, Wageningen, Olanda

Prof. Dr. Ing. MIRCEA DĂRĂBANȚU H. D. R. – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Prof. Dr. Ing. FRANCISC PÉTER – Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, Universitatea Politehnică, Timișoara

Data susținerii publice: 15 Februarie 2019

CUPRINS

Lista de abrevieri	5
Lista publicațiilor originale.....	8
Capitolul 1. Introducere generală	9
Capitolul 2. Studiul de literatură.....	11
2.1. Biocataliza.....	11
2.2. Lipazele	13
2.3. Rezoluția cinetică	15
2.4. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a alcoolilor secundari racemici	17
2.5. Imobilizarea enzimelor.....	19
2.6. Procese în sistem discontinuu <i>versus</i> continuu	21
Capitolul 3. Scopul tezei	23
Capitolul 4. Contribuții personale.....	25
4.1. Lipaze imobilizate prin includere în sol-gel pentru rezoluția cinetică enzimatică a heteroariletanolilor în sistem discontinuu și continuu	25
4.1.1. Introducere	25
4.1.2. Rezultate și discuție	27
4.1.2.1. Sinteza chimică a etanolilor heteroaromatici <i>rac-2a-i</i> și a acetatilor corespunzători <i>rac-3a-i</i>	27
4.1.2.2. Optimizarea proceselor de EKR a etanolilor racemici <i>rac-2a-i</i> în reacții de <i>O</i> -acilare cu acetat de vinil și preparate de lipaze imobilizate în solvenți organici.....	28
4.1.2.3. Stabilitatea operațională a preparatelor de lipaze imobilizate în procese discontinue	1243
4.1.2.4. EKR mediată de lipaze a heteroariletanolilor racemici în sistem continuu utilizând reactoare în strat fix	48
4.1.3. Concluzii.....	56

4.2. Strategie de separare bazată pe reacție click aplicată în rezoluția cinetică enzimatică a alcoolilor secundari (hetero)aromatici.....	208
4.2.1. Introducere	208
4.2.2. Rezultate și discuție	68
4.2.2.1. Sinteza chimică a 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetaților racemici <i>rac-5c,d,i,j</i> , a agenților de acilare 4A-E și a reactanților	70
4.2.2.2. Optimizarea sursei de Cu(I) pentru reacția click	71
4.2.2.3. Optimizarea reacției de <i>O</i> -acilare catalizată de lipaze a (hetero)ariletanolilor racemici <i>rac-2c,d,i,j</i> cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetații 4A-E	72
4.2.2.4. Elaborarea protocolului bazat pe reacție click pentru separarea produșilor EKR.....	78
4.2.2.5. Izolarea (<i>S</i>)- și (<i>R</i>)-(hetero)ariletanolilor îmbogățți enantiomeric 2c,d,i,j prin procesul în tandem <i>O</i> -acilare enzimatică/separare asistată de reacție click/alcooliză enzimatică.....	79
4.2.2.6. <i>O</i> -acilarea <i>rac</i> -1-feniletan-1-olului <i>rac-2j</i> cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil 4D mediată de lipaza CaL-B-SWCNT în flux continuu	81
4.2.3. Concluzii.....	84
Capitolul 5. Partea experimentală.....	86
5.1. Materiale și metode	86
5.2. Imobilizarea lipazelor.....	89
5.3. Sinteze chimice	89
5.3.1. Sinteza chimică a heteroariletanolilor racemici <i>rac-2a-i</i>	89
5.3.2. Sinteza chimică a heteroaril-acetaților racemici <i>rac-3a-i</i>	90
5.3.3. Sinteza chimică a (hetero)aril-propiniloxi-acetaților racemici <i>rac-5c,d,i,j</i>	91
5.3.4. Sinteza chimică a agenților de acilare 4A-E	92
5.3.4.1. Sinteza acidului 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetic	92
5.3.4.2. Sinteza 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetatului de etil (4A)	93

5.3.4.3.	Sinteza 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetaților de izopropil, propargil și 2,2,2-trifluoroetil (4B-D).....	93
5.3.4.4.	Sinteza chimică a 2-((1-(2-(diethyl-amino)etil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metoxi)acetatului de 2,2,2-trifluoroetil (4E)	94
5.3.5.	Sinteza chimică a 2-azido- <i>N,N</i> -dietiletan-1-aminei	95
5.3.5.1.	Sinteza clorhidratului 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletan-1-aminei.....	95
5.3.5.2.	Sinteza 2-azido- <i>N,N</i> -dietiletan-1-aminei	95
5.4.	Optimizarea sursei de Cu(I) pentru reacția click.....	96
5.5.	Elaborarea protocolului bazat pe reacție click pentru separarea produșilor EKR.....	96
5.6.	Sinteze enzimatiche.....	98
5.6.1.	<i>O</i> -acilarea heteroariletanolilor racemici <i>rac</i> - 2a-i cu acetat de vinil mediată de lipaze imobilizate la scară analitică	98
5.6.2.	Recircularea biocatalizatorilor în reacțiile de <i>O</i> -acilare ale <i>rac</i> - 2a,c,d,g,i cu acetat de vinil mediate de preparatele de lipaze imobilizate selectate.....	99
5.6.3.	<i>O</i> -acilarea <i>rac</i> - 2c,d cu acetat de vinil catalizată de lipaze în reactoare continue în strat fix.....	99
5.6.4.	<i>O</i> -acilarea <i>rac</i> - 2c,d cu acetat de vinil catalizată de lipaze în sistem discontinuu. 100	
5.6.5.	Acilarea enzimatică a <i>rac</i> - 2c,d,i,j cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetați la scară analitică.....	100
5.6.6.	Alcooliza enzimatică a triazolilor ionizabili (<i>R</i>)- 6c,d,i,j la scară analitică	100
5.6.7.	Izolarea (<i>S</i>)- și (<i>R</i>)-(hetero)ariletanolilor îmbogățți enantiomeric 2c,d,i,j prin procesul în tandem <i>O</i> -acilare enzimatică/separare bazată pe reacție click/alcooliză enzimatică.....	101
5.6.8.	<i>O</i> -acilarea <i>rac</i> -1-feniletan-1-olului <i>rac</i> - 2j cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil 4D mediată de lipaza CaL-B-SWCNT în reactor continuu în strat fix	102
5.6.9.	<i>O</i> -acilarea <i>rac</i> -1-feniletan-1-olului <i>rac</i> - 2j cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil 4D mediată de lipaza CaL-B-SWCNT în sistem discontinuu.....	103
Capitolul 6. Concluzii generale.....		104

Mulțumiri	106
Referințe bibliografice	108
Anexe: Publicații originale.....	116

Cuvinte cheie: biocataliză, rezoluție cinetică enzimatică, transesterificare enzimatică, etanoli heteroaromatici chirali, lipaze, imobilizare în sol-gel, reactor discontinuu, reactor continuu, separarea produșilor rezoluției cinetice, reacție click.

Capitolul 1. Introducere generală

Biocataliza reprezintă un domeniu activ de cercetare atât în mediul academic cât și în industrie. Nevoia constantă de a dezvolta tehnologii cu eficacitate, productivitate și selectivitate crescute, dar costuri reduse și impact minim asupra mediului, a condus interesul și efortul cercetătorilor și inginerilor spre domeniul biocatalizei. Studiile și munca desfășurate în ultimele decenii demonstrează faptul că există doar câteva limitări în utilizarea enzimelor sau a celulelor întregi ca biocatalizatori în sinteza organică.

Pe lângă activitate catalitică și selectivitate (chemo-, regio- și stereoselectivitate) ridicate, factori decisivi pentru utilizarea cu succes a enzimelor sunt stabilitatea și reciclabilitatea. În plus, viabilitatea economică a unui proces depinde de productivitatea biocatalizatorului. Stabilitate ridicată în medii nenaturale (spre exemplu în solvenți organici) și posibilitatea de recuperare și reutilizare a biocatalizatorului pot fi obținute prin imobilizarea enzimelor. Pe lângă aceasta, operarea în sisteme în flux continuu cu enzime imobilizate oferă modalități de creștere a productivității.

Datorită faptului că cei doi enantiomeri ai unui compus chiral pot avea efecte fiziologice diferite, utilizarea enzimelor drept catalizatori este atractivă în special pentru industria farmaceutică unde poate oferi căi biocompatibile și selective pentru sinteza compușilor optici puri. Merită menționat faptul că potențialul unui compus nu depinde doar de complexitatea structurală sau de puritatea optică, ci și de posibilitatea de a fi obținut printr-o tehnologie care poate fi ușor transpusă la scară mare. De asemenea, un aspect important legat de ingineria de proces constituie posibilitatea de a asigura o procedură de prelucrare simplă care să permită randamente mari de recuperare a produșilor doriți.

În cadrul acestei teze sunt abordate unele aspecte legate de utilizarea lipazelor în procese de rezoluție cinetică în solvenți organici în scopul obținerii unor alcooli secundari îmbogățți enantiomeric extrem de utili.

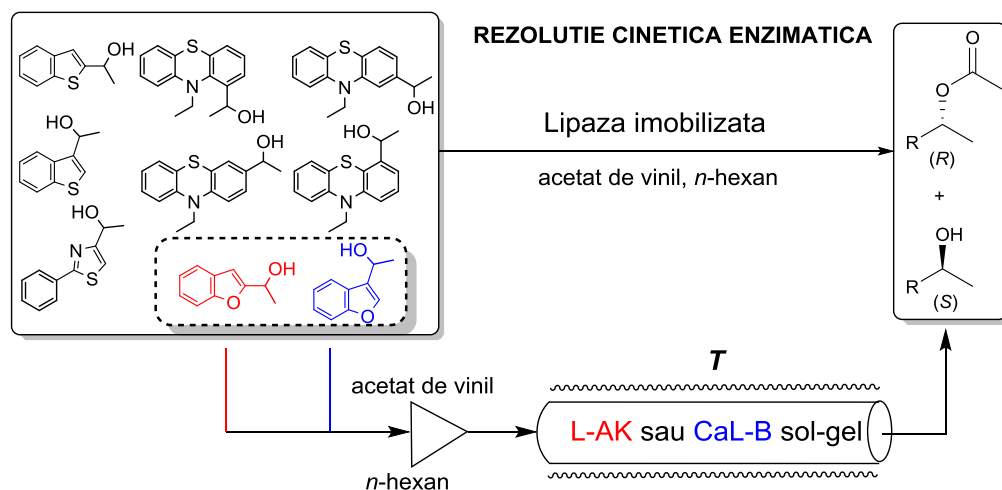
Prima parte a Capitolului 4 (Contribuții personale), **Lipaze immobilizate prin includere în sol-gel pentru rezoluția cinetică enzimatică a heteroariletanolilor în sistem discontinuu și continuu**, descrie aplicarea unor preparate de lipaze immobilizate prin includere în sol-gel cu stabilitate ridicată pentru sinteza stereoselectivă eficientă a heteroaril-alcoolilor secundari optic puri în reactoare discontinue și continue, oferind o bază utilă pentru o dezvoltare de proces adițională.

A doua parte a Capitolului 4, **Strategie de separare bazată pe reacție click aplicată în rezoluția cinetică enzimatică a alcoolilor secundari (hetero)aromatici**, se referă la provocările separării amestecurilor de reacție de la finalul proceselor de rezoluție cinetică la nivel industrial și prezintă dezvoltarea unei proceduri noi și simple pentru prelucrarea rezoluțiilor cinetice enzimatică care permite recuperarea ambilor enantiomeri ai etanolilor (hetero)aromatici cu randamente mari, conservând puritățile optice excelente obținute în procesele de EKR.

Capitolul 2. Studiul de literatură (date din literatură)

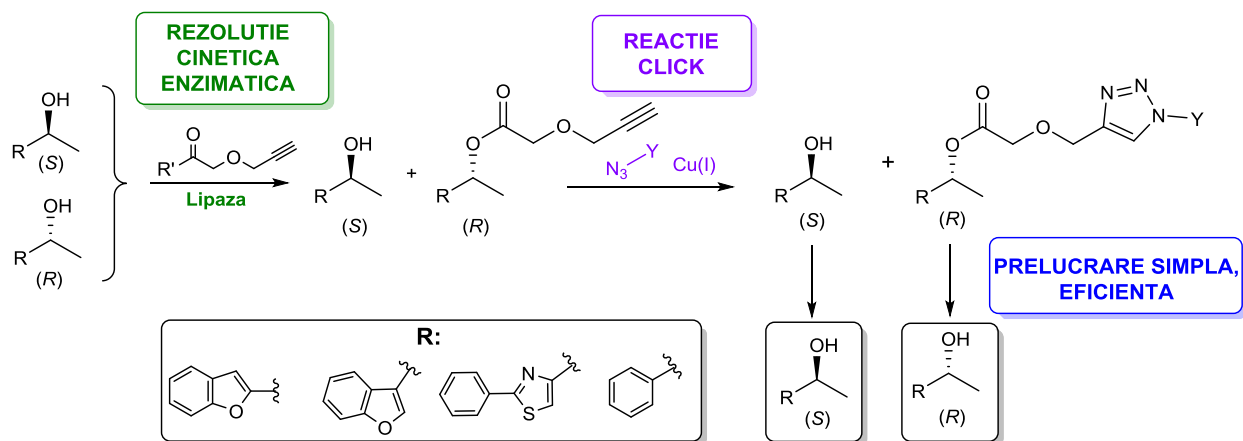
Capitolul 3. Scopul tezei

➤ dezvoltarea unor procese eficiente de rezoluție cinetică enzimatică pentru sinteza de etanoli heteroaromatici îmbogății enantiomeric extrem de utili, utilizând lipaza din *Pseudomonas fluorescens* și lipaza B din *Candida antarctica*, immobilizate prin includere în sol-geluri cu proprietăți ajustabile, în reactoare discontinue și continue;



➤ dezvoltarea unei strategii simple, economice și transpozabile la scară mare pentru separarea produșilor rezoluției cinetice cu ajutorul reacțiilor click blânde și selective. Acest studiu s-a axat pe separarea amestecurilor de reacție alcool-ester obținute în urma reacțiilor de transesterificare enantioselective mediate de lipaze ale alcoolilor secundari (hetero)aromatici racemici.

8 | Capitolul 3. Scopul tezei



Etanolii (hetero)aromatici au fost selectați compuși de interes datorită importanței lor de necontestat ca sintoni chirali versatili în industria farmaceutică și cea a sintezei organice fine. Structuri heteroaromate precum benzofuran, benzo[*b*]tiofen, fenotiazina și 2-feniltiazol, prezente în numeroși produși naturali și medicamente sunt asociate cu activitate antibacteriană, antivirală, antifungică, anticancer, antimalarică, antiinflamatoare, analgezică sau anticoagulantă.¹⁻⁴

Capitolul 4. Contribuții personale

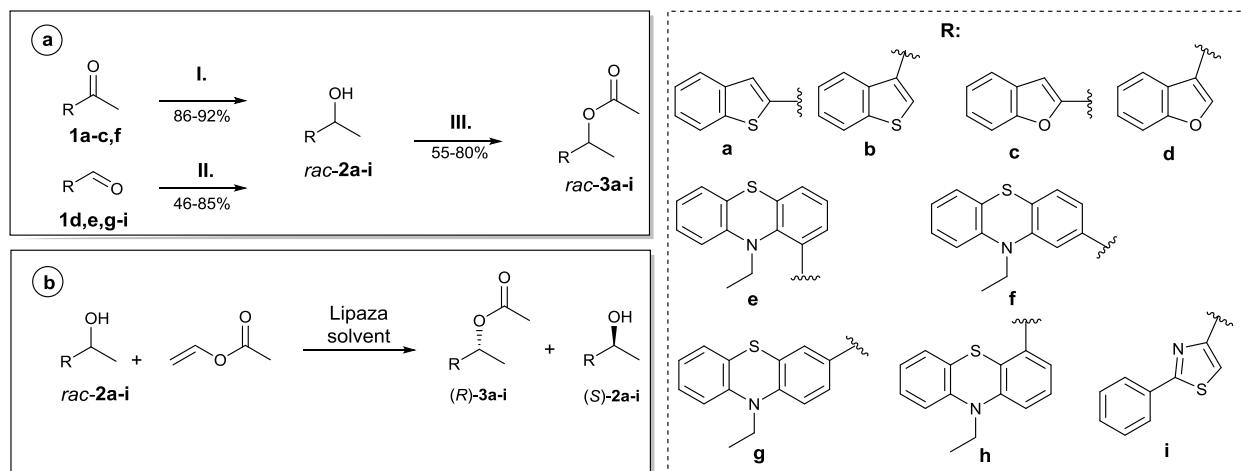
4.1. Lipaze immobilizate prin includere în sol-gel pentru rezoluția cinetică enzimatică a heteroariletanolilor în sistem discontinuu și continuu

4.1.1. Introducere (date din literatură)

4.1.2. Rezultate și discuție

4.1.2.1. Sinteza chimică a etanolilor heteroaromatici *rac-2a-i* și a acetatilor corespunzători *rac-3a-i*

Inițial sinteza chimică a substraturilor și produșilor racemici s-a realizat după metode cunoscute deja (**Schema 1a**). ^{Error! Bookmark not defined.-Error! Bookmark not defined.} Etanolii *rac-2a-i* au fost utilizați ca substraturi în reacții de *O*-acilare mediate de lipaze (**Schema 1b**).



Schema 1. a) Sinteza chimică a etanolilor racemici și a acetatilor corespunzători; b) EKR mediată de lipaze;
Reactivi și condiții de reacție: **I.** NaBH₄, MeOH, rt; **II.** CH₃MgI, Et₂O anh.; **III.** Cl-CO-CH₃, 1% DMAP/Piridină, CH₂Cl₂ anh.

4.1.2.2. Optimizarea proceselor de EKR a etanolilor racemici *rac-2a-i* în reacții de *O*-acilare cu acetat de vinil și preparate de lipaze imobilizate în solvenți organici

Imobilizarea lipazelor s-a realizat prin adsorbție pe Celită 545, includere în sol-geluri obținute din amestecuri binare (BS) sau ternare (TS) de precursori silanici sau prin combinarea acestor două metode, după cum este redat în **Tabelul 1**. Pentru includerea în sol-gel a enzimelor s-au utilizat două metode: **Metoda 1** care folosește NaF drept catalizator pentru hidroliză și policondensare simultane și **Metoda 2** care utilizează un sol prepolimer obținut cu HCl.

Tabelul 1. Descrierea preparatelor de lipaze imobilizate

Codul preparatului ^a	Metoda de imobilizare	Precursori silanici ^b (raport molar)
CaL-B 1 BS	Metoda 1	VTMOS:TMOS (4:1)
CaL-B 1 BSC	Metoda 1 + adsorbție pe Celită 545	VTMOS:TMOS (4:1)
CaL-B 1 TS	Metoda 1	PhTMOS:VTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
CaL-B 1 TSC	Metoda 1 + adsorbție pe Celită 545	PhTMOS:VTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
CaL-B 1 TS*	Metoda 1	PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
CaL-B 2 TS	Metoda 2	PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
CaL-B 2 TSC	Metoda 2 + adsorbție pe Celită 545	PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
CaL-B Celită	Metoda 3 (adsorbție pe Celită 545)	-
AK 1 BS	Metoda 1	OcTMOS:TMOS (1:1)
AK 1 BSC	Metoda 1 + adsorbție pe Celită 545	OcTMOS:TMOS (1:1)
AK 1 TS	Metoda 1	PhTMOS:VTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
AK 1 TSC	Metoda 1 + adsorbție pe Celită 545	PhTMOS:VTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)
AK 2 TSC	Metoda 2 + adsorbție pe Celită 545	PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1.6:0.4:1)

^a Sursele de lipaze: CaL-B- lipaza B din *Candida antarctica*, AK- lipaza din *Pseudomonas fluorescens*; ^b VTMOS (viniltrimetoxisilan), PhTMOS (feniltrimetoxisilan), MeTMOS (metiltrimetoxisilan), OcTMOS (ociltrimetoxisilan) și TMOS (tetrametoxisilan).

În scopul găsirii aplicațiilor posibile ale preparatelor de lipaze investigate în sinteza enzimatică a compușilor heteroaromatici îmbogățiti enantiomeric, s-au realizat screening-uri de biocatalizator și solvent. Prin urmare, reacțiile de transesterificare ale substraturilor selectate *rac-2a-i* (40 mM) s-au realizat inițial cu acetat de vinil, în absența solventului, în prezența lipazelor imobilizate. Întrucât natura solventului poate avea o influență semnificativă asupra selectivității și activității biocatalizatorilor, acilările enzimatică ale etanolilor racemici (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în prezența biocatalizatorilor optimi anterior selectați au fost testate în solvenți organici anhidri cu diferite polarități: *n*-hexan, toluen, diizopropil eter (DIPE), metil *terț*-butil eter (MTBE), acetonitril (ACN) și diclorometan. Performanța biocatalitică

a fost evaluată în fiecare caz utilizând trei parametri: conversia c , excesele enantiomerice (al substratului netransformat ee_S și al produsului format ee_P), și raportul enantiomeric E .

Câteva observații generale preliminare se pot desprinde din rezultatele screening-ului. Din rezultatele screening-ului de biocatalizator s-a observat că toate preparatele de lipaze sunt înalt enantioselective față de etanolii heteroaromatici racemici în acetat de vinil (ca agent de acilare și mediu de reacție), excepție făcând doar două preparate de L-AK, AK 1 TSC și AK 2 TSC în reacția de acilare a *rac-2b* ($E= 25-58$). Pe de altă parte, conversia reacțiilor a fost puternic influențată de structura substratului și de metoda de imobilizare. În plus, în cadrul screening-ului de solvent s-a observat în general că în timp ce selectivitățile au rămas ridicate, timpii de reacție au scăzut semnificativ față de experimentele desfășurate în absența solventului.

Cele mai bune rezultate obținute în procesele de EKR optimizate sunt prezentate succint pentru fiecare substrat în **Tabelul 2**.

Tabelul 2. *O*-acilarea *rac-2a-i* (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în *n*-hexan la 25 °C catalizată de lipaze^{a,b}

Nr. crt.	Substrat <i>rac-2a-i</i>	Biocatalizator	Timp de reacție (h)	ee_S^c (%)	c^d (%)
1	<i>rac-2a</i>	CaL-B 1 BSC	1	>99	50
		CaL-B Celită		>99	50
2	<i>rac-2b</i>	CaL-B 1 TS*	5	92 (± 1.6)	48 (± 0.5)
		CaL-B Celită		>99	50
3	<i>rac-2c</i>	AK 1 BS	21	86 (± 1.2)	46 (± 0.5)
4	<i>rac-2d</i>	CaL-B 1 TS*	19	94 (± 2.1)	49 (± 0.5)
		CaL-B Celită	2	92 (± 2.5)	48 (± 0.8)
5	<i>rac-2f</i>	AK 1 BS	8	>99	50
6	<i>rac-2g</i>	AK 1 BS	9	>99	50
7	<i>rac-2h</i>	CaL-B Celită	27	99 (± 0.5)	50
8	<i>rac-2i</i>	CaL-B 2 TSC	28	95 (± 2.2)	49 (± 0.8)

^a $ee_P > 99\%$, $E \gg 200$; ^b experimentele au fost realizate în triplicat și deviațiile standard față de medie sunt date între paranteze; ^c determinat din ariile peak-urilor cromatogramelor GC sau HPLC; ^d calculat cu formula $c = [ee_S / (ee_S + ee_P)]$.

4.1.2.3. Stabilitatea operațională a preparatelor de lipaze imobilizate în procese discontinue

Una din cerințele esențiale pentru un biocatalizator relevant din punct de vedere industrial este eficiența catalitică îndelungată. În acest sens, s-a studiat reutilizarea celor mai bune preparate de lipaze imobilizate în transesterificările enantioselective ale *rac-2a,c,d,g,i* cu acetat de vinil în *n*-hexan (**Figurile 1-4**). Fiecare reacție a fost repetată cu același preparat enzimatic până la 10 ori și a fost lăsată până la o conversie de ~50%, sau atâta timp cât preparatul și-a menținut activitatea și enantioselectivitatea. Între ciclurile de reacție catalizatorul a fost spălat de trei ori cu *n*-hexan anhidru și apoi imediat reutilizat.

După cum indică **Figura 1A-B**, lipazele imobilizate selectate au fost catalizatori eficienți în acilarea etanolului benztiofenic *rac-2a* în 10 cicluri de reacție consecutive. Lipaza adsorbită (CaL-B pe Celită) a demonstrat eficiență în reutilizare chiar mai mare decât enzima inclusă într-o matrice sol-gel binară conținând grupări pendante vinil (CaL-B 1 BSC).

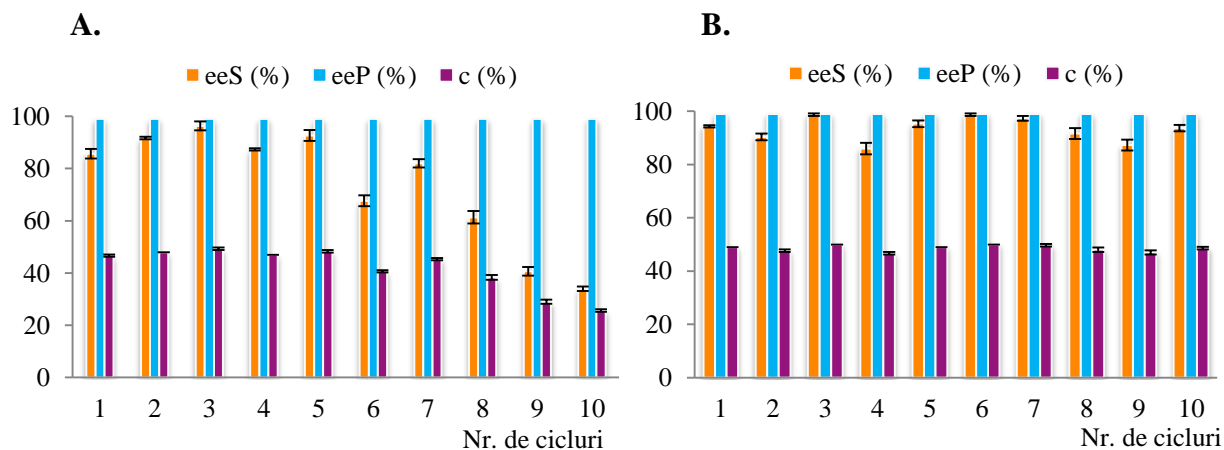


Figura 1. Capacitatea de recirculare a biocatalizatorilor selecționați în EKR a *rac-1*-(benzo[*b*]tiofen-2-il)etan-1-olului *rac-2a* (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în *n*-hexan la 25 °C utilizând: **A)** CaL-B 1 BSC și **B)** CaL-B pe Celită 545 (după 40 min timp de reacție). Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

Rezultatele experimentului de reutilizare pentru AK 1 BS în transesterificarea *rac-2c* (**Figura 2A**) arată o scădere semnificativă a conversiei de la 42 la 23% *c* în doar trei cicluri de acilare; totuși enantiopuritatea produsului a rămas maximă. De asemenea, acest catalizator, AK 1 BS, a fost supus testelor de reciclabilitate și în acetilarea *rac-2g* și în acest caz s-a observat

scăderea conversiei după 5 cicluri de reacție, de la 50 la 35% *c* (**Figura 2B**). Aceste rezultate indică faptul că reutilizabilitatea unui biocatalizator depinde de structura substratului.

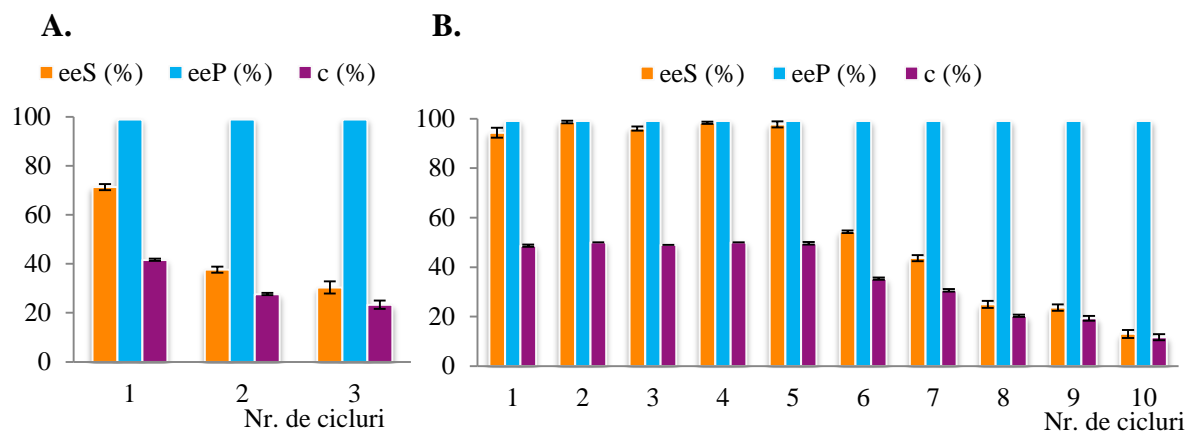


Figura 2. Capacitatea de recirculare a AK 1 BS în EKR a: **A)** *rac*-1-(benzofuran-2-il)etan-1-olului *rac*-2c (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în *n*-hexan la 25 °C (după 20 de ore timp de reacție) și **B)** *rac*-1-(10-etil-10H-fenotiazin-3-il)etan-1-olului *rac*-2g (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în *n*-hexan la 25 °C (după 8 ore timp de reacție). Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

Etanolul benzofuranic *rac*-2d, deși este un izomer de poziție al *rac*-2c, s-a observat că are un comportament diferit în procesul de EKR mediat de lipaze. În timp ce pentru *rac*-2c lipaza AK a fost cel mai eficient biocatalizator, pentru *rac*-2d CaL-B a fost mai adecvat, cel mai bun preparat imobilizat (CaL-B 1 TS*) demonstrând eficiență catalitică ridicată în timpul utilizării repetate (**Figura 3**).

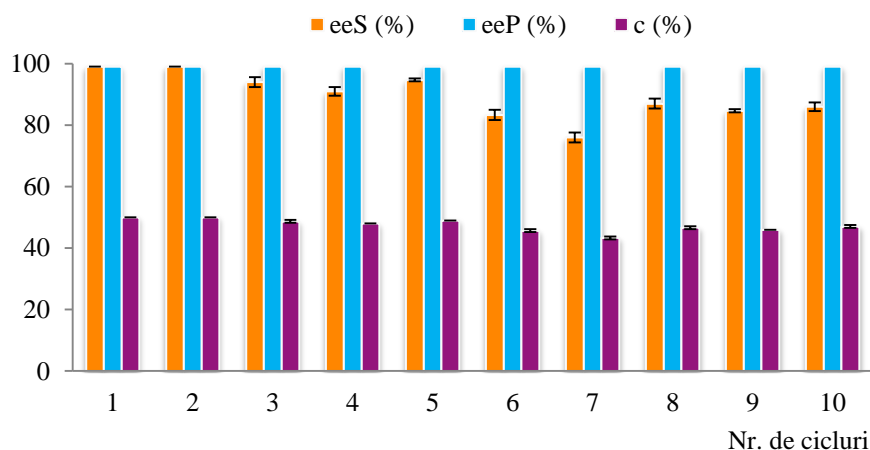


Figura 3. Capacitatea de recirculare a CaL-B 1 TS* în EKR a *rac*-1-(benzofuran-3-il)etan-1-olului *rac*-2d (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în *n*-hexan la 25 °C (după 20 de ore timp de reacție). Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

Stabilitatea operațională a unui preparat de lipază immobilizată obținut prin **Metoda 2** de immobilizare în sol-gel (CaL-B 2 TSC) a fost studiată în EKR a fenil-tiazolil alcoolului secundar *rac*-2i. Rezultatele prezentate în **Figura 4** indică faptul că acest preparat de CaL-B immobilizat nu constituie un candidat potrivit pentru utilizare multiplă, deși a demonstrat (în studiul de optimizare) eficiență catalitică și enantioselectivitate comparabile cu cele ale celor mai performante preparate de lipaze immobilizate prin **Method 1**. În acest caz s-a observat o scădere rapidă în performanța catalitică, întrucât conversia a scăzut de la 49 la 17% în al doilea ciclu.

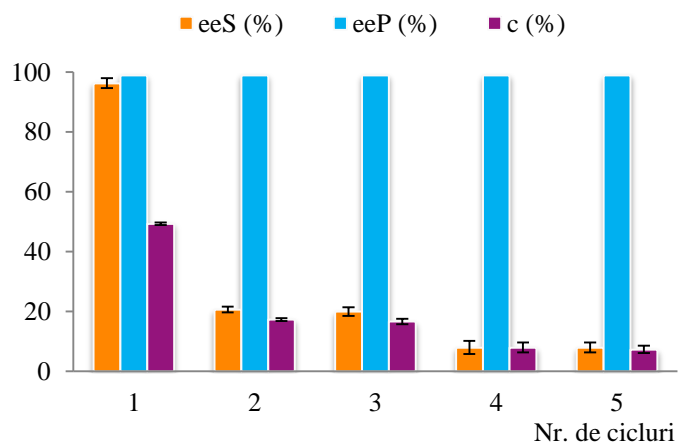


Figura 4. Capacitatea de recirculare a CaL-B 2 TSC în EKR a *rac*-1-(2-fenil-tiazol-4-il)-etanolului *rac*-**2i** (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) în *n*-hexan la 25 °C (după 28 de ore timp de reacție). Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

4.1.2.4. EKR mediată de lipaze a heteroariletanolilor racemici în sistem continuu utilizând reactoare în strat fix

Pentru creșterea eficienței proceselor de biotransformare investigate, un alt obiectiv al acestui studiu a fost testarea celor mai performante lipaze imobilizate în experimente în flux continuu utilizând reactoare în strat fix (50 × 2.1 mm). În acest sens, doi dintre biocatalizatorii eficienți deja selecționați, câte unul de la fiecare sursă de lipază - CaL-B 1 TS* și AK 1 BS – au fost investigați, în timp ce benzofuranil-etanolii *rac*-**2c,d** au fost aleși ca substraturi (**Figura 5**). Cei mai importanți parametri care influențează productivitatea unui proces în sistem continuu – temperatura, debitul și concentrația de substrat – au fost testați.

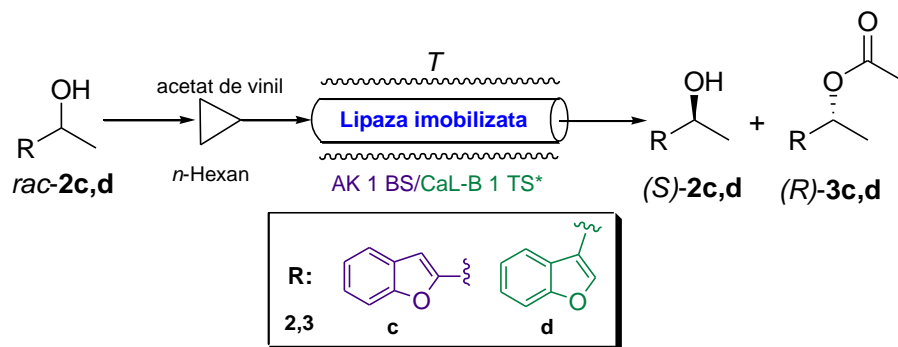


Figura 5. *O*-acilarea benzofuranil-etanolilor *rac*-**2c,d** mediată de lipaze în reactoare continue în strat fix

În primul set de experimente procesele de EKR în flux continuu au fost investigate la diferite temperaturi în domeniul 25 – 65 °C utilizând o concentrație de substrat de 10 mM la debitul de 0.5 mL min⁻¹ (**Figura 6A**). În ambele cazuri conversia a crescut cu temperatura; valoarea maximă a fost atinsă la 65 °C. Demn de remarcat este faptul că procesele EKR în flux continuu au fost înalt enantioselective ($E \gg 200$) pe domeniul de temperatură investigat (25 – 65 °C).

În continuare, pentru a mări conversia proceselor de EKR ale etanolilor *rac*-**2c,d**, debitul a fost redus treptat de la 0.5 la 0.1 mL min⁻¹, în timp ce temperatura a fost menținută la 65 °C. Se poate observa în **Figura 6B** că substraturile racemice au fost aproape complet rezolvate (48% și 50% conversie).

În încercarea de a crește productivitatea reactorului continuu în strat fix, s-au investigat concentrații de substrat în domeniul 10 – 100 mM la 65 °C la debitul de 0.1 (**Figura 6C**) și 0.5 mL min⁻¹. În ceea ce privește *O*-acilarea *rac*-**2d** mediată de CaL-B 1 TS* nu s-a observat o scădere semnificativă a conversiei pe domeniul de concentrații de substrat investigat la debitul de 0.1 mL min⁻¹. În cazul preparatului AK 1 BS, conversia acilării *rac*-**2c** a scăzut cu creșterea concentrației substratului, la 100 mM aceasta fiind jumătate din valoarea inițială. Ceea ce este important, excesele enantiomerice ale produșilor au fost maxime (>99%) chiar și la valori crescute ale concentrației de substrat.

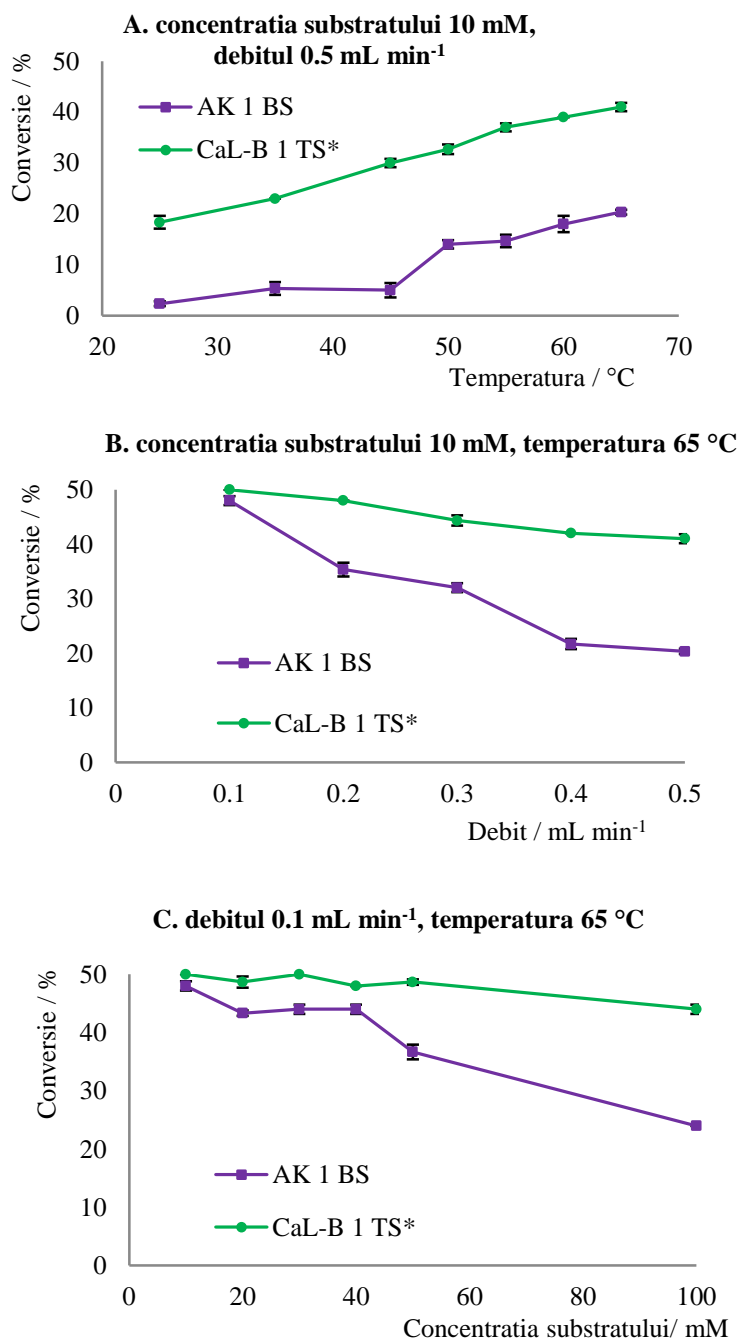


Figura 6. Efectul temperaturii (A), debitului (B) și al concentrației de substrat (C) asupra EKR în flux continuu a *rac-2c* (—□—) și *rac-2d* (—○—) cu acetat de vinil (0.75 și respectiv 3 echiv.) în *n*-hexan mediate de lipazele AK 1 BS (—□—) și respectiv CaL-B 1 TS* (—○—). Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

Productivitatea maximă obținută utilizând lipaza AK 1 BS în EKR a *rac-2c* a fost $37.4 \mu\text{mol de produs min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ la $65 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.5 mL min^{-1} și concentrația substratului de 100 mM , în timp ce productivitatea maximă a CaL-B 1 TS* în EKR a *rac-2d* a fost $157.5 \mu\text{mol de produs min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ la $65 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.5 mL min^{-1} și concentrația substratului de 50 mM .

Un alt obiectiv a fost studiul stabilității operaționale pe termen lung în sistem continuu a celor doi biocatalizatori selectați, utilizând o concentrație de substrat de 10 mM la debitul de 0.1 mL min^{-1} . Rezultatele au indicat faptul că lipaza imobilizată AK 1 BS și-a menținut aproape 95% din activitatea inițială la $55 \text{ }^\circ\text{C}$ după 100 h de operare continuă, în timp ce CaL-B 1 TS* a demonstrat o stabilitate și mai mare, deoarece nu s-a observat o scădere a activității după 100 h la $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura 7**). Și în acest caz enantioselectivitățile ambelor procese de EKR în flux continuu mediate de lipaze nu au fost alterate în timpul operării continue îndelungate a biocatalizatorilor.

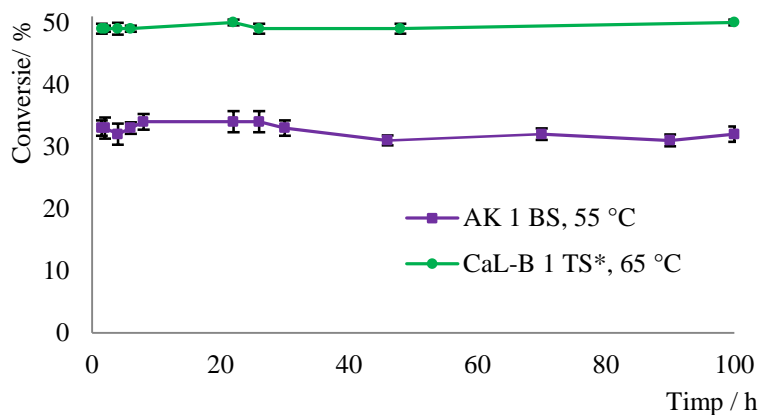


Figura 7. Stabilitatea operațională pe termen lung a preparatelor de lipaze imobilizate AK 1 BS și CaL-B 1 TS* în procesele de EKR în flux continuu a *rac-2c,d* (10 mM) cu acetat de vinil (0.75 și respectiv 3 echiv.) în *n*-hexan la $55 \text{ }^\circ\text{C}$ și respectiv $65 \text{ }^\circ\text{C}$ și debitul de 0.1 mL min^{-1} . Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

Au fost comparate de asemenea productivitățile sistemelor continue investigate cu cele obținute în sistem discontinuu utilizând vitezele de reacție specifice calculate cu Ecuatiile 5 și 6.

70

$$r_{discontinuu} = \frac{n_P}{t \times m_e} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{g}} \right] \quad (\text{Ecuția 5})$$

$$r_{continuu} = \frac{[P] \times f}{m_e} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{g}} \right] \quad (\text{Ecuția 6})$$

În cazul acilării *rac-2c* mediate de AK 1 BS s-a observat o diferență majoră între valorile vitezelor de reacție specifice obținute în sistem continuu și discontinuu, acest biocatalizator permițând atingerea unei productivități de ~4 ori mai mare în flux continuu ($r_{discontinuu} = 1.1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, $r_{continuu} = 4.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, la 48% conversie, 65 °C, concentrația substratului de 10 mM, 0.75 echiv. de acetat de vinil și debit de 0.1 mL min⁻¹). Pe de altă parte, pentru acilarea *rac-2d* catalizată de CaL-B 1 TS* s-au obținut productivități mai mari în ambele sisteme; totuși, viteza de reacție specifică calculată pentru sistemul continuu a fost de ~1.5 ori mai mare decât cea obținută în sistem discontinuu ($r_{discontinuu} = 6.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, $r_{continuu} = 9.8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, la 50% conversie, 65 °C, concentrația substratului de 10 mM, 3 echiv. de acetat de vinil și debit de 0.1 mL min⁻¹).

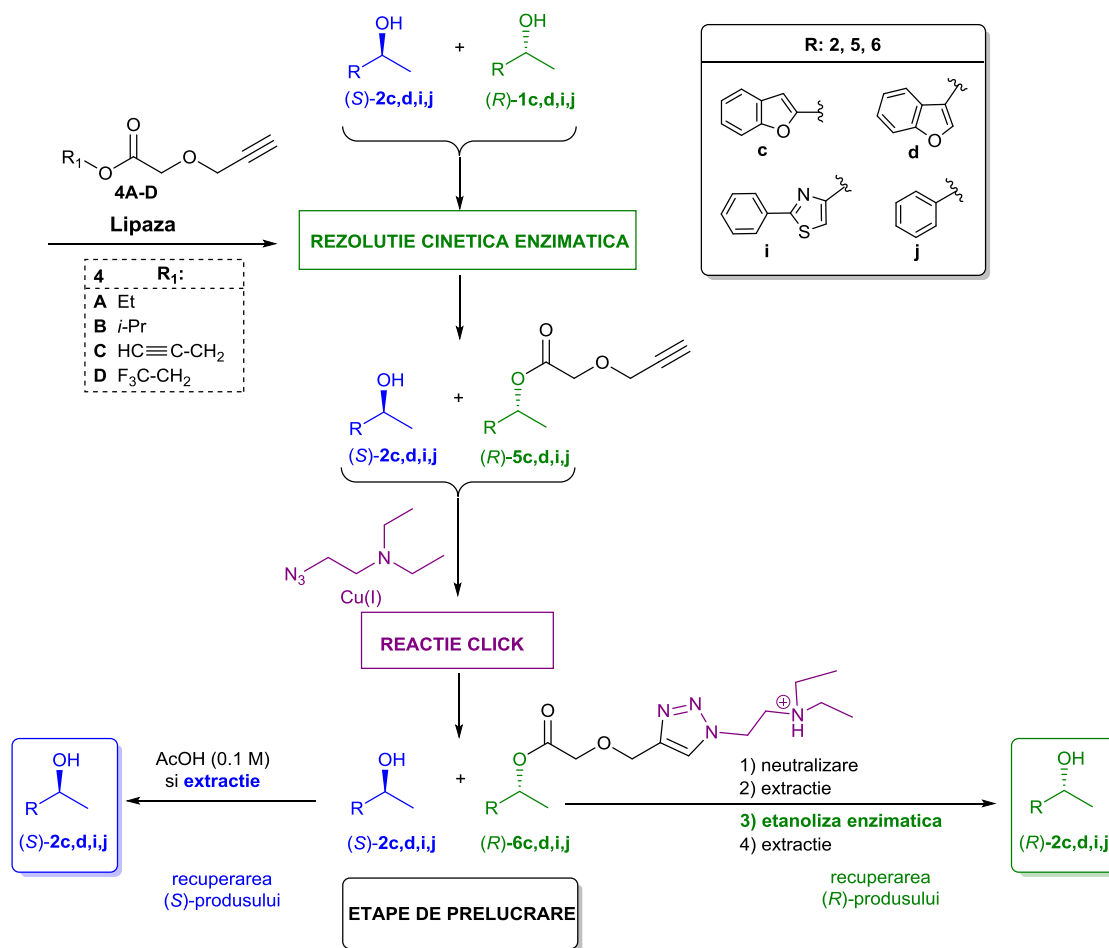
4.2. Strategie de separare bazată pe reacție click aplicată în rezoluția cinetică enzimatică a alcoolilor secundari (hetero)aromatici

4.2.1. Introducere (date din literatură)

4.2.2. Rezultate și discuție

Pentru a aplica strategia de separare a produșilor bazată pe reacție click în procesele de EKR a etanolilor (hetero)aromatici unul dintre componenții amestecului, esterul enantiopur format, trebuie să conțină o grupare alchinil sau azido. Prin urmare, pentru elaborarea unei proceduri de prelucrare a EKR, trebuie ales un reactiv potrivit care să îndeplinească două roluri: 1) să fie un agent de acilare eficient în etapa de EKR și 2) să poată forma un produs esteric care reacționează în CuAAC. Abordarea cea mai accesibilă utilizează 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetați ca agenți de acilare care duc la formarea unor esteri îmbogățiți enantiomeric reactivi în reacția click.

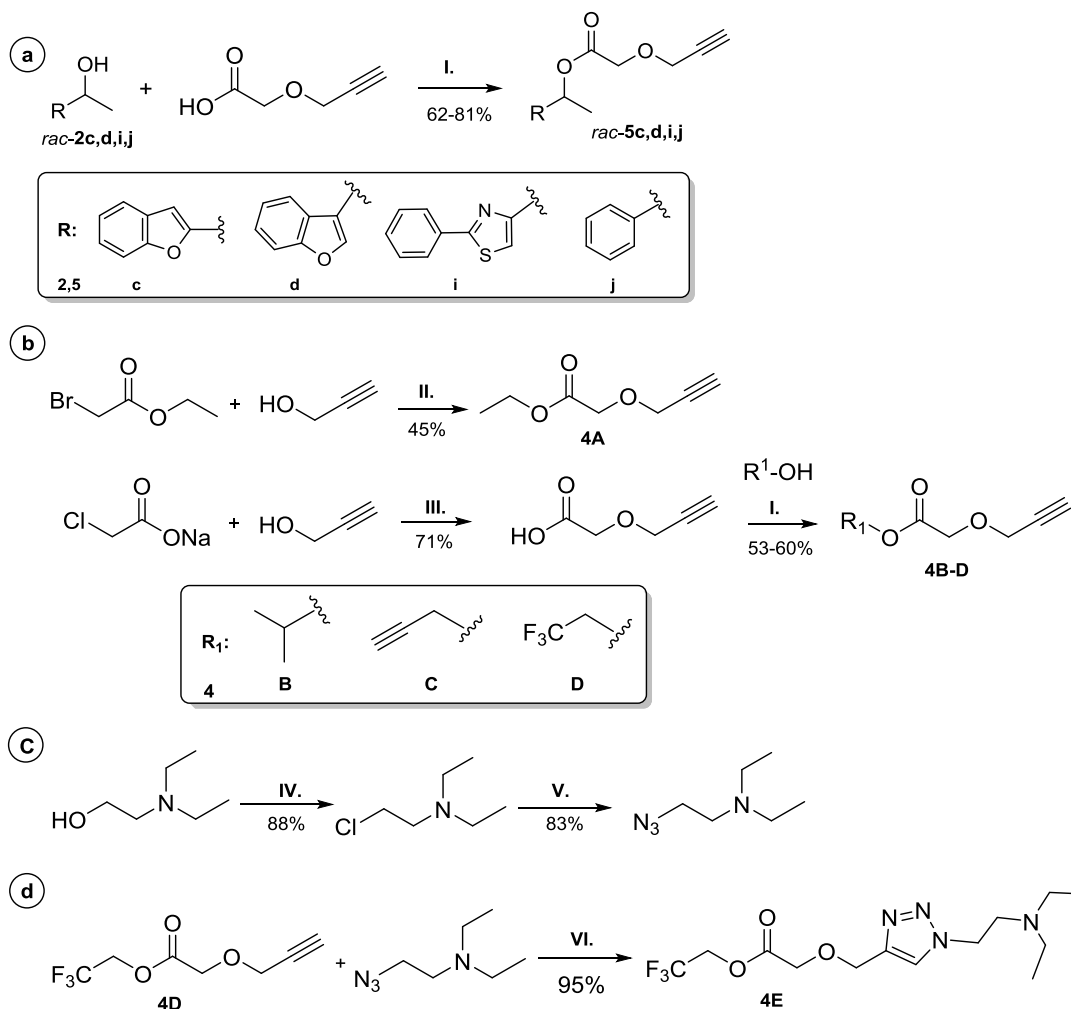
Conform acestei metodologii de separare a produșilor EKR, bazată pe chimia click, diverși 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetați **4A-D** au fost testați ca agenți de acilare pentru procesele enantioselective de KR mediate de lipaze ale unor (hetero)ariletanoli racemici *rac-2c,d,i,j*. Așa cum este prezentat în **Schema 2**, amestecul de reacție conținând enantiomerul netransformat al alcoolului [(*S*)-**2c,d,i,j**] și enantiomerul produsului având o grupare alchinil [(*R*)-**5c,d,i,j**] a fost reacționat cu o amină terțiară funcționalizată cu grupare azido, esterul fiind transformat cantitativ în aminoalchil-triazol ionizabil [(*R*)-**6c,d,i,j**]. Prin etape de ajustare de pH-extracție s-a realizat separarea ușoară și izolarea etanolilor (*S*)-**2c,d,i,j** și a triazolilor (*R*)-**6c,d,i,j** îmbogățiți enantiomeric fără ca enantiopuritatea lor să fie afectată. Ultima etapă constând în deprotejarea enzimatică blândă a produsului click (*R*)-**6c,d,i,j** a permis recuperarea enantiomerului reactiv al substratului (*R*)-**2c,d,i,j** cu enantiopuritate nealterată.



Schema 2. Separarea produșilor EKR asistată de reacție click

4.2.2.1. Sinteza chimică a 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetaților racemici *rac*-5c,d,i,j, a agenților de acilare 4A-E și a reactanților

Sinteza chimică a etanolilor aromatici *rac*-2c,d,i,j a fost prezentată anterior; 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetații racemici corespunzători *rac*-5c,d,i,j¹⁰², acidul 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetic și esterii acestuia - etil¹⁰³, izopropil, propargil și 2,2,2-trifluoroetil^{Error! Bookmark not defined.} **4A-D**, 2-azido-*N,N*-dietiletan-1-amina și esterul triazolic **4E** au fost sintetizați conform **Schemei 3**. Toți compușii au fost caracterizați prin spectroscopie ¹H și ¹³C-NMR și spectrometrie de masă.

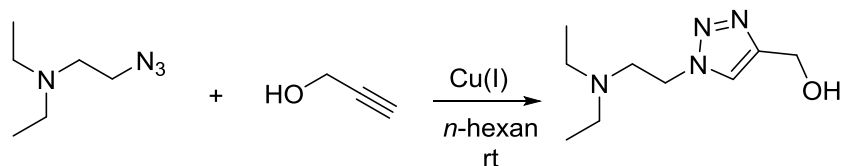


Schema 3. Sinteza chimică a **a)** esterilor racemici *rac-5c,d,i,j*, **b)** agenților de acilare **4A-D**, **c)** aminei terțiare funcționalizată cu grupare azido și a **d)** agentului de acilare triazolic **4E**. **Reactivi și condiții de reacție:** **I.** DCC, DMAP, CH₂Cl₂ anh., rt, 3 h; **II.** NaH, THF anh., Ar, rt, 12 h; **III.** MTBE, NaOH, TBAB, rt; **IV.** SOCl₂, CHCl₃, 0 °C - reflux, 4 h; **V.** NaN₃, DI H₂O, 80 °C; **VI.** CuI, *n*-hexan, rt, 12 h.

4.2.2.2. Optimizarea sursei de Cu(I) pentru reacția click

În scopul găsirii condițiilor optime pentru reacțiile click ale compușilor investigați, în continuare s-a realizat un test preliminar pentru reacția click și optimizarea sursei de Cu(I) pe reacția click model dintre alcoolul propargilic și 2-azido-*N,N*-dietiletan-1-amina în solvenți

nepolari (**Schema 4**). Dintre catalizatorii testați [CuI, CuI(PPh₃) și Cu₂SO₄×5H₂O + N₂H₄×H₂O], CuI a fost selectat drept cea mai eficientă sursă de cupru(I).



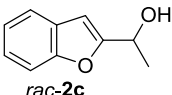
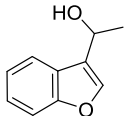
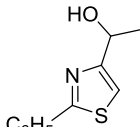
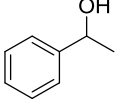
Schema 4. Studiul preliminar de optimizare pe reacția click model

4.2.2.3. Optimizarea reacției de *O*-acilare catalizată de lipaze a (hetero)ariletanolilor racemici *rac*-**2c,d,i,j** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetații **4A-E**

Pentru a obține compuși îmbogății enantiomeric cu conversii ridicate, transesterificările enantioselective catalizate de lipaze ale *rac*-**2c,d,i,j** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetații **4A-D** au fost investigate în diferiți solvenți organici la scară analitică. Lipaza B din *Candida antarctica* sub forma preparatului disponibil comercial Novozyme 435 (CaL-B adsorbit pe rășină acrilică macroporoasă, anterior descoperită ca fiind eficientă în *O*-acilarea enantioselectivă a (hetero)ariletanolilor racemici *rac*-**2d,i,j** cu esteri vinilici,^{Error! Bookmark not defined.} a fost selectată ca biocatalizator pentru procesul de EKR/separare asistată de reacție click al acestor substraturi. Similar, lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK) identificată ca fiind optimă pentru transesterificarea 1-(benzofuran-2-il)etan-1-olului racemic, *rac*-**2c**, cu acetat de vinil^{Error! Bookmark not defined.} a fost aleasă ca biocatalizator pentru studiul de față. S-au testat diferiți solvenți organici, utilizați în mod frecvent în reacții mediate de lipaze, care solubilizează atât substraturile cât și produșii: *n*-hexan, diclorometan, acetonitril (ACN), tetrahidrofuran (THF), metil *terț*-butil eter (MTBE), diizopropil eter (DIPE), ciclohexan și toluen.

Inițial, s-au studiat la scară analitică transesterificările enzimatică ale *rac*-**2c,d,i,j** folosind 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil **4A** ca agent de acilare în solvenții organici selectați pentru a determina mediul optim de reacție pentru fiecare substrat în parte (**Tabelul 3**).

Tabelul 3. Screening-ul de solvent pentru acilările enzimaticice ale *rac-2c,d,i,j* (10 mM) cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil **4A** (1 echiv.) la 30 °C și raport substrat:biocatalizator 1:1, w/w^a

Compus								
	<i>c</i> _{rac-2c} ^{b,c} (%)	<i>ee</i> _{5c} ^{b,c} (%)	<i>c</i> _{rac-3d} ^{d,e} (%)	<i>ee</i> _{5d} ^{d,e} (%)	<i>c</i> _{rac-2i} ^{e,f} (%)	<i>ee</i> _{5i} ^{e,f} (%)	<i>c</i> _{rac-2j} ^{e,g} (%)	<i>ee</i> _{5j} ^{e,g} (%)
<i>n</i> -Hexan	17 (± 1.4)	>99	10 (± 1.6)	>99	n.d.	<5	17 (± 0.8)	>99
CH ₂ Cl ₂	n.d.	n.d.	11 (± 1.4)	>99	15 (± 0.5)	>99	n.d.	n.d.
ACN	n.d.	n.d.	18 (± 1.4)	>99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
THF	n.d.	n.d.	15 (± 0.5)	>99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MTBE	n.d.	n.d.	18 (± 0.9)	>99	n.d.	<5	n.d.	n.d.
DIPE	n.d.	n.d.	21 (± 0.9)	>99	4 (± 0.5)	30 (± 1.2)	n.d.	n.d.
Ciclohexan	n.d.	n.d.	30 (± 1.2)	>99	25 (± 1.4)	39 (± 1.2)	16 (± 0.5)	>99
Toluen	n.d.	n.d.	26 (± 0.8)	>99	18 (± 2.1)	86 (± 2.1)	n.d.	n.d.

^a experimentele au fost realizate în triplicat și deviațiile standard față de medie sunt date între paranteze; ^b după 120 h; ^c Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK); ^d după 15 h; ^e Lipaza B din *Candida antarctica* (Novozyme 435); ^f după 130 h; ^g după 4 h; n.d. nedetectat.

S-a remarcat faptul că atât Novozyme 435 cât și L-AK au fost înalt enantioselective în toate EKR ale *rac-2c,d,j* (*ee*_p > 99%) oferind conversii detectabile, în timp ce pentru *rac-2i* s-a obținut o puritate ridicată a produsului doar în CH₂Cl₂. Cu toate acestea, utilizând esterul etilic **4A** ca donor de acil a condus la conversii nesatisfăcătoare, valoarea maximă, 30% *c*, fiind atinsă după 15 ore în cazul *rac-2d*. Din păcate, mărirea timpului de reacție și investigarea efectului unor parametri precum temperatura, cantitatea de donor de acil și de biocatalizator nu au condus la o îmbunătățire considerabilă a conversiilor, ceea ce poate fi explicat prin formarea de etanol care determină reversibilitatea reacției de transesterificare.

În consecință, alți trei esteri **4B-D** [esterii izopropilic, propargilic și 2,2,2-trifluoroetilic ai acidului 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetic] au fost testați ca donori de acil în procesele de EKR a etanolilor racemici utilizând solvenții optimi identificați (*n*-hexan pentru *rac-2c,j*, ciclohexan pentru *rac-2d* și CH₂Cl₂ pentru *rac-2i*). Realizând acilările enzimaticice ale *rac-2c,d,i,j* cu esterii **4B-D** (Figura 8), se eliberează alcooli cu impedimente sterice sau slab nucleofili cu reactivitate scăzută, deplasând astfel echilibrul reacțiilor de esterificare spre formare de produs. Esterul 2,2,2- trifluoroetilic **4D** a dovedit eficiență ridicată ca donor de acil pentru toate

substraturile studiate *rac-2c,d,i,j*, permițând atingerea de conversii maxime sau aproape maxime ($c = 48\text{--}50\%$ după 7-90 h) fără scăderea enantioselectivității ($ee_P > 99\%$ în toate cazurile).

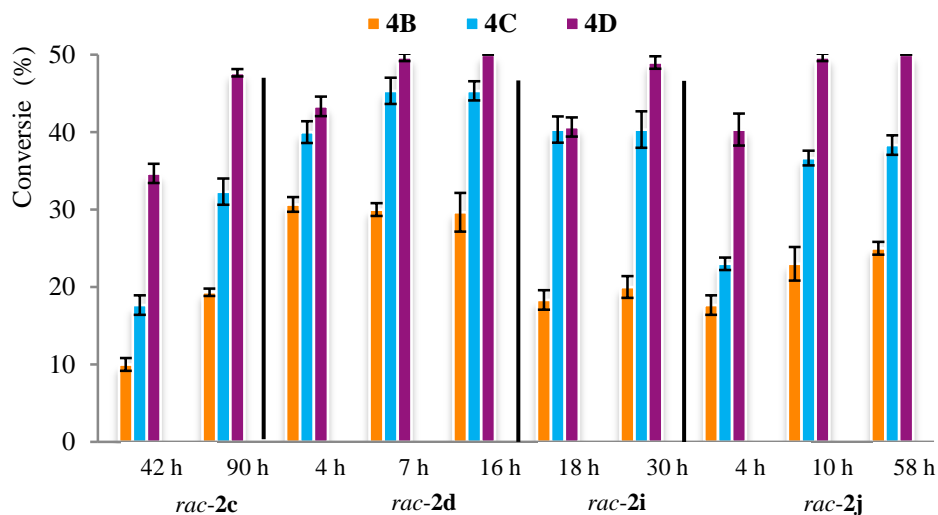


Figura 81. Screening-ul de donor de acil **4B-D** (1 echiv.) în rezoluțiile cinetice ale *rac-2c,d,i,j* (10 mM) mediate de Novozyme 435 (pentru *rac-2d,i,j*) sau L-AK (pentru *rac-2c*) în solvenții optimi la 30 °C și raport substrat:biocatalizator 1:1, w/w; $ee_P > 99\%$ în toate cazurile. Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie.

Esterul 2-((1-(2-(diethylamino)etil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil **4E** (Schema 3d) a fost de asemenea testat ca potențial donor de acil în acilarea enzimatică a substratului model *rac-2j* dar s-a dovedit a fi fără succes.

4.2.2.4. Elaborarea protocolului bazat pe reacție click pentru separarea produșilor EKR

În scopul elaborării protocolului bazat pe reacție click pentru separarea produșilor rezoluției cinetice enzimatică s-au utilizat amestecuri de compuși racemici *rac-2c,d,i,j* și *rac-5c,d,i,j* care mimează compoziția de la finalul EKR, urmărind metodologia descrisă în Schema 2. Astfel, etanolii *rac-2c,d,i,j* și triazolii *rac-6c,d,i,j* au fost izolați utilizând metode extractive cu randamente de recuperare $>94\%$ pentru fiecare component.

4.2.2.5. Izolarea (S)- și (R)-(hetero)ariletanolilor îmbogățți enantiomeric 2c,d,i,j prin procesul în tandem O-acilare enzimatică/separare asistată de reacție click/alcooliză enzimatică

Pentru izolarea ambilor enantiomeri ai etanolilor chirali (hetero)aromatici **2c,d,i,j** cu purități ridicate, întreaga procedură s-a repetat la scară preparativă păstrând condițiile de reacție optime găsite la scară analitică dar utilizând o concentrație de substrat de 30 de ori mai mare. Enantiomerii reactivi ai etanolilor (*R*)-**2c,d,i,j** au fost recuperați prin alcooliza catalizată de lipază a triazolilor îmbogățți enantiomeric (*R*)-**6c,d,i,j**. Forma înalt stabilă și termotolerantă a lipazei B din *C. antarctica* obținută prin imobilizarea covalentă de nanotuburi de carbon (CaL-B-SWCNT)¹⁰⁵ s-a dovedit a fi un biocatalizator eficient pentru alcooliza (*R*)-**6c,d,i,j**, care a permis recuperarea alcoolilor (*R*)-**2c,d,i,j** din racemați cu randamente bune (87-91%) și excese enantiomerice maxime (Tabelul 4).

Tabelul 4. Produși izolați și intermediari în cursul procesului în tandem de KR mediat de lipaze/separare asistată de reacție click/alcooliză enzimatică

Enantiomer nereactiv	Randament ^a (%)	ee (%)	Produs click	Randament ^a (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{27b}$	Enantiomer reactiv	Randament ^a (%)	ee (%)
(<i>S</i>)- 2c	96	93	(<i>R</i>)- 6c	94	>99	+76.3	(<i>R</i>)- 2c	88	>99
(<i>S</i>)- 2d	97	>99	(<i>R</i>)- 6d	95	>99	+13.9	(<i>R</i>)- 2d	90	>99
(<i>S</i>)- 2i	96	97	(<i>R</i>)- 6i	94	>99	+63.2	(<i>R</i>)- 2i	87	>99
(<i>S</i>)- 2j	97	>99	(<i>R</i>)- 6j	96	>99	+48	(<i>R</i>)- 2j	91	>99

^a determinat după separarea produșilor EKR; 100% randament teoretic pentru un enantiomer corespunde la 50% din racemat;

^b $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ în acetonitril

Pentru a demonstra fezabilitatea acestei noi metodologii, întreaga procedură a fost repetată în aceleași condiții la scară de grame pentru 1-feniletan-1-olul racemic *rac*-**2j** (1.5 g). S-a observat că activitatea și selectivitatea biocatalizatorilor utilizați au rămas neschimbate, în schimb randamentele de izolare pentru (*S*)-**2j**, (*R*)-**6j** și (*R*)-**2j** au crescut (>99% pentru fiecare).

4.2.2.6. *O*-acilarea *rac*-1-feniletan-1-olului *rac*-2j cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil 4D mediată de lipaza CaL-B-SWCNT în flux continuu

Cu scopul de a mări eficiența producerii (hetero)ariletanolilor la scară mare prin metodologia nou dezvoltată, în continuare, agentul de acilare nou și eficient **4D** a fost investigat în *O*-acilarea enzimatică în flux continuu a compusului model, 1-feniletan-1-olul racemic *rac*-2j, utilizând un reactor în strat fix (30×4.6 mm, **Figura 9**). Preparatul enzimatic CaL-B-SWCNT stabil și termotolerant a fost ales ca biocatalizator întrucât a demonstrat anterior stabilitate operațională ridicată. Error! Bookmark not defined.

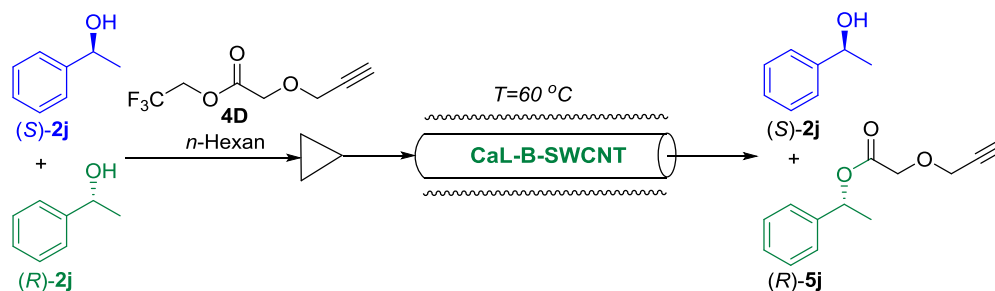


Figura 92. Reacția de transesterificare în flux continuu a *rac*-1-feniletan-1-olului *rac*-2j cu 2-(prop-2-in-1-il-oxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil **4D** în *n*-hexan la 60 °C într-un reactor în strat fix

Inițial, reacția de acilare în sistem continuu a fost studiată utilizând o concentrație de substrat de 10 mM și 0.75 echiv. agent de acilare **4D** la 60 °C, la debite în domeniul 0.1 – 0.5 mL min⁻¹. S-a observat că valoarea maximă a conversiei atinsă în cadrul acestui experiment a fost de 42% la 0.1 mL min⁻¹. În consecință, pentru a îmbunătăți conversia reacției, s-au realizat experimente identice utilizând cantități mai mari de donor de acil **4D** (2, 3 și 4 echiv.).

Rezultatele sunt redată în **Figura 10**. Se remarcă faptul că raportul molar substrat:agent de acilare influențează conversia reacției enzimatică în flux continuu. Când s-au utilizat 4 echiv. de donor de acil nu s-au observat modificări semnificative ale conversiei de la 0.5 la 0.1 mL min⁻¹ (48-50%), de aceea în continuare s-a utilizat această cantitate de agent de acilare.

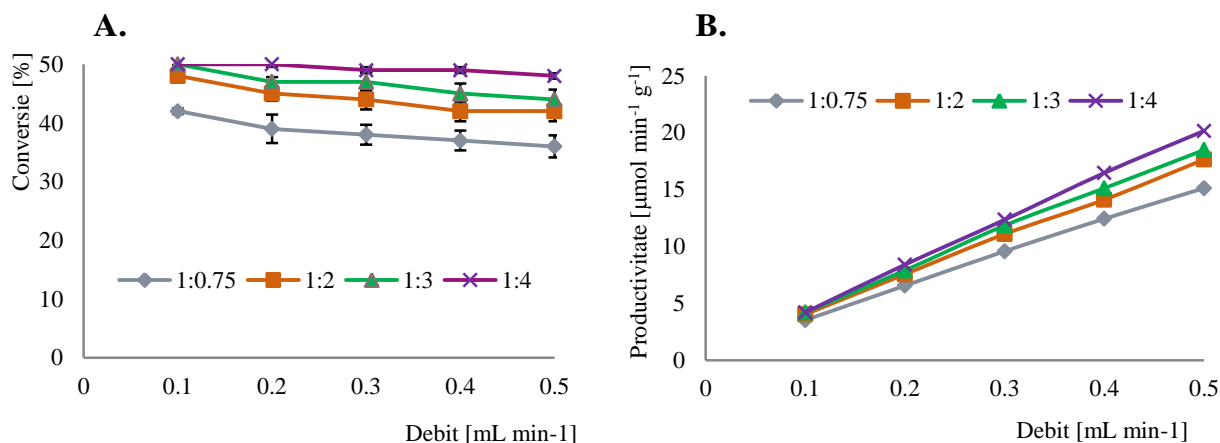


Figura 30. Influența raportului molar substrat:donor de acil asupra conversiei (A) și productivității (B) rezoluției cinetice în flux continuu catalizată de CaL-B-SWCNT a *rac-2j* (10 mM) cu 2-(prop-2-in-1-il-oxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil **4D** în *n*-hexan la 60 °C. Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie. Productivitatea a fost calculată utilizând valorile medii ale conversiilor.

În continuare, având scopul de a crește productivitatea sistemului biocatalitic continuu, s-au testat diferite concentrații de substrat la 60 °C folosind 4 echiv. de agent de acilare **4D** la 0.1 și 0.5 mL min⁻¹ (Figura 11). După cum era de așteptat, productivitatea a crescut cu creșterea concentrației de substrat, valoarea maximă obținându-se la 100 mM concentrație de substrat și un debit de 0.5 mL min⁻¹ (88.2 μmol min⁻¹ g⁻¹). Important de menționat este faptul că și la concentrația maximă de substrat (100 mM) sistemul a permis atingerea unei conversii foarte bune a *rac-2j* (45% la 0.1 mL min⁻¹).

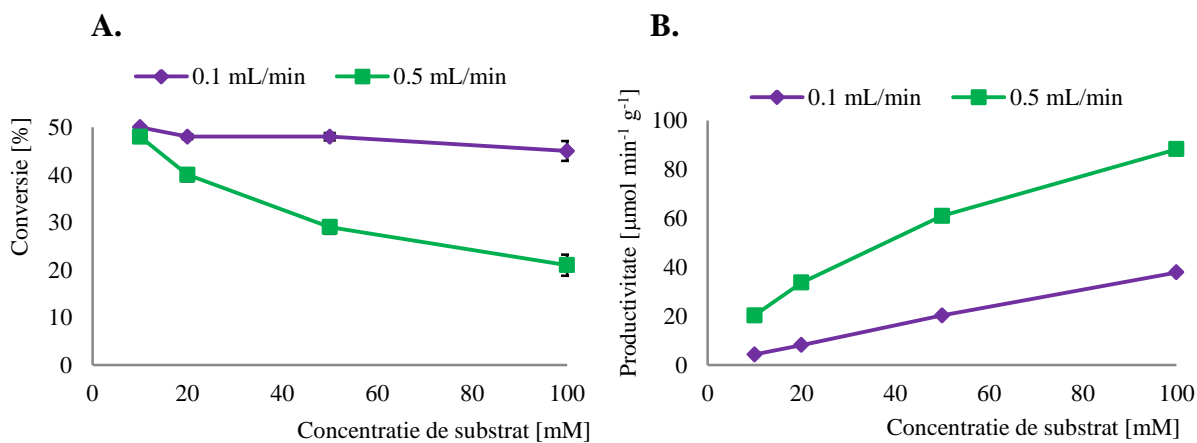


Figura 41. Influența concentrației de substrat asupra conversiei (A) și productivității (B) rezoluției cinetice în flux continuu catalizată de CaL-B-SWCNT a *rac-2j* (10 mM) cu 2-(prop-2-in-1-il-oxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil **4D** în

n-hexan la 60 °C. Barele de eroare reprezintă deviațiile standard față de medie. Productivitatea a fost calculată utilizând valorile medii ale conversiilor.

Alt obiectiv al acestui studiu a fost compararea productivităților obținute în sistem continuu și discontinuu pentru reacția de acilare a *rac*-**2j** cu **4D** mediată de CaL-B-SWCNT. Preparatul imobilizat CaL-B-SWCNT a demonstrat productivitate mult mai mare în sistem continuu față de sistemul discontinuu ($r_{discontinuu} = 1.0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, $r_{continuu} = 17.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, la 42% conversie, 60 °C, 10 mM concentrație de substrat, 2 echiv. de donor de acil **4D** și debit de 0.5 mL min⁻¹), demonstrând superioritatea proceselor în flux continuu față de cele discontinue.

Capitolul 5. Partea experimentală (date experimentale)

Capitolul 6. Concluzii generale

Studiile desfășurate în cadrul acestei teze prezintă optimizarea proceselor de rezoluție cinetică mediate de lipaze ale unor alcooli secundari (hetero)aromatici sub aspecte ce țin de stabilitatea și productivitatea biocatalizatorilor și separarea amestecurilor de la finalul rezoluțiilor cinetice.

Lipaza B din *Candida antarctica* și lipaza din *Pseudomonas fluorescens* immobilizate prin includere în sol-gel au fost aplicate cu succes în EKR a nouă etanoli heteroaromatici. Stabilitatea și productivitatea biocatalizatorilor au fost investigate atât în procese discontinue cât și în procese continue. În condiții de operare în flux continuu biocatalizatorii testați (AK 1 BS și CaL-B 1 TS*) au demonstrat productivitate superioară în procesele de EKR a benzofuranil-etanolilor racemici în comparație cu operarea în sistem discontinuu. În plus, ambii biocatalizatori au fost foarte stabili sub operare continuă îndelungată (100 h) la temperaturi ridicate (55 sau 65 °C), întrucât mai mult de 95% din activitatea inițială a fost păstrată, deși la reutilizarea în procese discontinue doar CaL-B 1 TS* a demonstrat stabilitate remarcabilă (mai mult de 10 reutilizări în EKR a *rac-2d*), AK 1 BS manifestând reciclabilitate modestă (aprox. 55% activitate enzimatică după trei cicluri de reacție în EKR a *rac-2c*). Aceste rezultate demonstrează în mod evident eficiența superioară a sistemelor în flux continuu.

În plus, s-a dezvoltat o metodologie nouă care combină rezoluția cinetică eficientă mediată de lipaze a (hetero)ariletanolilor cu o procedură de prelucrare blândă și selectivă bazată pe reacții click, care a permis separarea amestecurilor de reacție de la finalul KR și recuperarea ambilor enantiomeri ai alcoolilor secundari cu randamente bune și purități optice excelente, evitând astfel separarea cromatografică laborioasă și scumpă. Strategia propusă utilizează 2-(prop-2-in-1-il-oxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil ca agent de acilare eficient în procesele de EKR a alcoolilor secundari *rac-2c,d,i,j*, obținându-se (hetero)ariletii 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetați enantiopuri (*R*)-**5c,d,i,j** care în continuare reacționează cu o amină terțiară funcționalizată cu grupare azido în prezență de CuI cu formarea derivaților triazolici (*R*)-**6c,d,i,j**. Etanolii îmbogați enantiomeric (*S*)-**2c,d,i,j** sunt izolați de triazolii ionizabili printr-o simplă extracție. Etanoliza blândă, mediată

de un preparat de lipază imobilizată extrem de stabil și activ (CaL-B imobilizat covalent pe nanotuburi de carbon) oferă în final formele enantiomeric opuse ale etanolilor, (*R*)-**2c,d,i,j**.

Posibilitatea de a extinde această metodologie la scară mare a fost demonstrată pentru compusul model *rac*-1-feniletan-1-ol *rac*-**2j** într-un proces discontinuu la scară de grame dar și în procese continue utilizând preparatul de lipază imobilizată covalent CaL-B-SWCNT într-un reactor în strat fix pentru EKR a *rac*-**2j** cu 2-(prop-2-in-1-il-oxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil **4D**, demonstrând productivitate de 17 ori mai mare decât sistemul discontinuu.

Referințe bibliografice

- ¹ K. M. Koeller și C.-H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232-240.
- ² A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts și B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268.
- ³ A. Pellis, S. Cantone, C. Ebert, și L. Gardossi, *New Biotechnol.* **2018**, *40*, 154-169.
- ⁴ U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543-547.
- ⁵ A. M. Klivanov, *Nature* **2001** *409*, 241-246.
- ⁶ S. Riva, *Exploiting Enzyme Chemoselectivity și Regioselectivity*, in *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media* (G. Carrea și S. Riva), Wiley, **2008**, 146-167.
- ⁷ A. Goswami și J. D. Stewart, *Organic Synthesis Using Biocatalysts*, Academic Press, Amsterdam, **2016**.
- ⁸ P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser și R. Miller, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 237-250.
- ⁹ R. D. Schmid și R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633.
- ¹⁰ M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145-150.
- ¹¹ K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* (23), 5004-5010.
- ¹² A. Ghanem, *Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates: a versatile method for the separation of enantiomers*, in *Enantiomer Separation Fundamentals și Practical Methods* (F. Toda), Springer Netherlșis, **2004**, 193-230.
- ¹³ L. T. Kanerva și A. Liljebblad, *Transesterification – Biological*, in *Encyclopedia of Catalysis*, Wiley, **2010**, doi: 10.1002/0471227617.eoc197
- ¹⁴ K. Faber și S. Riva, *Synthesis* **1992**, *10*, 895-910.
- ¹⁵ V. Farina, J. T. Reeves, C. H. Senanayake și J. J. Song, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2734-2793.
- ¹⁶ R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport și L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

-
- ¹⁷ P. Adlercreutz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6406-6436.
- ¹⁸ J. M. Guisán, *Immobilization of enzymes și cells*, in *Methods in biotechnology*, vol. 22, Humana Press, New York, **2006**.
- ¹⁹ L. Cao, *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications și design*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- ²⁰ R. A. Sheldon și S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235.
- ²¹ C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernşiez-Lorente, J. M. Guisan și R. Fernşiez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451-1463.
- ²² R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.
- ²³ U. Hanefeld, L. Gardossi și E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453-468.
- ²⁴ O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues și R. Fernşiez-Lafuente, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33(5)*, 435-456.
- ²⁵ M. L. E. Gutarra, L. S. M. Mirşia și R. O. M. A. de Souza, *Chapter. 4 Enzyme Immobilization for Organic Synthesis in Organic Synthesis Using Biocatalysis* (A. Goswami și J. D. Stewart), Academic Press, Amsterdam, **2016**, p. 99-126.
- ²⁶ M. M. Zheng, Y. Lu, L. Dong, P. M. Guo, Q. C. Deng, W. L. Li, Y. Q. Feng și F. H. Huang, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 141-146.
- ²⁷ V. V. Pace, J. V. Sinisterra și A. R. Alcántara, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2384-2408.
- ²⁸ M. T. Smith, J. C. Wu, C. T. Varner și B. C. Bundy, *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29(1)*, 247-254.
- ²⁹ J. C. Y. Wu, C. H. Hutchings, M. J. Lindsay, C. J. Werner și B. C. Bundy, *J. Biotechnol.* **2015**, *193*, 83-90.
- ³⁰ M. T. Reetz, A. Zonta și J. Simpelkamp, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 301-303.
- ³¹ M. T. Reetz, A. Zonta și J. Simpelkamp, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 527-534.
- ³² E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6213-6222.
- ³³ C.-H. Lee, T.-S. Lin și C.-Y. Mou, *Nano Today* **2009**, *4*, 165-179.

-
- ³⁴ M. T. Reetz, P. Tielmann, W. Wiesenhofer, W. Konen și A. Zonta, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 717-728.
- ³⁵ P. Tielmann, H. Kierkels, A. Zonta, A. Ilie și M. T. Reetz, *Nanoscale* **2014**, *6*, 6220-6228.
- ³⁶ D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, A. Gellért, G. Marosi, S. Kemény și L. Poppe, *Green Chem.* **2017**, *19(16)*, 3927-3937.
- ³⁷ G. Jas și A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5708-5723.
- ³⁸ I. Eş, J. D. G. Vieira și A. C. Amaral, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99(5)*, 2065-2082.
- ³⁹ M. P. Kamble și G. D. Yadav, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56(7)*, 1750-1757.
- ⁴⁰ J. C. Thomas, B. B. Aggio, A. R. M. de Oliveira și L. Piovan, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 5964-5970.
- ⁴¹ I. Itabaiana Jr, L. S. M. Mirşia și R. O. M. A. de Souza, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85-86*, 1-9.
- ⁴² A. Radadiya și A. Shah, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 356-376.
- ⁴³ S. G. Dastidar, J.E. Kristiansen, J. Molnar și L. Amaral, *Antibiotics* **2013**, *2*, 58-72.
- ⁴⁴ J. Konstantinović, M. Videnović, J. Sribljanović, O. Djurković-Djaković, K. Bogojević, R. Sciotti și B. Šolaja, *Molecules* **2017**, *22*, 343-359.
- ⁴⁵ M. T. Chhabria, S. Patel, P. Modi și P. S. Brahmksatriya, *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16(26)*, 2841-2862.
- ⁴⁶ A. Pellis, S. Cantone, C. Ebert și L. Gardossi, *New Biotechnol.* **2018**, *40*, 154-169.
- ⁴⁷ P. Dwivedee, J. Bhaumik, S. K. Rai, J. K. Laha și U. C. Banerjee, *Bioresource Technol.* **2017**, *239*, 464-471.
- ⁴⁸ T. Siódmiak, M. Ziegler-Borowska și M. P. Marszałł, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *94*, 7-14.
- ⁴⁹ A. C. Mathpati, V. K. Vyas și B. M. Bhanage, *J. Biotechnol.* **2017**, *262*, 1-10.
- ⁵⁰ V. M. M. Silva, J. Bassut, I. Ivaldo Jr., S. P. de Souza, M. L. G. Estrada, L. S. M. Mirşia, R. O. M. A. de Souza, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 102409-102415.

-
- ⁵¹ A. S. de Mirșia, M. V. de M. Silva, F. C. Dias, S. P. de Souza, R. A. C. Leão și R. O. M. A. de Souza, *React. Chem. Eng.* **2017**, *2*, 375-381.
- ⁵² P. Falus, Z. Boros, P. Kovács, L. Poppe și J. Nagy, *J. Flow Chem.* **2014**, *4(3)*, 125-134.
- ⁵³ A. Tomin, G. Hornyánszky, K. Kupai, Z. Dorkó, L. Üрге, F. Darvas și L. Poppe, *Process Biochem.* **2010**, *45*, 859-865.
- ⁵⁴ C. Paizs, M. I. Toșa, V. Bódai, Gy. Szakács, I. Kmech, B. Simándi, C. Majdik, L. Novák, F. D. Irimie și L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1943-1949.
- ⁵⁵ M. I. Toșa, S. Pilbák, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, Gy. Szakács, L. Novák, F. D. Irimie și L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1844-1852.
- ⁵⁶ J. Brem, M. I. Toșa, C. Paizs, A. Munceanu, D. Matković-Čalogović și F. D. Irimie, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1993-1998.
- ⁵⁷ J. Brem, S. Pilbák, C. Paizs, G. Bánoczi, F. D. Irimie, M. I. Toșa și L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 916-923.
- ⁵⁸ D. Hapău, J. Brem, M. Moisă, M. I. Toșa, F. D. Irimie și V. Zaharia, *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **2013**, *94*, 88-94.
- ⁵⁹ Z. Boros, P. Falus, D. Weiser, M. Oláh, G. Hornyánszky, J. Nagy și L. Poppe, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85-86*, 119-125.
- ⁶⁰ G. Hellner, Z. Boros, A. Tomin și L. Poppe, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2481-2491.
- ⁶¹ A. Cimporescu, A. Todea, V. Badea, C. Paul și F. Péter, *Process Biochem.* **2016**, *51*, 2076-2083.
- ⁶² A. Todea, P. Borza, A. Cimporescu, C. Paul și F. Péter, *Catal. Today* **2018**, *306*, 223-232.
- ⁶³ A. Ursoiu, C. Paul, T. Kurtán și F. Péter, *Molecules* **2012**, *17*, 13045-13061.
- ⁶⁴ A. Tomin, D. Weiser, G. Hellner, Zs. Bata Zs, L. Corici și F. Péter, *Process Biochem.* **2011**, *46*, 52-58.
- ⁶⁵ M. Paravidino și U. Hanefeld, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2651-2657.
- ⁶⁶ E. Abaházi, Z. Boros și L. Poppe, *Molecules* **2014**, *19*, 9818-9837.
- ⁶⁷ M. Ungurean, C. Paul și F. Péter, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *36*, 1327-1338.

-
- ⁶⁸ J. Brem, M. C. Turcu, C. Paizs, K. Lundell, M. I. Toșa, F. D. Irimie și L. T. Kanerva, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 119-126.
- ⁶⁹ C. Paul, P. Borza, A. Marcu, G. Rusu, M. Bîrdeanu, S. Marc Zarcu și F. Péter, *Nanomater. Nanotechnol.* **2016**, *6:3*; doi: 10.5772/62194.
- ⁷⁰ C. Csajági, G. Szatzker, E. R. Töke, L. Ürge, F. Darvas și L. Poppe, *Tetrahedron:Asymmetry* **2008**, *19*, 237-246.
- ⁷¹ K. K. Bhardwaj și R. Gupta, *J. Oleo Sci.* **2017**, *66(10)*, 1073-1084.
- ⁷² L. Ren, T. Xu, R. He, Z. Jiang, H. Zhou și P. Wei, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 249–253.
- ⁷³ C. M. Monteiro, N. M. T. Lourenço, F. C. Ferreira și C. A. M. Afonso, *ChemPlusChem* **2015**, *80*, 42–46.
- ⁷⁴ M. Nogawa, M. Shimojo, K. Matsumoto, M. Okudomi, Y. Nemoto și H. Ohta, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7300-7306.
- ⁷⁵ B. Hungerhoff, H. Sonnenschein și F. Theil, *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **2001**, *40*, 2492-2494
- ⁷⁶ Z. Luo, S. M. Swaleh, F. Theil și D. P. Curran, *Org. Lett.* **2002**, *4(15)*, 2585-2587.
- ⁷⁷ P. Beier și D. O'Hagan, *Chem. Commun.* **2002**, 1680–1681.
- ⁷⁸ A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, *Nature* **2001**, *409*, 258-268.
- ⁷⁹ A. L. Gutman, D. Brenner și A. Boltanski, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4(5)*, 839-844.
- ⁸⁰ M. Maywald și A. Pfaltz, *Synthesis* **2009**, *21*, 3654-3660.
- ⁸¹ A. Rocha, R. Teixeira, N. M. T. Lourenço și C. A. M. Afonso, *Chem. Sus. Chem.* **2017**, *10*, 296-302.
- ⁸² M. Brossat, T. S. Moody, F. de Nanteuil, S. J. C. Taylor și F. Vaughan. *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, *13(4)*, 706-709.
- ⁸³ A. Wolfson, N. Komyagina, C. Dlugy și J. Blumenfeld, *Green Sustainable Chem.* **2011**, *1*, 7-11.
- ⁸⁴ R. ter Halle, Y. Bernet, S. Billard, C. Bufferne, P. Carlier, C. Delaitre, C. Flouzat, G. Humblot, J. C. Laigle, F. Lombard și S. Wilmouth, *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 283-286.

-
- ⁸⁵ T. Yamano, F. Kikumoto, S. Yamamoto, K. Miwa, M. Kawada, T. Ito, T. Ikemoto, K. Tomimatsu și Y. Mizuno, *Chemistry Letters* **2000**, 5, 448-448.
- ⁸⁶ Z. Maugeri, W. Leitner și P. D. de María, *Tetrahedron Letters* **2012**, 53, 6968-6971.
- ⁸⁷ N. M. T. Lourenço și C. A. M. Afonso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8178–8181.
- ⁸⁸ M. T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò și W. Leitner, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345(11), 1221-1228.
- ⁸⁹ F. J. Hernández-Fernández, A. P. de los Ríos, F. Tomás-Alonso, D. Gómez și G. Vllora, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, 84, 337-342.
- ⁹⁰ E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya și M. Goto, *Chem. Commun.* **2003**, 7, 2926-2927.
- ⁹¹ L. S. Campbell-Verduyn, W. Szymański, C. P. Postema, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, D. B. Janssen și B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 898-900.
- ⁹² A. Cuetos, F. R. Bisogno, I. Lavşiera și V. Gotor, *Chem. Comm.* **2013**, 49(26), 2625-2627.
- ⁹³ V. de la Sovera, A. Bellomo și D. Gonzalez, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 430-433.
- ⁹⁴ V. de la Sovera, A. Bellomo, J. M. Pena, D. Gonzalez și H. A. Stefani, *Mol. Divers.* **2011**, 15, 163-172.
- ⁹⁵ D. Polizzotti, B. D. Fairbanks și K. S. Anseth, *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1084-1087.
- ⁹⁶ C. Li, J. Tang și J. Xie, *Tetrahedron* **2009**, 65, 7935-7941.
- ⁹⁷ I. Kwon, și B. Yang, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, 56, 6535-6347.
- ⁹⁸ L. Liang și D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 2933-2945.
- ⁹⁹ L. Lavşiera, S. Fernández, J. Magdalena, M. Ferrero, R. J. Kazlauskas și V. Gotor, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1381-1390.
- ¹⁰⁰ F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer și W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 381-384.
- ¹⁰¹ K. Ditrich, *Synthesis* **2008**, 14, 2283-2287.
- ¹⁰² B. Neises și W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 522-524.

-
- ¹⁰³ M. Starck, P. Kadjane, E. Bois, B. Darbouret, A. Incamps, R. Ziessel și L. J. Charbonnière. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9164-9179.
- ¹⁰⁴ C. Xiao, Y. Cheng, Y. Zhang, J. Ding, C. He, X. Zhuang și X. Chen. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2014**, *52*, 671-679.
- ¹⁰⁵ L. C. Bencze, J. H. Bartha-Vári, G. Katona, M. I. Toșa, C. Paizs și F. D. Irimie, *Bioresource Technol.* **2016**, *200*, 853-860.