



Universitatea „Babeş-Bolyai” Cluj-Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Școala Doctorală de Chimie
Centrul de Cercetare Enzimologie și Biocataliză Aplicată



Sinteza, Caracterizarea și Aplicațiile Sintetice ale Nanobioconjugatelor Lipazei B din *Candida antarctica*

Abstractul Tezei de Doctorat

Student-doctorand: **Ing. Cristina-Georgiana Spelmezan**

Membrii comisiei:

Președinte: Prof. Dr. Ion Grosu, Universitatea Babeş-Bolyai Cluj-Napoca

Conducător de doctorat: **Prof. Habil. Dr. Ing. Monica Ioana Toșa**

Referenți: Prof. Dr. Ing. Francisc Peter, Universitatea Politehnică din Timișoara

Prof. Dr. Francisc Dulf, Universitatea de Științe Agricole și Medicină
Veterinară din Cluj-Napoca

Conf. Dr. Anamaria-Elena Terec, Universitatea “Babeş-Bolyai” din
Cluj-Napoca

Susținere publică: 29 Septembrie 2023

Cluj-Napoca

2023

Cuprins

1. Introducere	4
2. Date din literatură	6
3. Scopul tezei de doctorat	6
4. Contribuții originale.....	7
4.1. Bionconjuțați de CaL-B obținute prin imobilizare covalentă pe nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan.....	7
4.1.1. Introducere	7
4.1.2. Rezultate și discuții.....	7
4.1.2.1. Sinteza chimică a heteroariletanolilor racemici (rac-2a-j) și acetații corespunzători (rac-3a-j).....	7
4.1.2.2. Imobilizarea covalentă a CaL-B-ului pe suporturi de nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan.....	7
4.1.2.3. Activitatea sintetică a biocatalizatorilor.....	8
4.1.2.4. Optimizarea rezoluției cinetice enzimatic (EKR)	9
4.1.2.5. Parametrii optimi ai EKR.....	9
4.1.2.5.1. Influența temperaturii asupra activității biocatalizatorului	9
4.1.2.5.2. Determinarea mediului de reacție optim.....	10
4.1.2.5.3. Influența raportului masic substrat:enzimă asupra EKR	10
4.1.2.5.4. Influența agentului de acilare.....	10
4.1.2.5.5. Efectul raportului substrat: acetat de vinil	11
4.1.2.6. Reacțiile de O-transesterificare a heteroariletanolilor racemici rac-2a-j la scară analitică mediate de lipază.....	11
4.1.2.7. Studii de reutilizare	12
4.1.3. Concluzii	13
4.2. Nanobiocatalizatori bazați pe nanofibre din PVA-CS pentru rezoluția fenotiazin-etanolilor	13
4.2.1. Introducere	13
4.2.2. Rezultate și discuții.....	13
4.2.2.1. Sinteza chimică a fenotiazin-etanolilor (rac-1a-e and rac-2b-e).....	13
4.2.2.2. Procesul de electrofilare.....	14
4.2.2.2.1. Caracterizarea morfologică a biocatalizatorului	14
4.2.2.2.2. Activitatea sintetică a noului preparat enzimatic	15
4.2.2.3. Studii EKR mediate de lipaza imobilizată.....	16
4.2.2.3.1. Determinarea mediului de reacție optim.....	16

4.2.2.3.2. Determinarea domeniului de substrat și raportul masic optim substrat:enzimă pentru fiecare compus	16
4.2.2.4. Studii de reutilizare	21
4.2.3. Concluzii	21
4.3. Nanocompozite de CaL-B bazate pe nanofibre biopolimerice de PLA/PVA.....	22
4.3.1. Introducere	22
4.3.2. Rezultate și discuții	22
4.3.2.1. Sinteza chimică a 1-benzo[b]tiofen-2-il-etanolului racemic.....	22
4.3.2.2. Imobilizarea CaL-B-ului prin adsorbție și includere în nanofibre de PLA și PVA	22
4.3.2.3. Caracterizarea morfologică a nanofibrelor	23
4.2.3.4. EKR a benzo[b]tiofen-2-il-etanolului racemic în sistem discontinuu	24
4.2.3.4.1. Biocatalizatorii bazați pe nanofibre din PVA	24
4.2.3.4.2. Biocatalizatorii bazați pe nanofibre din PLA.....	24
4.2.3.4.3. Studii de reutilizare	25
4.2.3.5. O-Acilarea Mediată de PLA-CaL-B a 1-benzo[b]tiofen-2-il-etanolului cu Acetat de Vinil în Flux Continuu	26
4.3.3. Concluzii	27
5. Partea Experimentală	27
6. Concluzii	27
7. Bibliografie	29

Cuvinte cheie: biocataliză, rezoluție cinetică enzimatică, transesterificare enzimatică, flux continuu, sistem discontinuu, imobilizare CaL-B, nanoparticule magnetice, nanofibre, rețea polimerică, separări cromatografice, sinteză organică

1. Introducere

Biocataliza, reprezintă un domeniu important de cercetare atât în industrie, cât și în mediul academic. Biocataliza, definită ca sinteza chimică mediată de un biocatalizator, aduce o alternativă curată și prietenoasă mediului pentru desfășurarea proceselor chimice [1,2]. Biocataliza prezintă numeroase avantaje precum selectivități mari, condiții de reacție blânde, costuri mai mici, toate acestea făcând transformările chimice catalizate de biocatalizatori să fie intens utilizate în comparație cu procesele chimice convenționale. În ultimele decenii, cercetările privind imobilizarea enzimelor sau chiar a întregii celule, au prezentat foarte puține limitări atunci când acele preparate sunt utilizate ca și catalizatori în sinteza organică [3-5].

Enzimele sunt compuși proteici cu funcție catalitică, sintetizați de organismele vii. Similar cu catalizatorii convenționali, acestea măresc viteza de reacție prin scăderea energiei de activare. Pe lângă catalizatorii clasici, ele fac posibilă biotransformarea substanțelor în condiții în care catalizatorul tradițional nu o poate face. Aceste transformări se datorează specificității, selectivității (chimio-, regio- și stereoselectivității), dar mai ales activității enzimaticе ridicate. Toți aceștia sunt factori importanți în aplicarea cu succes a enzimelor, dar pe lângă aceștia, stabilitatea și reutilizarea reprezintă factori critici în dezvoltarea bioprocесelor [3,6].

Compușii puri din punct de vedere enantiomeric, prezintă un interes major în industria farmaceutică, întrucât cei doi enantiomeri ai unui compus chiral pot avea efecte fiziologice diferite, iar utilizarea enzimelor în acest domeniu conduc la obținerea de compuși optic puri prin reacții selective și biocompatibile. O preocupare majoră în ceea ce privește procesul de inginerie, este reprezentată de capacitatea de a stabili o metodă ușoară de separare și reutilizare a biocatalizatorilor [7].

Inițial, se credea că enzimele funcționează exclusiv în medii apoase, că sunt incompatibile cu solvenții organici, ipoteză care s-a dovedit ulterior a fi falsă. Enzimele au nevoie de un strat de apă pentru a le asigura flexibilitatea conformațională, apa acționând ca un lubrifiant pentru mișcările lanțului polipeptidic. În absența acestui strat, enzimele devin rigide, ceea ce nu înseamnă neapărat denaturarea acestora, dar s-a observat în general o scădere a activității sale [5,8].

Există numeroase motive pentru utilizarea solvenților organici în reacțiile enzimaticе, cum ar fi: solubilitatea redusă a unor substraturi în apă, evitarea proceselor secundare precum hidroliza sau reacțiile de adiție de apă sau evitarea inhibării substratului sau a produsului. În plus, atunci când se folosește apa ca solvent, are loc contaminarea microbiană, ceea ce duce la pași de separare mai complicați și conversii reduse. Solvenții organici volatili aduc avantajul de a fi îndepărtați cu ușurință din sistemul de reacție, permițând recuperarea atât a produsului, cât și a enzimei utilizate [9].

Creșterea stabilității enzimelor în solvenți organici se poate realiza prin imobilizare, proces de trecere a enzimelor în fază solidă. Acest proces face posibilă reutilizarea acestora și trecerea la un sistem operațional de proces continuu, care prezintă avantaje în ceea ce privește productivitatea și posibilitatea de automatizare. Deși imobilizarea are multe avantaje, are și unele deficiențe, principala dintre ele fiind o rigiditate indusă de suportul pe care se desfășoară enzima, ducând la scăderea activității acesteia [10,11].

Obiectivul principal al acestei lucrări este obținerea de noi bioconjuțați ai lipazei B din *Candida antarctica* caracterizarea și investigarea acestora în rezoluția cinetică enzimatică a diferiților heteroari alcoolilor secundari.

În prima parte a contribuțiilor personale (Capitolul 4) sunt descrise noi preparate enzimaticе obținute prin imobilizarea covalentă a lipazei B din *Candida antarctica* (CaL-B) pe

nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan, folosind diferiți distanțieri. Noile preparate enzimatică au fost utilizate în sinteza stereoselectivă a heteroaril alcoolilor secundari optic puri în sistem discontinuu [12,13-18,19].

A doua parte a capitolului 4 prezintă imobilizarea aceleiași enzime prin metoda de includere în nanofibre de chitosan și alcool polivinilic. Bioconjugatul obținut a fost testat în reacția de *O*-transesterificare a două serii de fenotiazin-etanoli (*N*-alchil-fenotiazin-2-il-etanoli și *N*-alchil-fenotiazin-3-il-etanoli) [20-23].

A treia și ultima parte a contribuțiilor originale este reprezentată de imobilizarea CaL-B pe (adsorpție) și în (includere) nanofibre de alcool polivinilic și acid polilactic. Bioconjugatele obținute au fost utilizate în rezoluția cinetică enzimatică a 1-benzo[b]tiofen-2-il-etanolului în sisteme discontinue și continue, oferind un fundal promițător pentru dezvoltarea procesului [10,22,24].

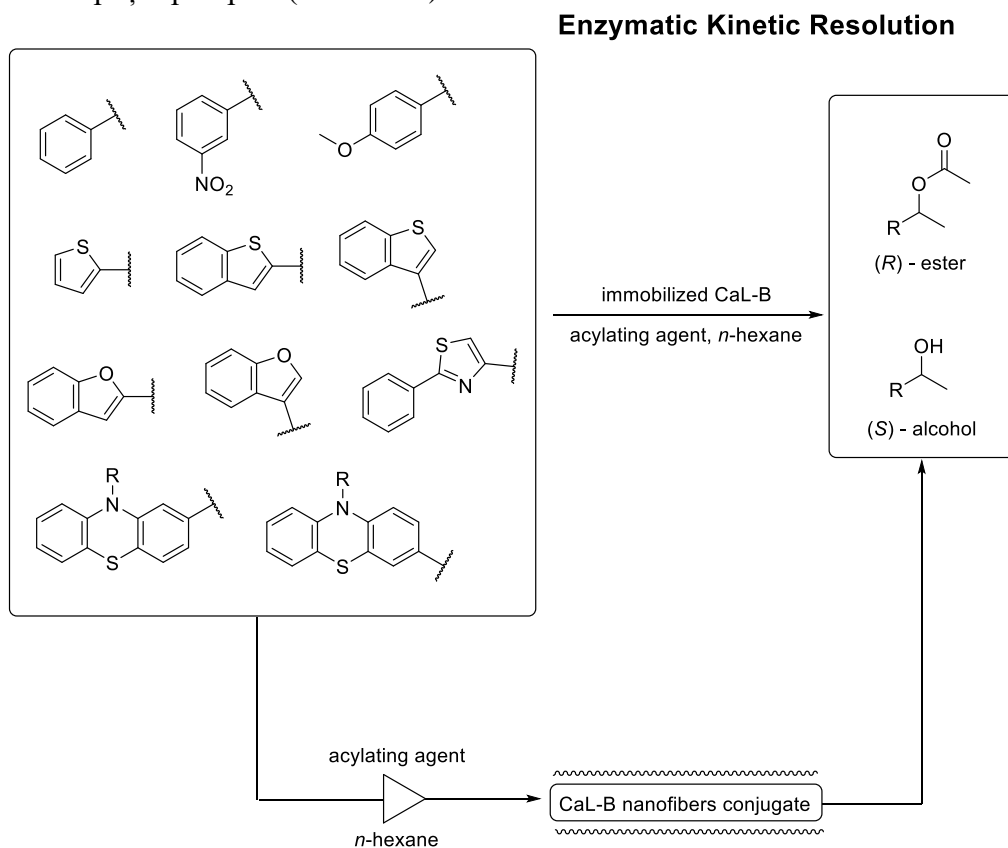
Lipaza B din *Candida antarctica*, cunoscută ca și CaL-B, este considerată una dintre cele mai promițătoare enzime pentru procesele industriale, datorită specificității și activității sale în reacțiile de transesterificare când substraturile folosite sunt alcooli secundari [25-27].

Chiar dacă această lipază are proprietăți foarte bune, prezintă și unele dezavantaje atunci când este utilizată în formă liberă, îngreunând recuperarea enzimei din amestecul de reacție pentru a fi reutilizată, cât și o stabilitate mai scăzută față de forma sa imobilizată, pe diferite suporturi precum: chitosan, silice, nanoparticule magnetice sau nanofibre [10,28,29,30].

2. Date din literatură

3. Scopul tezei de doctorat

Obiectivul lucrării actuale a fost cel de a dezvolta bioconjugate stabile și active ale lipazei B din *Candida antarctica* folosind nanosuporturi precum nanoparticulele magnetice acoperite cu chitosan (MNP-CS) sau nanofibrele polimerice de alcool polivinilic (PVA) sau acid polilactic (PLA). Biocatalizatorii obținuți au fost testați în rezoluția cinetică enzimatică de etanoli secundari (hetero)aromatici prin *O*-transesterificare, în sisteme discontinue și continue, cu scopul de a obține compuși optic puri (**Schema 1**).



Schema 1. Rezoluția cinetică enzimatică a etanolilor (hetero)aromatici secundari prin *O*-transesterificare, în sisteme continue și discontinue.

Alcoolii secundari (hetero)aromatic au fost aleși ca și substraturi datorită importanței lor în domeniul farmaceutic ca elemente de bază pentru diferite medicamente. Fenotiazina, benzofuranul, benzo[b]tiofenul sau 2-feniltiazolul sunt nuclee cunoscute pentru medicamentele utilizate ca agenți anti-cancer, antiviral, antibacterian, antifungic, astmatic sau antipsihotic [70-75]. Etanolii racemici au fost utilizați atât ca și substraturi pentru reacția de *O*-transesterificare (Schema 2), cât și ca materii prime pentru sinteza chimică a esterilor corespunzători acestora, în vederea stabilirii metodelor de separare cromatografică

4. Contribuții originale

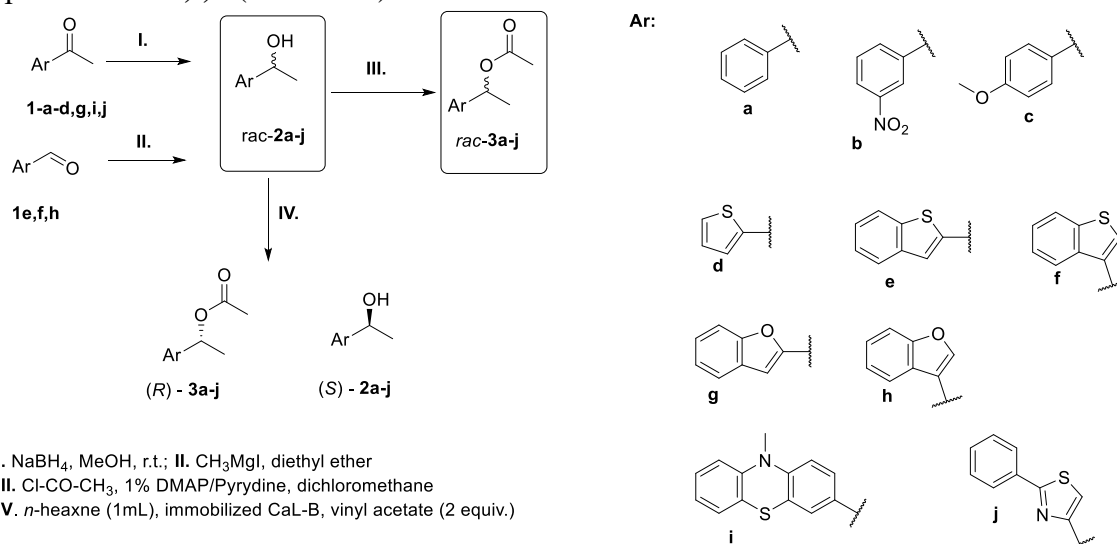
4.1. Bionconjuțați de CaL-B obținuți prin imobilizare covalentă pe nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan

4.1.1. Introducere

4.1.2. Rezultate și discuții

4.1.2.1. Sinteza chimică a heteroariletanolilor racemici (*rac-2a-j*) și acetații corespunzători (*rac-3a-j*)

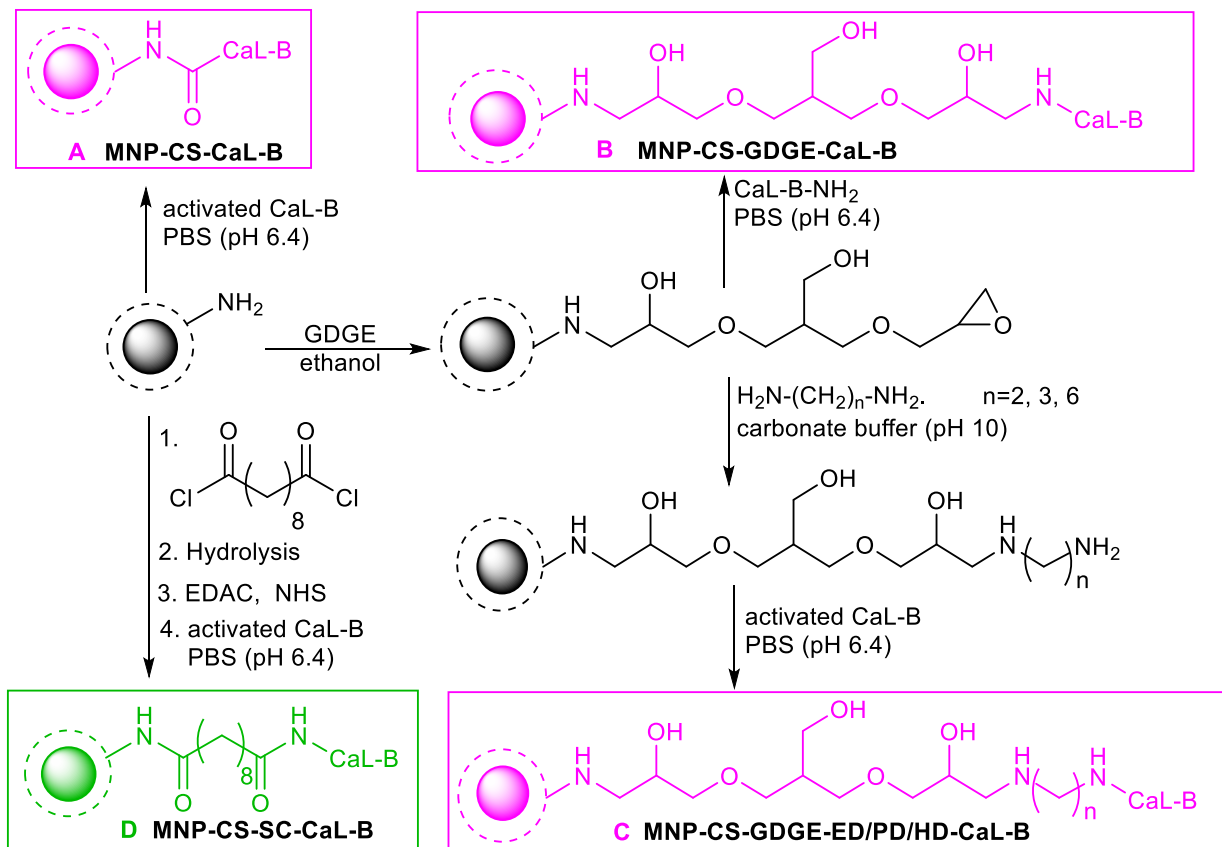
Etanolii heteroaromatici racemici au fost sintetizați chimic folosind metode cunoscute [97-100]. Heteroariletanolii racemici *rac-2a-d,g,i,j* au fost obținuți prin reducerea chimică cu borohidruă de sodiu a heretoaril-metil-cetonelor prochirale corespunzătoare **1a-d,g,i,j**, în timp ce heretoariletanolii *rac-2e,f,h* au fost obținuți prin reacția Grignard din aldehidele corespunzătoare **1e,f,h** (Schema 2).



Schema 2. Sinteza chimică a etanolilor racemici *rac-2a-j* și acetaților acestora *rac-3a-j* și *O*-transesterificarea a etanolilor racemici *rac-2a-j* mediată de CaL-B imobilizată.

4.1.2.2. Imobilizarea covalentă a CaL-B-ului pe suporturi de nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan

În scopul de a dezvolta bioconjuțați eficienți ai CaL-B, au fost utilizate patru metode pentru imobilizarea covalentă a lipazei B pe nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan (MNP-CS) prin diferite interacțiuni între suport și enzimă: A) legarea covalentă directă a enzimei activate la grupările amino ale chitosanului; B) legarea covalentă de grupările epoxi reziduale ale glicerol-diglicidil eterului (GDGE) după atașarea sa covalentă la grupările amino ale chitosanului; C) legarea covalentă printr-un linker diaminoalchilic (etil diamină -ED, propil diamină -PD și hexil diamină -HD) legat anterior de moleculele activate de GDGE și D) legarea covalentă pe MNP-CS după derivatizare cu clorură de sebacoil (SC) prin metoda esterilor activați (Schema 3).



Scheme 3. Imobilizarea covalentă a CaL-B pe suporturi bazate pe MNP-CS.

4.1.2.3. Activitatea sintetică a biocatalizatorilor

Întrucât activitatea catalitică a lipazelor în solvenții organici nu este reflectată de activitatea lor hidrolitică determinată în soluție apoasă, a fost utilizată o metodă colorimetrică sensibilă, bazată pe cantitatea de acetaldehidă eliberată atunci când esteri vinilici sunt utilizați în reacțiile de transesterificare, denumită *activitate sintetică* [101]. Pe lângă activitatea sintetică a bioconjugăților obținuți, a fost determinată și activitatea sintetică a CaL-B-ului imobilizată disponibilă comercial (Novozym 435) ca referință. Rezultatele obținute sunt prezentate în **Tabelul 1**.

Table 1. Activitatea Sintetică a Noilor Preparate Enzimatiche.

Nr. Crt.	Preparat	Activitate Sinetică ^a (mmol/min* _g preparat)
1.	CaL-B liofilizat	0.44
2.	Novozym 435	1.96
3.	MNP-CS-CaL-B	0.13
4.	MNP-CS-GDGE-CaL-B	0.13
5.	MNP-CS-GDGE-ED-CaL-B	0.21
6.	MNP-CS-GDGE-PD-CaL-B	0.20
7.	MNP-CS-GDGE-HD-CaL-B	0.09
8.	MNP-CS-SC-CaL-B	1.95

^a conform legii Lambert-Beer, unde $\varepsilon = 14,300$ [101].

Pentru determinarea activității sintetice s-a folosit aceeași cantitate de enzimă imobilizată. După cum se observă din Tabelul 1, nanoparticulele magnetice acoperite cu chitosan care poartă fragmentul sebacoil (Intrarea 8) au avut aceeași activitate sintetică ca și CaL-B imobilizat comercial (Intrarea 2), dar care are dezavantajele de a fi instabil, sub agitare pot deveni fragil, conducând la scurgeri ale moleculilor enzimei, în consecință ducând la o scădere a activității biocatalizatorului [102,103]. Comparând bioconjugatul cel mai activ (Intrarea 8) cu CaL-B liofilizat (Intrarea 1), bioconjugatul prezintă o activitate sintetică mult mai mare, probabil din cauza rezidului hidrofob care blochează interacțiunile enzimă-enzimă de la suprafața suportului.

4.1.2.4. Optimizarea rezoluției cinetice enzimatică (EKR)

Pentru a corobora rezultatele obținute pentru activitatea sintetică, în ceea ce privește eficiența bioconjugatilor, aceștia au fost testați în reacția de *O*-transesterificare a 1-fenil-1-etanolului racemic, *rac-2a*, ales ca substrat model. Rezultatele obținute au fost în concordanță cu cele obținute în studiul de activitate, dovedindu-se că cel mai eficient preparat enzimatic este cel care poartă restul sebacoil (**Figura 1**). Acest nou bioconjugat permite obținerea conversiei maxime (50%) în cel mai scurt timp de reacție (13 ore) și excese enantiomerice mari (ee_S și ee_P >99,9%). Pentru acest studiu și următoarele două, raportul de masă substrat-enzimă utilizat a fost de 5:1, cantitatea corespunzătoare de preparat conținând 1 mg de enzimă, 1 ml de *n*-hexan ca și solvent, o temperatură de 45 °C și 1000 rpm.

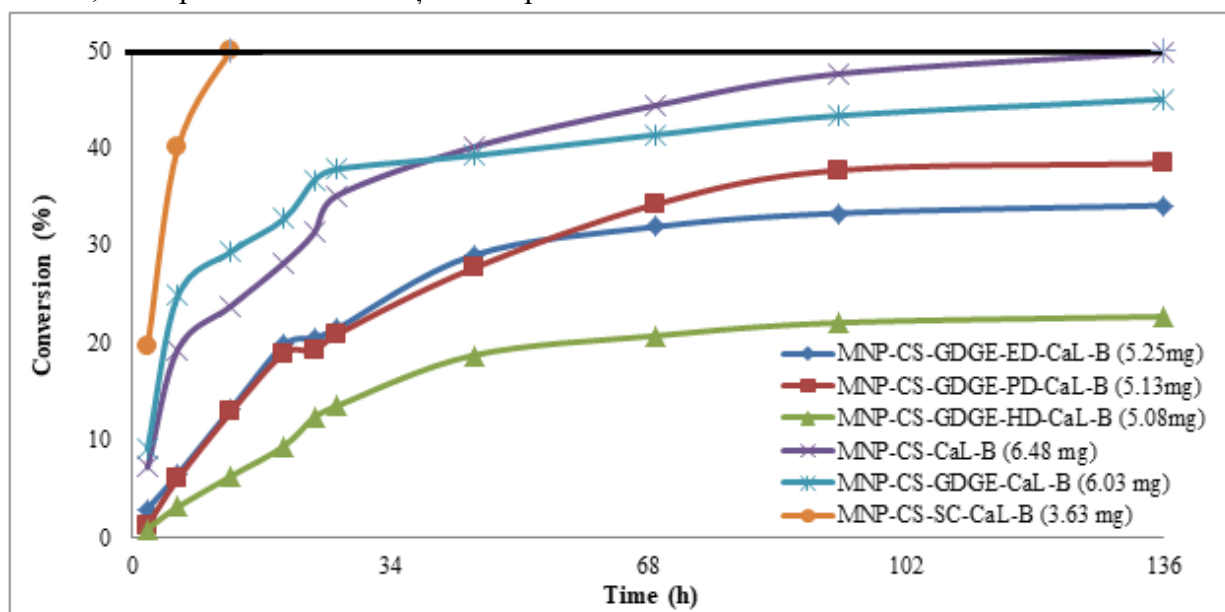


Figura 1. Screeningul biocatalizatorului în EKR a substratului model racemic 1-fenil-1-etanol (*rac-2a*).

4.1.2.5. Parametrii optimi ai EKR

4.1.2.5.1. Influența temperaturii asupra activității biocatalizatorului

Deoarece este cunoscut faptul că temperatura joacă un rol important în viteza tuturor reacțiilor, inclusiv a celor catalizate de enzime, următorul studiu a avut ca scop determinarea temperaturii optime pentru cel mai eficient bioconjugat de CaL-B: MNP-CS-SC-CaL-B. Reacțiile au fost efectuate în 1 mL de *n*-hexan, cu acetat de vinil ca agent de acilare (2 echiv.) și un raport de masă substrat-enzimă de 5:1. Intervalul de temperatură a fost între 30 °C și 60 °C, în incremente de 5 °C. Probele au fost prelevate după 2 ore și analizate pe HPLC. După analiza datelor experimentale temperatura optimă a fost determinată ca fiind de 45 °C (**Figura 2**), astfel că toate experimentele ulterioare vor fi efectuate la această valoare.

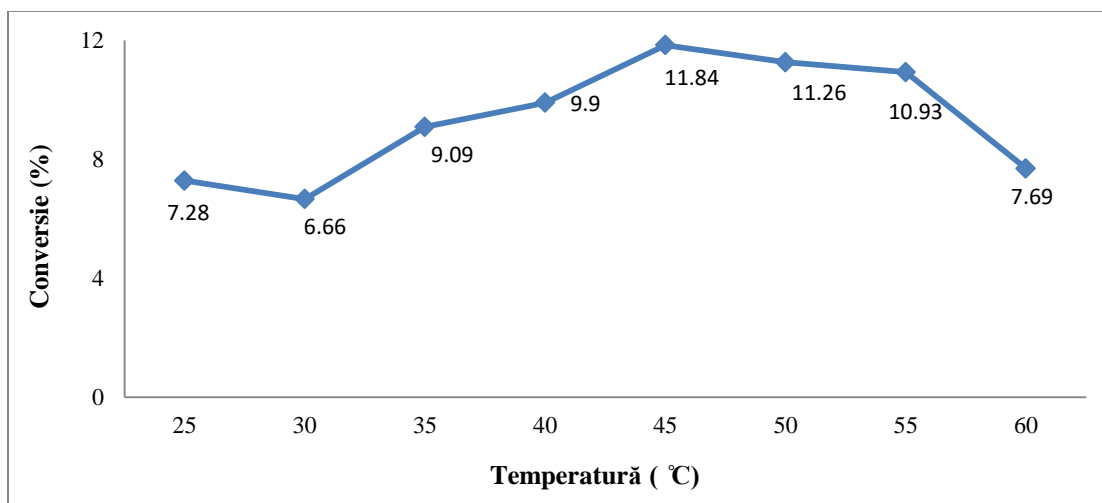


Figura 2. Efectul temperaturii asupra activității enzimice a MNP-CS-SC-CaL-B în EKR a 1-fenil-1-etanolului racemic (conversia după 2 ore).

4.1.2.5.2. Determinarea mediului de reacție optim

Conformația enzimei depinde puternic de mediul de reacție; astfel, eficiența sa catalitică depinde de natura solventului. Pentru screening-ul solventului, s-au folosit cinci solvenți aprotici nepolari și polari (*n*-hexan, toluen, tetrahidrofuran (THF), *terț*-butil-metil-eter (MTBE) și diclorometan (DCM)), în condiții similare: acetat de vinil (2 echiv.), raport masă substrat-enzimă 5:1, temperatură 45 °C. Datele experimentale obținute au arătat *n*-hexanul ca mediu de reacție optim (obținându-se o conversie de 42% după 6 ore) în comparație cu toluenul, unde conversia a fost de numai 12%. În cazul celorlalți trei solvenți (THF, MTBE și DCM), conversia obținută a fost mai mică de 2%. Probele au fost prelevate după 6 ore și analizate pe HPLC.

4.1.2.5.3. Influența raportului masic substrat:enzimă asupra EKR

În continuare, pentru a crește productivitatea EKR, am studiat raportul masic optim substrat-enzimă, folosind 5 mg de substrat model *rac-2a*, 2 echiv. de acetat de vinil, *n*-hexan ca solvent (1 ml), la 45 °C și 1000 rpm. Pentru a studia raportul masic substrat-enzimă, cantitatea de substrat a fost menținută pentru toate experimentele, modificându-se cantitatea de enzimă și respectiv de preparat enzimatic. Probele au fost prelevate după 6 ore și analizate pe HPLC. După analizarea rezultatelor obținute, s-a ales ca optim un raport masic substrat-enzimă de 5:1, rezultând o conversie de 45%, comparativ cu raportul mai mare (15:1) unde conversia obținută a fost de 12% sau cu raportul mai mic. (2,5:1) unde conversia a fost de 30%.

4.1.2.5.4. Influența agentului de acilare

Așa cum se știe natura agentului de acilare joacă un rol semnificativ în acilarea selectivă a enantiomerilor. Trei esteri vinilici (2 echiv.): acetat, butanoat și decanoat au fost testați în *O*-transesterificarea compusului model *rac-2a*, în condițiile stabilite anterior: 1 mL de *n*-hexan, raport greutate substrat-enzimă 5:1 la 45 °C și 1000 rpm. Probele au fost prelevate la fiecare 2 ore până la terminarea reacției. După cum se observă în **Tabelul 2**, cel mai bun agent de acilare s-a dovedit a fi acetatul de vinil, conversia maximă (50%) a fost atinsă în cel mai scurt timp de reacție (13 ore) (Intrarea 1) și cu excese enantiomerice mai mari (ee_S și $ee_P > 99,9$). %).

Table 2. Determinarea agentului de acilare optim.

Nr. Crt.	Agent de acilare	Timp (h)	ee_S^a (%)	ee_P^a (%)	c^b (%)
1	Acetat de vinil	13	>99.9	>99.9	50
2	Butanoat de vinil	79	>99.9	>99.9	50
3	Decanoat de vinil	24	77.6	85	43.7

^a determinate din ariile peak-urilor ale chromatogramelor; ^b calculată cu formula $c = [ee_S/(ee_S+ee_P)]$.

4.1.2.5.5. Efectul raportului substrat: acetat de vinil

Un alt parametru care poate influența atât viteza de reacție, cât și activitatea sintetică este reprezentat de raportul substrat-acetat de vinil. Experimentele au fost efectuate în condițiile determinate anterior (1 mL de *n*-hexan, raport de greutate substrat-enzimă 5:1, acetat de vinil ca agent de acilare, la 45 °C și 1000 rpm), pe substratul model *rac-2a*. Raporturile utilizate dintre substrat și acetatul de vinil (echiv.) au fost: 1:0,75, 1:1, 1:2 și 1:4. Când s-au folosit 2 și 4 echiv. de acetat de vinil, s-a atins conversia maximă (50%), biocatalizatorul având activitate sintetică similară (**Figura 3**). Din motive economice și de mediu, raportul dintre substrat și acetatul de vinil utilizat în experimentele ulterioare a fost de 1:2.

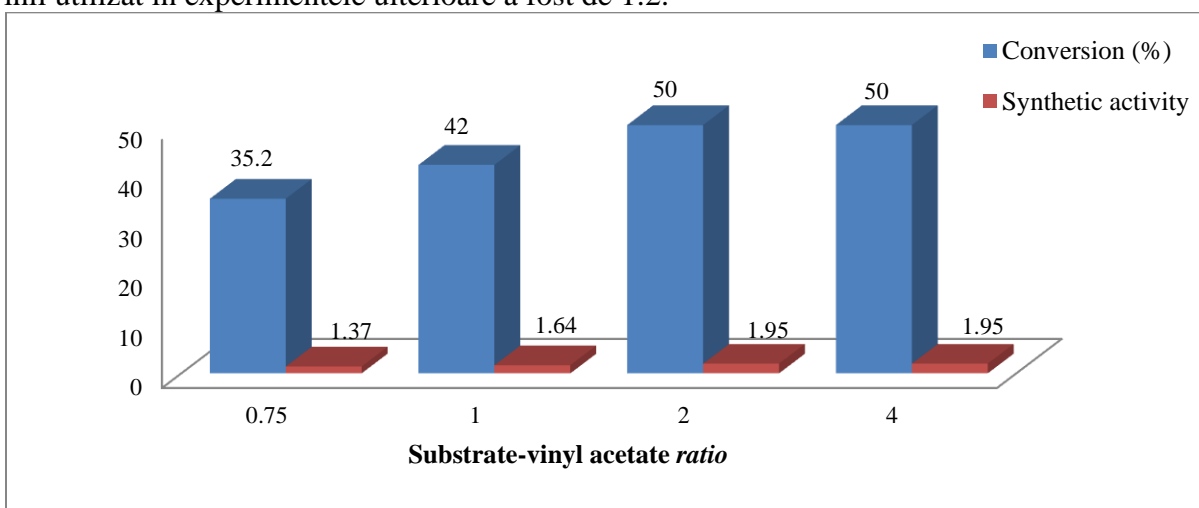

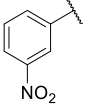
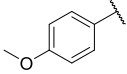

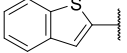
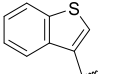
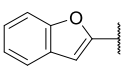
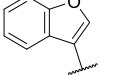
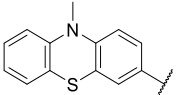
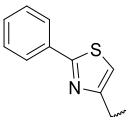


Figura 3. Influența raportului substrat: acetat de vinil asupra conversiei și a activității sintetice în EKR a 1-fenil-1-etanol racemic (*rac-2a*).

4.1.2.6. Reacțiile de O-transesterificare a heteroariletanolilor racemici *rac-2a-j* la scară analitică mediate de lipază

Având parametrii optimi determinați anterior pentru rezoluția cinetică enzimatică, în continuare a fost stabilit domeniul de substrat pentru noul bioconjugat al lipazei B din *Candida antarctica* (MNP-CS-SC-CaL-B). Probele au fost prelevate periodic din amestecul de reacție, diluate cu *n*-hexan și analizate pe HPLC utilizând coloanele chirale adecvate. Rezultatele obținute au arătat o conversie foarte bună ($c > 49\%$) și purități optice ridicate ($ee_P > 99,9\%$, $ee_S > 96\%$, $E > 200$), pentru toți heteroariletanolii investigați. Bioconjugatul a prezentat o activitate catalitică excelentă și un domeniu larg de substrat compus din substraturi aromatice și heteroaromatice purtând fragmente precum fenil, tiofen, benzotiofen, furan, benzofuran, fenotiazină și tiazol.

Table 3. Rezoluția cinetică enzimatică a heteroariletanolilor *rac-2a-j*.

Nr. Crt.	Substrat	Timpu Reacției (h)	ee_S^a (%)	$c^{b,c}$ (%)	
1	<i>rac-2a</i>		13	>99.9	50
2	<i>rac-2b</i>		5	>99.9	50
3	<i>rac-2c</i>		5	98.9	49.7
4	<i>rac-2d</i>		4.5	>99.9	50
5	<i>rac-2e</i>		4	97.6	49.4
6	<i>rac-2f</i>		16	96.9	49.2
7	<i>rac-2g</i>		8	96.1	49
8	<i>rac-2h</i>		12	98.2	49.6
9	<i>rac-2i</i>		10	96.8	49.2
10	<i>rac-2j</i>		3	>99.9	50

^a determinate din ariile peak-urilor ale chromatogramelor; ^b calculate cu formula $c = [ee_S / (ee_S + ee_P)]$; ^c $ee_P > 99.9\%$ în toate cazurile, $E \gg 200$.

4.1.2.7. Studii de reutilizare

Deoarece reutilizarea și stabilitatea sunt factori importanți pentru fiecare biocatalizator și o cerință crucială în orice aplicație, permițând dezvoltarea unor procese sustenabile, cel mai eficient bioconjugat (MNP-CS-SC-CaL-B) a fost testat în EKR ale *rac-2e* (timp de reacție 1 oră, Figura 4A) și *rac-2i* (timp de reacție 10 ore, Figura 4B) în condițiile optime determinate anterior. Reacția a fost efectuată de 10 ori consecutiv, enzima imobilizată fiind spălată după fiecare ciclu cu *n*-hexan (3 x 0,5 ml) și imediat utilizată în următorul. Biocatalizatorul a prezentat o stabilitate ridicată în *n*-hexan, demonstrată în special în EKR al *rac-2i*, compusul cu fragment fenotiazinic. Conversia a scăzut cu mai puțin de 3% după un total de 100 de ore în solvent organic. În cazul *rac-2e*, compus cu un fragment benzotiofenic, biocatalizatorul și-a menținut activitatea prin toate cele 10 cicluri de reacție, conversia scăzând cu mai puțin de 3%, după un timp de reacție total de 10 ore.

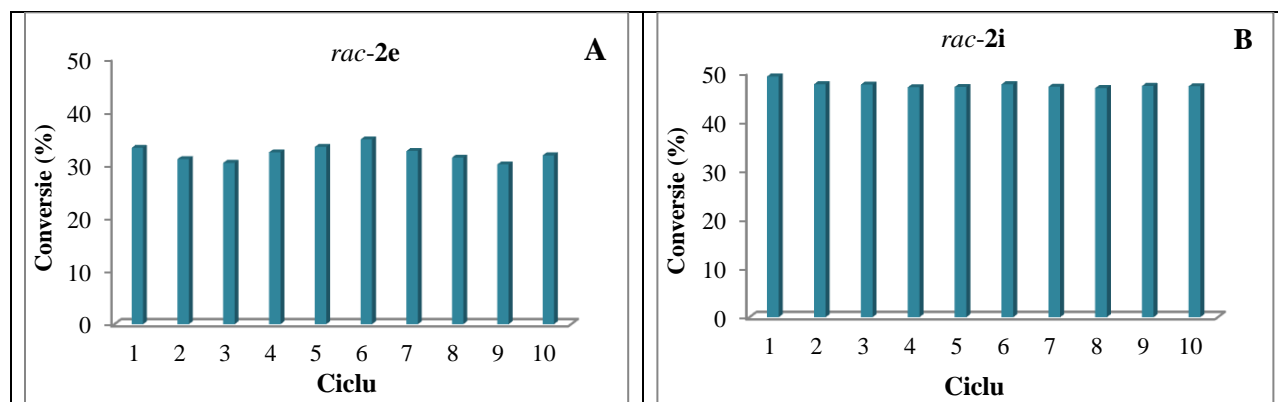


Figura 4. A. Reutilizarea biocatalizatorului optim MNP-CS-SC-CaL-B în EKR al benzotiofen-2-etanolului racemic (*rac-2e* – 1 oră timp de reacție) și B. al *N*-etil-fenotiazinil-3-etanolului racemic (*rac-2i* -10 ore timp de reacție).

4.1.3. Concluzii

S-a realizat optimizarea rezoluției cinetice enzimatică a heteroariletanolilor mediate de lipaza B din *Candida Antarctica* imobilizată covalent pe nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan. După cum s-a demonstrat, metoda de imobilizare covalentă oferă posibilitatea dezvoltării de biocatalizatori eficienți pentru diferite aplicații, prin varierea brațului distanțier poziționat între enzimă și suport. Găsind parametrii optimi care influențează viteza de reacție, activitatea și selectivitatea (temperatura, raportul substrat-enzimă, solventul, agentul de acilare și raportul substrat-acetat de vinil), preparatul enzimatic care poartă fragmentul sebacoil atât ca agent de activare, cât și ca braț distanțier, a oferit o eficiență ridicată pentru fiecare substrat testat. Bioconjugatul nou obținut s-a dovedit a fi foarte stabil în solvenți organici, activitatea sa rămânând ridicată în ambele cazuri chiar și după 10 cicluri de reutilizare, scăzând cu mai puțin de 3%.

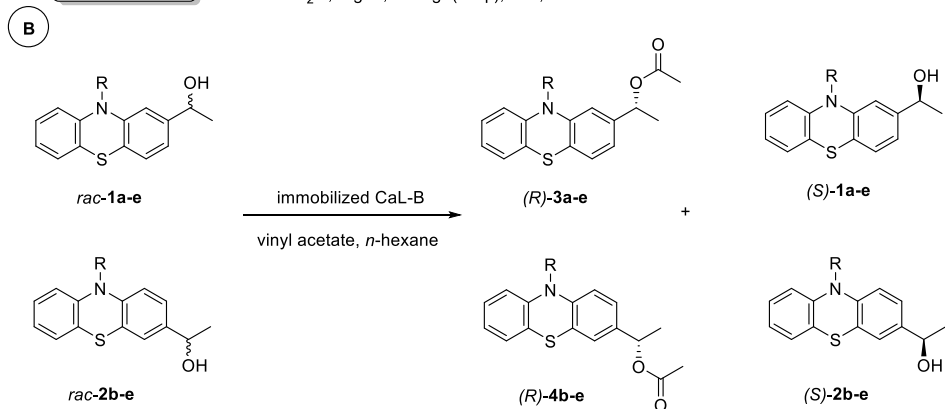
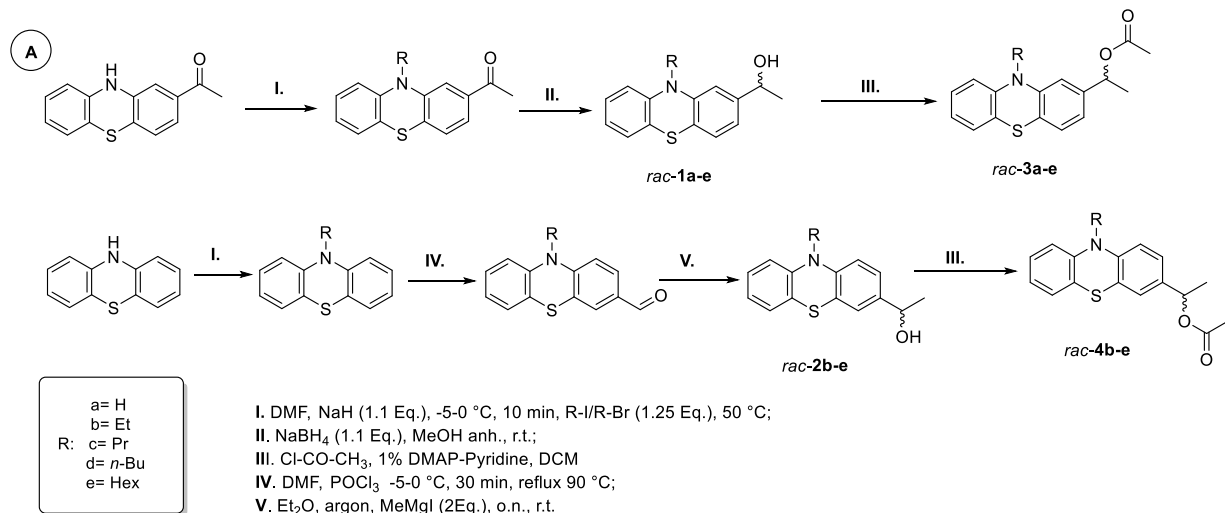
4.2. Nanobiocatalizatori bazați pe nanofibre din PVA-CS pentru rezoluția fenotiazin-etanolilor

4.2.1. Introducere

4.2.2. Rezultate și discuții

4.2.2.1. Sinteza chimică a fenotiazin-etanolilor (*rac-1a-e* and *rac-2b-e*)

Fenotiazin-etanolii racemici au fost sintetizați folosind metode cunoscute [97-99]. Heteroariletanolii racemici *rac-1a-e* au fost obținuți prin reducerea chimică cu borohidruură de sodiu a heteroaril-metil-cetonelor prochirale corespunzătoare, în timp ce heteroariletanolii *rac-2b-e* au fost obținuți prin reacția Grignard din aldehidele corespunzătoare (**Schema 4A**). Etanolii racemici obținuți au fost utilizați ca substraturi în reacțiile de *O*-transesterificare (**Schema 4B**), precum și ca materii prime pentru sinteza chimică a acetatilor corespunzători acestora (*rac-3a-e* și *rac-4b-e*), pentru a stabili metodele de separare cromatografică.



Schema 4. A. Sinteza chimică a etanolilor racemici *rac-1a-e* și *rac-2b-e* acetatii lor *rac-3a-e* și *rac-4b-e*; **B.** *O*-transesterificarea selectivă a etanolilor racemici mediată de CaL-B imobilizat.

4.2.2.2. Procesul de electrofilare

Chiar dacă bioconjugatul de CaL-B a fost obținut prin tehnica electrofilării, putem considera totuși că noul biocatalizator a fost obținut prin utilizarea metodei de captare. Încărcarea optimă a enzimei prin captare reprezintă cea mai mică cantitate de enzimă care asigură cea mai mare activitate biocatalitică [135]. Conform literaturii de specialitate, cel mai utilizat protocol pentru captarea enzimelor în nanofibre polimerice pe bază de PVA și chitosan, folosește un amestec de soluții 8% PVA și 1,35% CS, cu raportul volumetric PVA: chitosan=8:2 (v/v) [19,21,22].

4.2.2.2.1. Caracterizarea morfologică a biocatalizatorului

Nanofibrele au fost caracterizate prin microscopie cu transmisie electronică (TEM). Imaginile nanofibrelor PVA-CS preparate ca referință (Figura 5a,b) au indicat o omogenitate bună și o distribuție dimensională uniformă, în timp ce în prezența lipazei (Figura 5c), moleculele de enzimă sunt vizibile mai ales în nanofibre, indicând imobilizarea enzimei. preponderent prin captare și mai puțin prin adsorbție pe suprafața suport polimeric.

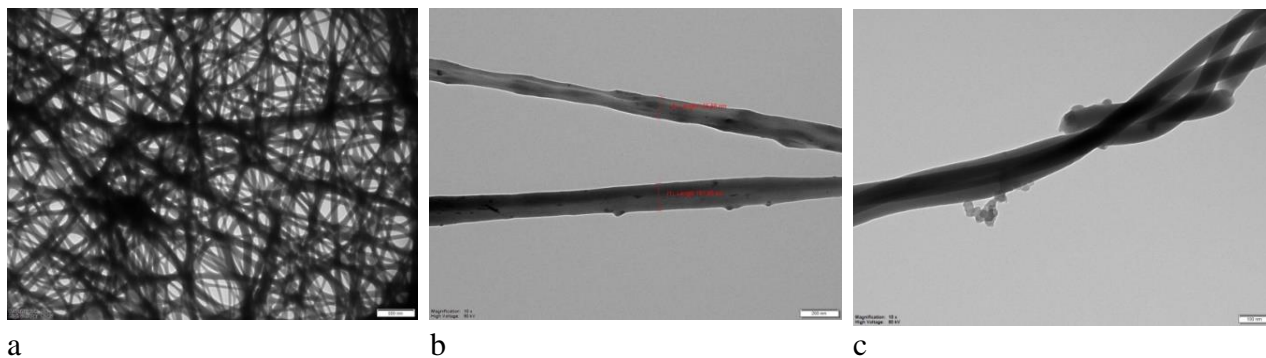
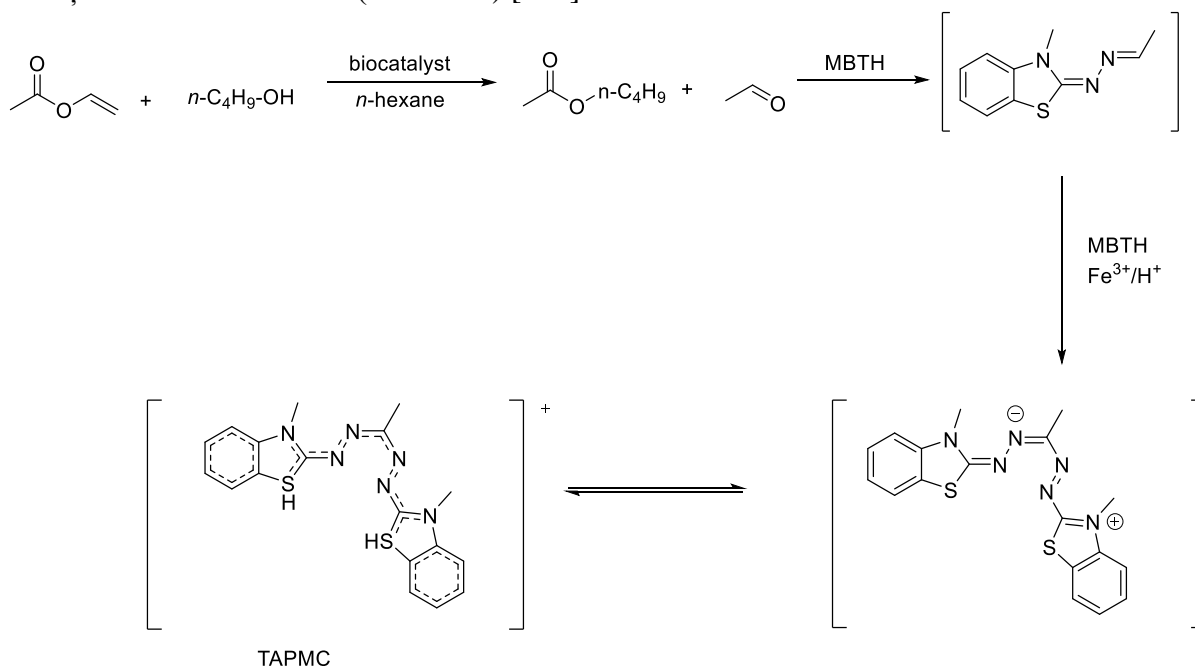


Figura 5. Imagini TEM ale noului biocatalizator (PVA-CS-CaL-B). A. Omogenitatea nanofibrelor PVA-Chitosan și distribuția uniformă, cu o mărire de $5\times$ (500 nm) și tensiune înaltă (80kV); b. Lungimea fibrelor PVA-Chitosan determinată între 120-152 nm, folosind o mărire de $10\times$ (200 nm) și tensiune înaltă (80kV). c. Nanofibre PVA-Chitosan care conțin CaL-B la o amplificare care permite observarea moleculelor de enzimă, folosind o mărire de $15\times$ (100 nm) și tensiune înaltă (80kV).

4.2.2.2. Activitatea sintetică a noului preparat enzimatic

Prima evaluare a noului biocatalizator a fost determinarea activității sale sintetice, pe baza metodei menționate anterior [101]. Testul activității sintetice se bazează pe reacția *n*-butanolului cu acetatul de vinil, acetaldehida eliberată fiind cuantificată după derivatizare cu 3-metil-2-benzotalinonă hidrazonă (MBTH); intermediarul de aldază reacționează în continuare cu o altă moleculă MBTH prin cuplare oxidativă în prezența sulfatului de fier amoniu (III) ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) formând o tetraazapentameten-cianină albastră (TAPMC) cu o absorbție maximă la 598 nm (Schema 5) [101].



Schema 5. Reacțiile implicate în protocolul activității sintetice.

Folosind acest test, s-a obținut o valoare ridicată pentru activitatea sintetică a nanobioconjugatului (PVA-CS-CaL-B) $6,1 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}_{\text{biocatalizator}}^{-1}$ în comparație cu cele ale Novozym 435 ($1,96 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}_{\text{biocatalizator}}^{-1}$) sau cu CaL-B raportat anterior imobilizat covalent pe nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan (MNP-CS-SC-CaL-B, $1,95 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}_{\text{biocatalizator}}^{-1}$), cu mențiunea că fiecare biocatalizator conținea aceeași cantitate de

enzimă (1 mg de CaL-B), rezultând 5 mg PVA-CS-CaL-B, 10 mg Novozym 435 și 3,63 mg CaL-B imobilizat pe nanoparticule magnetice. Activitatea sintetică crescută de aproximativ 3 ori a noului biocatalizator este legată de tehnica de imobilizare utilizată (captarea enzimelor în nanofibrele polimerice); moleculele enzimei sunt dispersate într-un sistem nanofibros cu o suprafață mare și ca rezultat moleculele biocatalizatorului sunt mult mai flexibile (în comparație cu cele legate covalent pe MNP-CS-SC-CaL-B sau cu cele adsorbite fizic în cazul Novozym. 435, ultimul fiind cunoscut pentru problemele legate de desorbția enzimatică [100]). Mai mult, matricea polimerică s-a dovedit a fi potrivită pentru legarea unei cantități mai mari de lipază, rezultând o capacitate de imobilizare mai mare, ceea ce poate fi important pentru aplicațiile sintetice care necesită biocatalizatori cu încărcare mare.

4.2.2.3. Studii EKR mediate de lipaza imobilizată

4.2.2.3.1. Determinarea mediului de reacție optim

Deoarece solventul joacă un rol crucial atât în stabilitatea suportului, cât și a enzimei și poate influența proprietățile catalitice ale acesteia [132], s-a determinat solventul optim, pe baza stabilității suportului nanofibros. Au fost testați patru solvenți aprotici nepolari și polari: diclorometan (DCM), tetrahidrofuran (THF), cloroform și *n*-hexan. Solvenții polari au influențat prin stereoregularitate proprietățile PVA, care era deja influențată de interacțiunile dipol-dipol sau de legăturile de hidrogen cu alte grupări polare [133]. Pe baza acestor date experimentale, s-a ales *n*-hexanul ca solvent, deoarece după menținerea sub agitare la 50 °C și 1000 rpm timp de 24 de ore, s-a înregistrat o pierdere de doar 0,46%, comparativ cu cloroformul (de 1,47%), THF (2,77%) sau DCM (8,1%), demonstrând stabilitatea impresionantă a suportului în medii organice.

4.2.2.3.2. Determinarea domeniului de substrat și raportul masic optim substrat:enzimă pentru fiecare compus

Pentru a determina domeniul de substrat al noului biocatalizator, a fost efectuată O-transesterificarea a nouă substraturi în *n*-hexan (stabilit anterior pe baza stabilității nanofibrelor) folosind 10 mg de substrat (*rac-1a–e*, *rac-2b–e*, **Figurile 7A, B**), 2 echiv. de acetat de vinil, 5 mg de preparat enzimatic (conținând 1 mg de CaL-B) și 1 mL de solvent, la 50 °C și 1000 rpm. Probele au fost prelevate periodic și analizate la HPLC.

În seria fenotiazin-2-il-1-etanolilor (**Figura 6A**), conversia maximă a fost obținută pentru derivații *N*-etil- (*rac-1b*) și *N*-butil (*rac-1d*) în 10-12 ore, în timp ce *N*-propil- (*rac-1c*) și fenotiazin-2-il-1-etanolul nesubstituit (*rac-1a*) au fost transformați mult mai lent. Pentru *rac-1e*, care poartă o grupare hexil, voluminoasă, la atomul de azot, conversia rămâne scăzută chiar și după 12 ore (aproximativ 2,8%).

Derivații de *N*-etil și *N*-butil reacționează mai repede și conversia de 50% a fost atinsă după 10, respectiv 12 ore. Pe baza acestor rezultate s-a ajuns la concluzia că noul bioconjugat prezintă o activitate bună în EKR a substraturilor mari, dar pentru moleculele cu o grupare alchil mai lungă decât butil interacțiunea substratului cu enzima este mai slabă. În toate procesele de transesterificare studiate, enzima imobilizată a prezentat selectivitate enantiomerică ridicată (excese enantiomerice apropiate de 100% la conversii de 50%).

În seria fenotiazine-3-il-1-etanolilor, rezultatele obținute (**Figura 6B**) au fost moderate până la modeste 6,7–40,23%, chiar și după 48 de ore, datele noastre susținând dependența conversiei de poziția etanolului pe nucleul fenotiazinei și puterea interacțiunii substrat-enzimă.

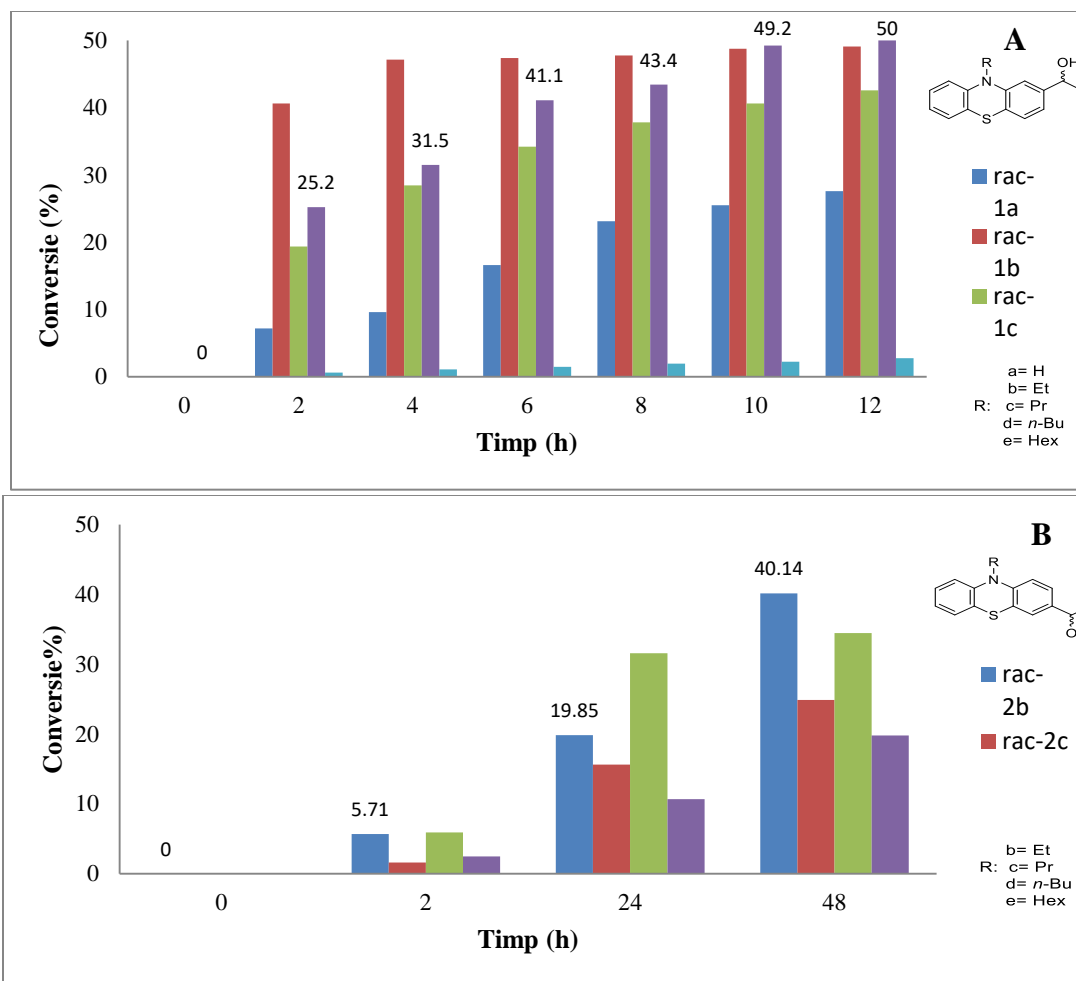


Figura 6. Rezoluția cinetică enzimatică (EKR) a *N*-alchil-fenotiazin-2-il-1-etanolilor racemici (A) și *N*-alchil-fenotiazin-3-il-1-etanolilor racemici (B).

Deoarece în EKR a fenotiazin-3-il-1-etanolilor *N*-substituiți (*rac-2b-e*) au fost înregistrate conversii moderate până la modeste cu acetatul de vinil ca agent de acilare chiar și după 48 de ore, butanoatul de vinil a fost apoi testat (Figura 7). Au fost observate unele îmbunătățiri (conversii mai mari cu aproximativ 5–10%) pentru toate cele patru derivate. Conversia maximă de 50% a fost atinsă după 48 de ore numai în cazul 1-(10-etil-10*H*-fenotiazin-3-il)etan-1-ol (*rac-2b*). Este important de remarcat comportamentul *N*-propil- și *N*-hexil-fenotiazin-3-il-1-etanolilor *rac-2c,e*, care reacționează cu viteze similare atunci când carbonul asimetric al fragmentului de etanol este fixat la carbonul 3 al structurii fenotiazinei.

Pentru a îmbunătăți productivitatea, a fost studiată în continuare influența raportului masic substrat-enzimă asupra vitezei de reacție și conversie pentru fiecare substrat (Figurile 8-12). Pentru *N*-alchil-fenotiazin-2-il-1-etanoli au fost testate opt rapoarte diferite variind între 10:1 și 100:1, în timp ce pentru *N*-alchil-fenotiazin-3-il-1-etanoli au fost investigate doar trei rapoarte diferite: (10:1, 50:1 și 100:1) (Figura 13). S-a observat deja că, conversia scade pe măsură ce lungimea lanțului alchil crește dar și odată cu creșterea concentrației substratului. La concentrații mai mici de substrat, când *rac-1b* a fost folosit ca substrat, s-au obținut conversii bune. Probele au fost prelevate la fiecare două ore, până la 12 ore (EKR al *rac-1d* a fost complet) și analizate la HPLC.

Biocatalizatorul a prezentat selectivitate și activitate ridicate pentru toate substraturile la cel mai scăzut raport substrat:enzimă (10:1). Pentru *N*-alchil-fenotiazin-2-il-1-etanoli nesubstituiți, cea mai mare conversie a fost obținută atunci când s-a fost utilizat un raport de 50:1 ($c = 37,9\%$) (Figura 8) cu excesul enantiomeric de produs $> 99,9$.

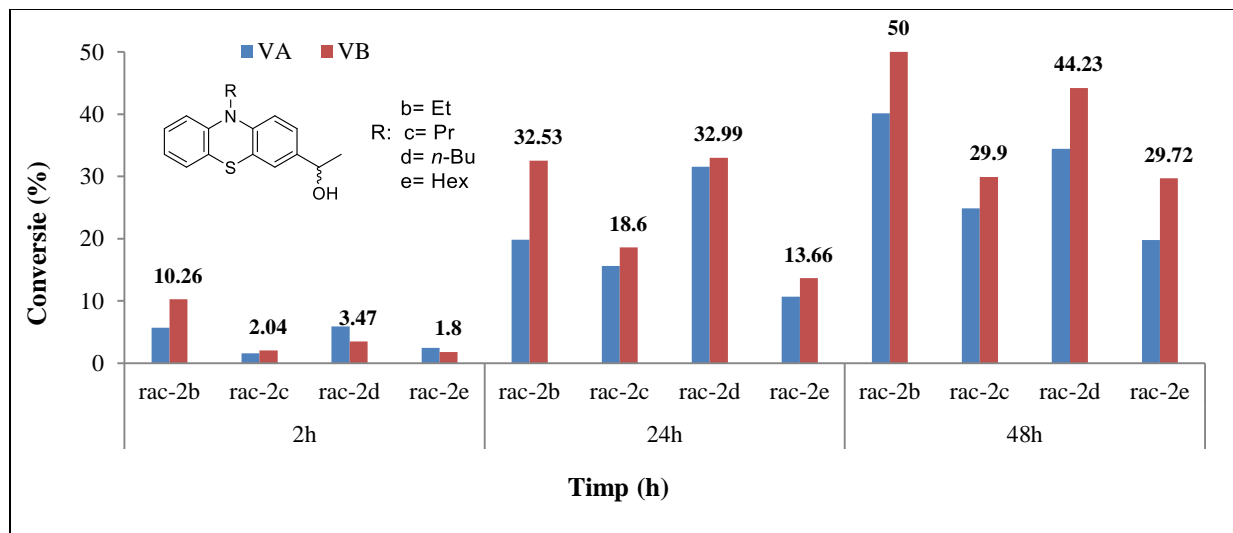


Figura 7. Rezoluția cinetică enzimatică (EKR) a *N*-alchil-fenotiazin-3-il-1-etanoliilor racemici cu agenții de acilare: acetat de vinil (VA) și butanoat de vinil (VB).

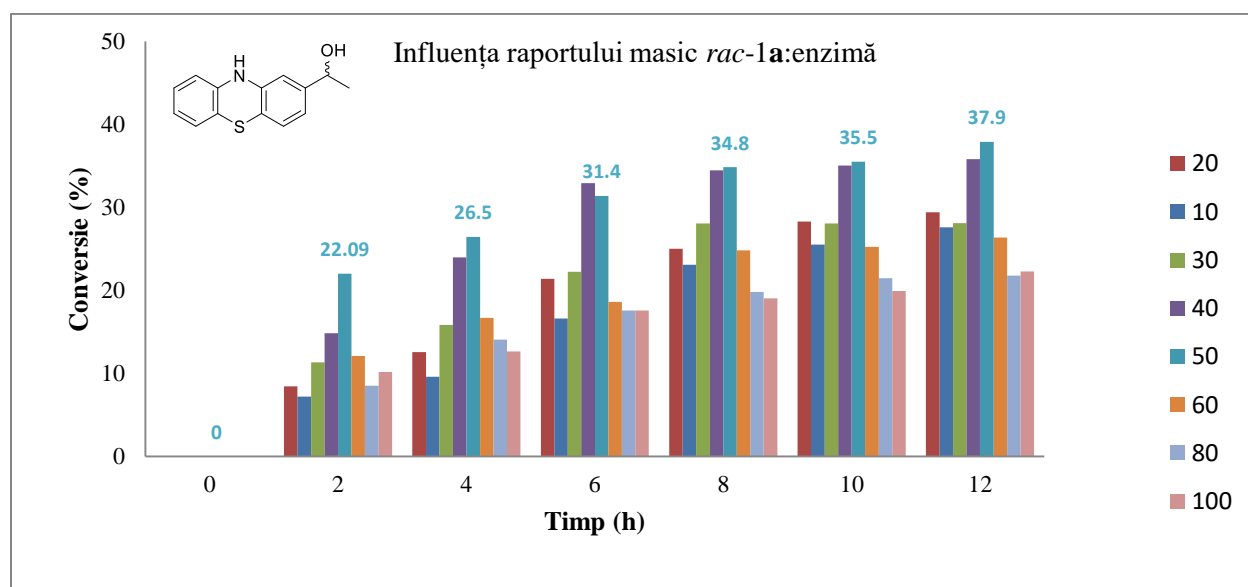


Figura 8. Influența raportului masic asupra conversiei *rac-1a*.

În cazul *N*-etil-fenotiazin-2-il-1-etanoliului, *rac-1b*, cea mai mare conversie a fost obținută la un raport masic substrat:enzimă de 30:1 ($c = 49,8\%$). După cum ne așteptam, conversia a crescut în comparație cu cea la cel mai mic raport utilizat (10:1) (Figura 9).

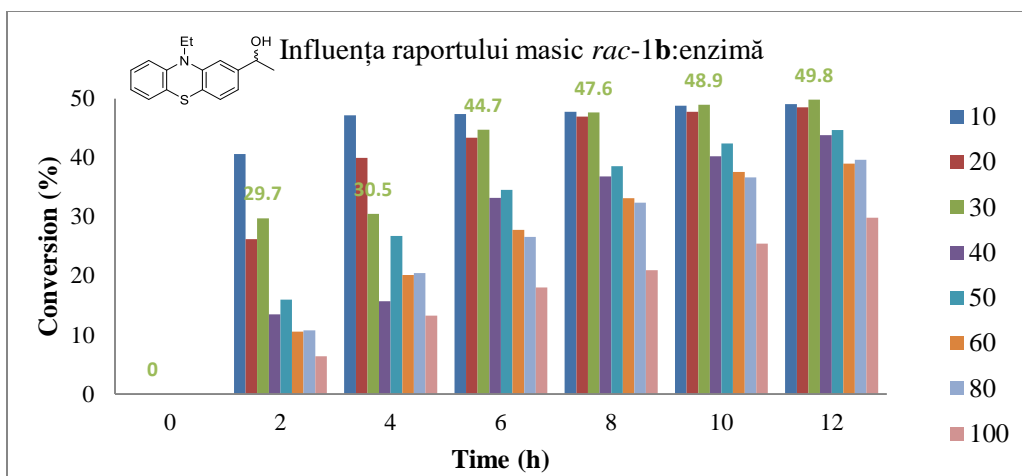


Figura 9. Influența raportului masic asupra conversiei *rac-1b*.

Pentru *N*-propil-fenotiazin-2-il-1-etanolul, conversia pentru rapoartele 10:1 și 40:1 este comparabilă, 42,57%, respectiv 42,2% (**Figura 10**).

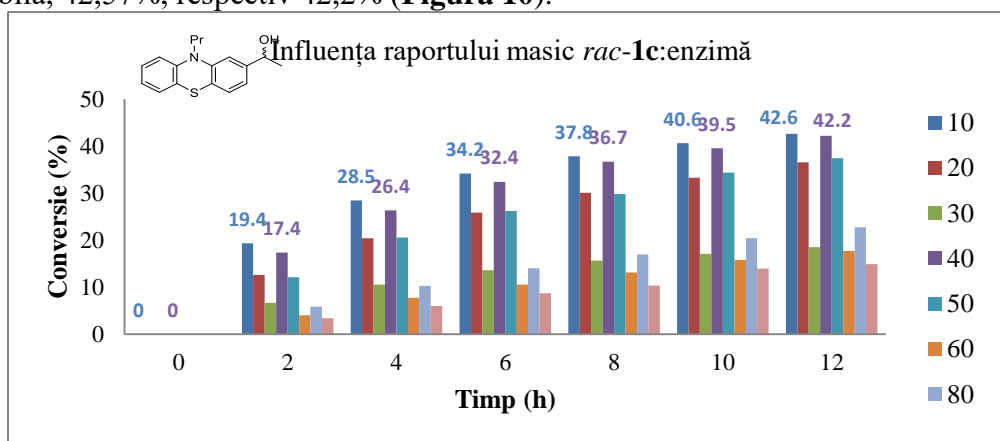


Figura 10. Influența raportului masic asupra conversiei *rac-1c*.

Excepția în acest studiu a fost derivatul *N*-butil (*rac-1d*), când a fost atinsă conversia maximă aproximativă, indiferent de raportul masic substrat-enzimă utilizat (**Figura 11**).

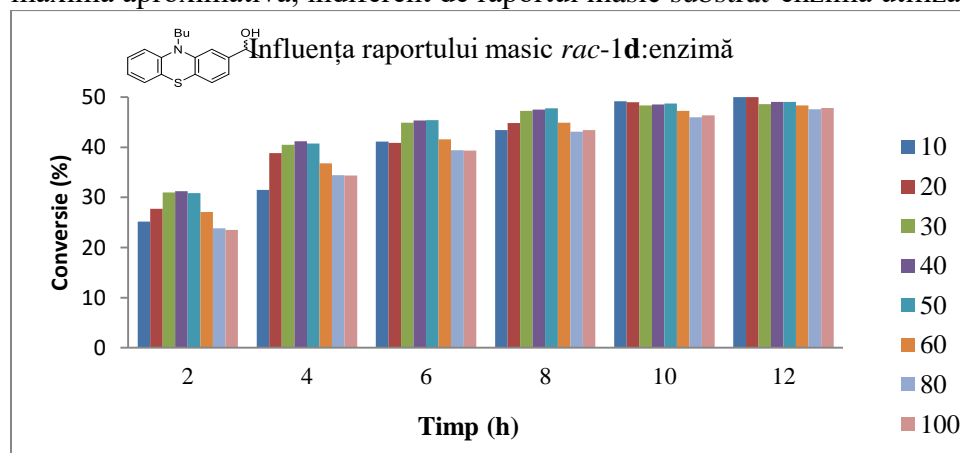


Figura 11. Influența raportului masic asupra conversiei *rac-1d*.

În cazul derivatului *N*-hexil, *rac-1e*, substratul a fost transformat în cantități nesemnificative chiar și la cea mai mică concentrație (conversie de 2,7%) (Figura 12).

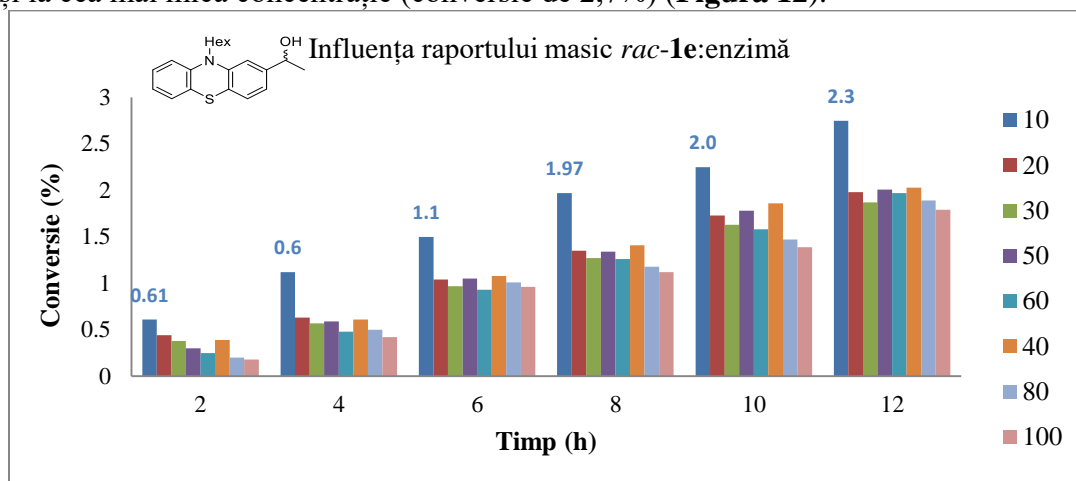


Figura 12. Influența raportului masic asupra conversiei *rac-1e*.

În seria fenotiazin-2-il-1-etanolilor, s-a obținut o conversie maximă de 50% pentru *N*-etil derivatul (*rac-1b*), raport masic substrat:enzimă = 10:1 și s-a obținut $c > 47,5\%$ pentru *N*-butil derivatul (*rac-1d*), indiferent de raportul substrat:enzimă utilizat, în 10-12 ore, în timp ce *N*-propil derivatul (*rac-1c*) și fenotiazin-2-il-1-etanolul nesubstituit (*rac-1a*) au fost transformați mult mai lent. Pentru *rac-1e*, care poartă o grupare hexil voluminoasă la atomul de azot, conversia rămâne scăzută chiar și după 12 ore (aproximativ 2,8%). Pentru a îmbunătăți activitatea biocatalizatorului, acesta a fost testat și în EKR al *rac-1d* folosind ca agent de acilare butanoatul de vinil, dar nici după 72 de ore reacția nu a atins conversia maximă, doar 47%.

Pe baza acestor rezultate, s-a ajuns la concluzia că noul bioconjugat prezintă o activitate bună în EKR a substraturilor mari, dar pentru moleculele cu o grupare alchil mai lungă decât butil interacțiunea substratului cu enzima este mai slabă.

Noul bioconjugat a fost testat în EKR a unei serii de fenotiazin-3-il-1-etanoli (*rac-2b-e*). Când s-a folosit acetatul de vinil ca agent de acilare, conversiile obținute au fost moderate până la modeste, după 48 de ore. Având aceste valori ale conversiei, butanoatul de vinil a fost de asemenea testat ca și agent de acilare pentru fenotiazin-3-il-1-etanoli (*rac-2b-e*). S-au observat îmbunătățiri pentru toate substraturile, conversiile obținute au fost mai mari cu 5-10% decât cele obținute când a fost utilizat ca și agent de acilare acetatul de vinil. Conversia maximă a fost obținută în cazul *rac-2b* (derivat de etil) după 48 de ore.

Acetatul de vinil a fost folosit ca agent de acilare în toate experimentele datorită prețului ridicat al butanoatului de vinil. După cum era de așteptat, la concentrații mai mici de substrat, s-au obținut conversii bune pentru *rac-2b* (aproximativ 40%, după 48 de ore). Conversia urmează același model ca și cel descris mai sus, scăzând odată cu creșterea lanțului alchil, cu excepția 1-(10-butyl-10*H*-fenotiazin-3-il)-etan-1-ol-ului (*rac-2d*) (Figura 13).

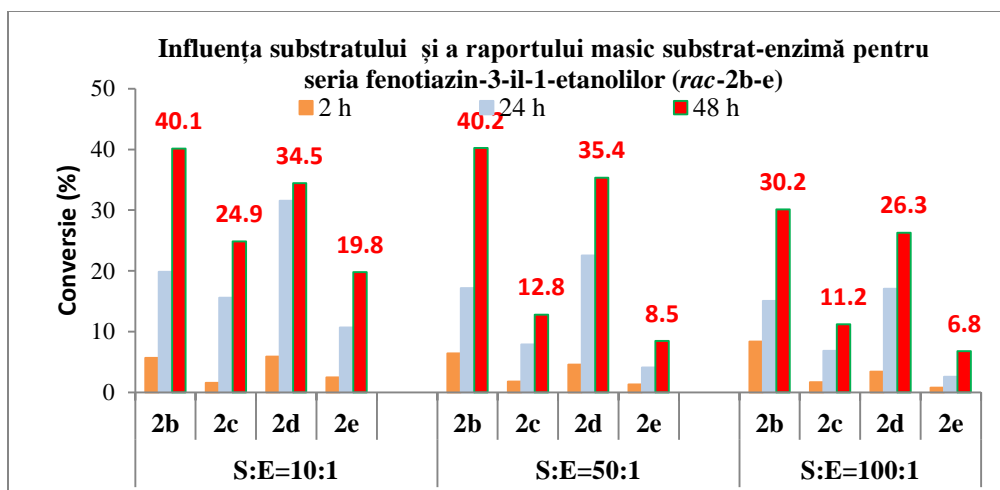


Figura 13. Influența substratului și a raportului masic substrat-enzimă pentru seria fenotiazin-3-il-1-etanolilor (*rac-2b-e*).

4.2.2.4. Studii de reutilizare

Reciclabilitatea și stabilitatea fiecărui preparat enzimatic nou este o cerință importantă în orice proces, permițând dezvoltarea sustenabilității acestuia. Reutilizabilitatea acestui nou bioconjugat de CaL-B a fost studiată în acilarea enantioselectivă a *rac-1d* cu acetat de vinil ca și agent de acilare și un raport masic substrat:enzimă de 10:1. După cum este prezentat în **Figura 14**, activitatea sa rămâne ridicată chiar și după 10 cicluri, scăzând cu mai puțin de 3%. În consecință, stabilitatea operațională și pe termen lung face ca acest biocatalizator să fie promițător în sistemul de flux continuu, permițând o productivitate mai mare. Probele au fost prelevate după 30 de minute și analizate la HPLC.

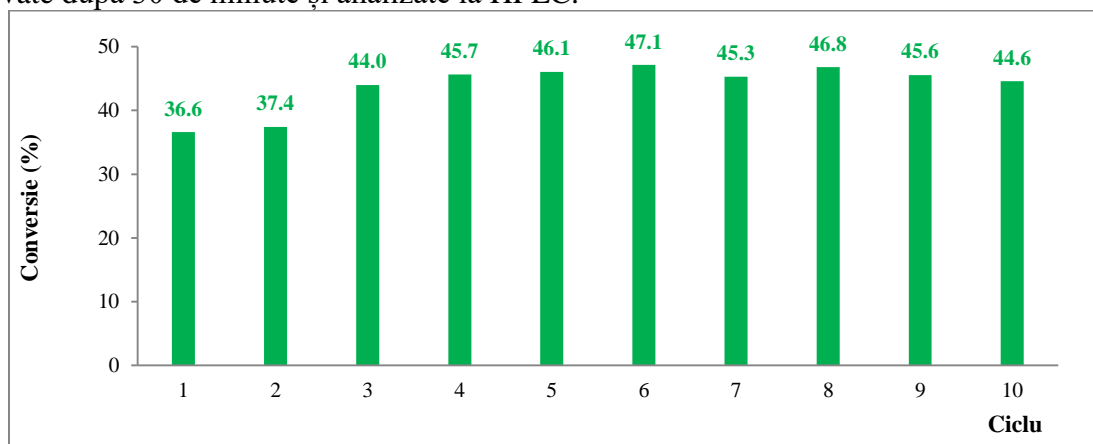


Figura 14. Reutilizarea PVA-CS-CaL-B în EKR a *rac-1d* (timp de reacție 30 min).

4.2.3. Concluzii

Imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* prin captare în nanofibrele electrofilate PVA-CS reprezintă o alternativă promițătoare pentru prepararea unui bioconjugat cu suprafață mare, activ și stabil, care conține enzima prinsă într-o membrană, eficient în EKR a fenotiazin-etanolilor racemici voluminoși, în comparație cu rezultatele raportate anterior (timp de reacție 19-24 ore și raport 1:2 substrat:biocatalizator) [99,100]. Ca urmare a dispersiei fine a enzimei în matricea polimerică și a suprafeței mari a nanofibrelor rezultate, s-a observat o creștere semnificativă a activității sintetice a lipazei în comparație cu alte preparate (lipază adsorbită pe perle de poliacrilamidă - Novozyme 435 sau legată covalent nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan). Mai mult, acest studiu demonstrează pentru prima dată că, captarea lipazei PVA-CS

este potrivită pentru a forma biocatalizatori membranari cu activitate ridicată, selectivitate și stabilitate excelentă pentru aplicare sintetică, obținând valori mari de conversie pentru substraturi voluminoase care conțin schelet de fenotiazină cu un raport masic substrat:enzimă de cel puțin 10:1 și timp de reacție relativ scurt (aproximativ 12 ore). În același timp, enzima și-a păstrat mai mult de 97% din activitatea sa chiar și după 10 cicluri de reacție, făcând-ul un candidat promițător pentru aplicații cu flux continuu.

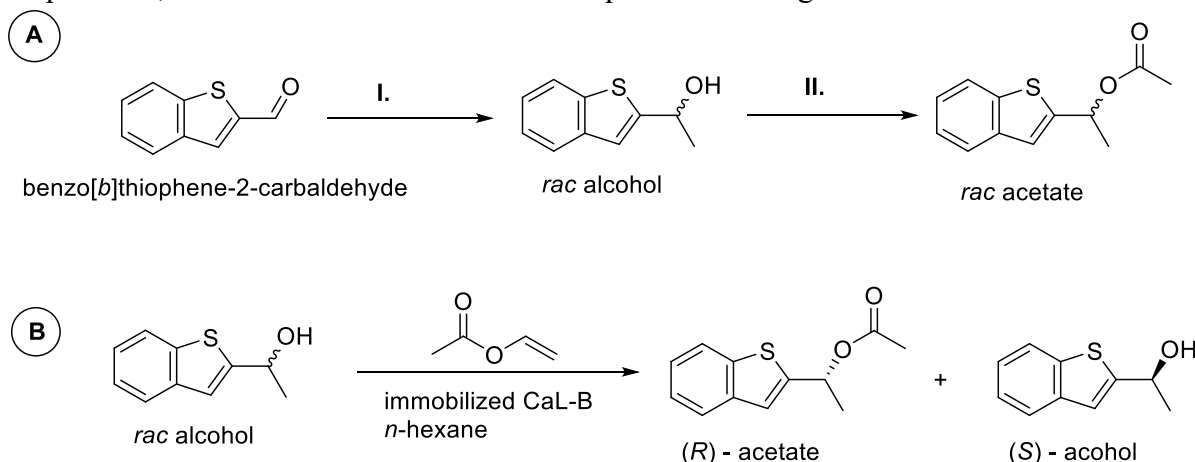
4.3. Nanocompozite de CaL-B bazate pe nanofibre biopolimerice de PLA/PVA

4.3.1. Introducere

4.3.2. Rezultate și discuții

4.3.2.1. Sinteza chimică a 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului racemic

1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolul racemic a fost sintetizat folosind metode cunoscute [94-97]. 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolul racemic a fost obținut prin reacția Grignard din aldehida corespunzătoare (**Schema 6A**). Etanolul racemic obținut a fost utilizat ca și substrat în reacția de *O*-transesterificare (**Schema 6B**), dar și ca materie primă pentru sinteza chimică a acetatului corespunzător, în vederea stabilirii metodei de separare cromatografică.



I. Et₂O, argon, MeMgI (2Eq.), o.n., r.t.

II. Cl-CO-CH₃, 1% DMAP-Pyridine, DCM

Schema 6. A. Sinteza chimică a *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului și acetatul acestuia; **B.** Transesterificarea selectivă enantiomerică a *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului mediată de CaL-B imobilizat.

4.3.2.2. Imobilizarea CaL-B-ului prin adsorbție și includere în nanofibre de PLA și PVA

Cele mai utilizate metode de imobilizare în industrie sunt adsorbția fizică, includerea, reticularea și legarea covalentă, primele două fiind preferate datorită raportului preț-cost eficiență. [79]. Reticularea implică atât includerea, cât și legarea covalentă folosind agenți chimici specifici, cel mai adesea vapori de glutaraldehidă. După legarea prin adsorbție fizică, moleculele enzimatice își mențin conformația inițială și, de obicei, biocatalizatorul rezultat prezintă activitate ridicată.

Metoda de captare a enzimelor protejează biocatalizatorul, permite transportul compușilor cu masă moleculară mică, poate fi utilizată în regim continuu, se separă ușor din mediul de reacție și permite eliberarea controlată a produsului. Cu toate acestea, acest tip de imobilizare prezintă limitări de transfer de masă și încărcare scăzută cu molecule de enzimă. În plus, moleculele de enzimă pot crea o structură compactă schimbând scheletul nanofibrelor, făcându-le imposibil de utilizat ca și catalizator în multe cazuri [66].

4.3.2.3. Caracterizarea morfologică a nanofibrelor

Nanofibrele obținute au fost analizate prin microscopie electronică de transmisie (TEM). Au fost confirmate nanodimensiunile fibrelor, având un diametru între 126 și 439 nm (**Figura 15A**). În imaginile înregistrate înainte (**Figura 15B**) și după (**Figura 15C**) imobilizarea CaL-B pe nanofibre PLA prin adsorbție, s-a confirmat prezența moleculelor de enzime la suprafața nanofibrelor și s-au observat unele modificări structurale precum conglomerate neregulate pe suprafața nanofibrelor.

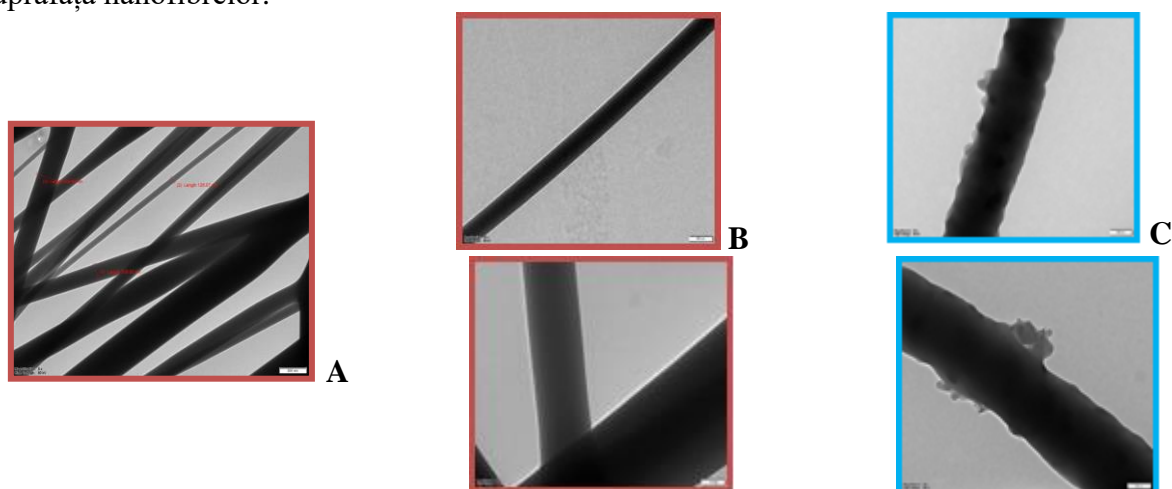


Figura 15. A. Lungimea fibrelor PLA în intervalul 126–439 nm, folosind o mărire de 6× (500 nm) și tensiune înaltă (80kV); B. Omogenitatea nanofibrelor PLA și distribuția uniformă, cu o mărire de 20× (100 nm) și înaltă tensiune (80kV); C. Imaginile TEM ale noului biocatalizator format din nanofibre PLA și CaL-B adsorbit pe suprafața lor, cu o mărire de 20× (100 nm) și de înaltă tensiune (80kV).

Includerea CaL-B-ului în nanofibrele de PLA (**Figura 16A**) folosind o procedură descrisă în literatură [68], a condus în experimentele noastre la o structură compactă, determinată prin microscopie electronică cu scanare (SEM), (**Figura 16B**), care probabil nu permit trecerea moleculelor organice, pentru a interacționa cu enzima inclusă.

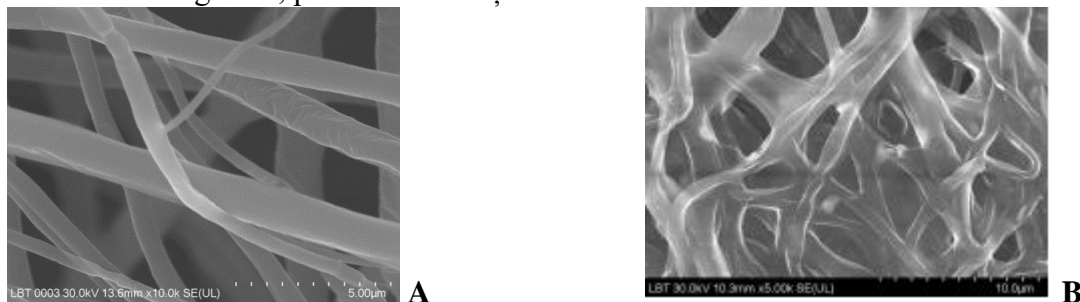


Figura 16. A. Nanofibre de PLA fără enzimă; B. Nanofibre de PLA cu molecule de CaL-B incluse.

Au fost obținute șase preparate enzimatiche: patru pe bază de nanofibre din PVA (8 și 10% g/v) (unul prin captarea enzimei și trei prin adsorbție) și două pe bază de nanofibre din PLA (8% g/v): unul prin adsorbție și unul prin includere în membrană. Toți cei șase biocatalizatori enzimatici au fost testați în EKR al *rac*-benzo[b]tiofen-2-il-etanolului.

4.2.3.4. EKR a benzo[b]tiofen-2-il-etanolului racemic în sistem discontinuu

4.2.3.4.1. Biocatalizatorii bazați pe nanofibre din PVA

Activitatea și selectivitatea celor patru biocatalizatori pe bază de nanofibre din PVA au fost testați în *O*-acilarea 1-benzo[b]tiofen-2-il-etanolului racemic prin transesterificare cu acetat de vinil. Pentru a îmbunătăți productivitatea procesului, s-au folosit două rapoarte masice substrat:enzimă (8:1 și 10:1) în *n*-hexan ca solvent, la 30 °C și 4 echiv. de acetat de vinil (**Figura 17**). Probele au fost prelevate la fiecare două ore, până când reacția a atins conversia maximă ($c=50\%$) cu excese enantiomerice mari (ee_S și $ee_P >99,9\%$).

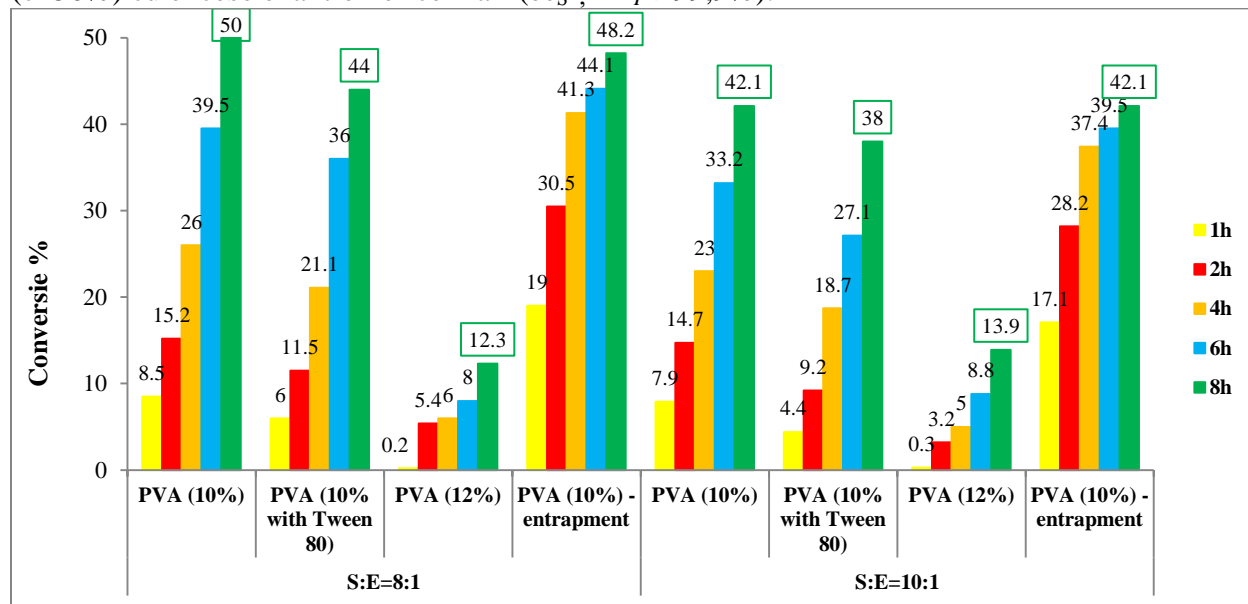


Figura 17. Influența raportului masic substrat:enzimă asupra transesterificării *rac* 1-benzo[b]-tiofen-2-il-etanolului cu acetat de vinil (4 echiv.) în *n*-hexan, mediată de biocatalizatori pe bază de PVA.

Conform datelor experimentale, cel mai bun preparat a fost cel în care enzimă a fost immobilizată prin adsorbție pe nanofibre de PVA obținute dintr-o soluție de polimer 10%. În cazul CaL-B-ului adsorbit pe nanofibre preparate din soluție de PVA 12%, conversiile au fost mult mai mici. Acest rezultat ar putea fi explicat prin concentrația crescută de polimer și un transfer de masă limitat, ceea ce face ca accesul substratului la locul catalitic al enzimei să fie problematic sau printr-o încărcare mai mare a enzimei, ceea ce duce la conglomerate de molecule ale enzimei, scăzând activitatea acestora.

Pentru a găsi parametrii optimi, a fost studiată și influența raportului substrat:acetat de vinil în EKR mediată de cel mai bun preparat cu PVA. Reacțiile au fost monitorizate prin prelevarea de probe la fiecare două ore până la atingerea conversiei maxime. După cum s-a stabilit deja, cel mai bun biocatalizator a atins conversia de 50% după 8 ore când s-au folosit 4 echiv. acetat de vinil. Cu 2 echiv. reacția a atins doar o conversie de 36,8% după 8 ore.

4.2.3.4.2. Biocatalizatorii bazați pe nanofibre din PLA

Preparatele pe bază de nanofibre din PLA au fost de asemenea testați în *O*-transesterificarea *rac* 1-benzo[b]-tiofen-2-il-etanolului cu acetat de vinil ca și agent de acilare și raportul masic substrat:enzimă determinat anterior de 8:1. Probele au fost prelevate periodic, până când reacția a atins conversia maximă (50%) (**Figura 18**), cu excese enantiomerice mari (ee_S și $ee_P >99,9\%$).

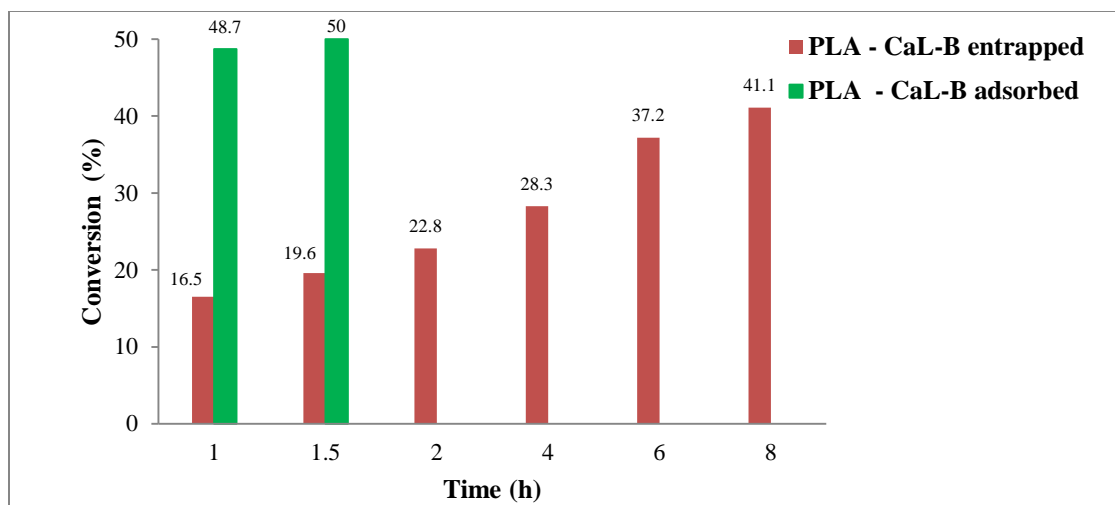


Figura 18. Influența metodei de imobilizare asupra *O*-transesterificării *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului cu acetatul de vinil (2 echiv.) în *n*-hexan, mediată de biocatalizatori pe bază de PLA.

Pe baza datelor experimentale, preparatul format din nanofibre de PLA obținut prin adsorbția lipazei pe nanofibrele polimerice a fost determinat ca cel optim. Conversia maximă a fost atinsă într-o perioadă de timp relativ scurtă (1.5 ore), în comparație cu preparatul obținut prin includerea enzimei în nanofibre, când 41% conversie a fost atinsă în 8 ore. O posibilă explicație ar putea fi conglomeratele enzimatică observate în imaginile SEM (vezi **Figura 16B**), ducând la o scădere a mobilității enzimei care a fost inclusă în rețeaua polimerică, rezultând și la o scădere a activității acesteia. În plus, moleculele substratului trebuie să traverseze membrana polimerică hidrofobă pentru a accesa situsul catalitic al enzimei, iar în timpul acestei treceri, moleculele de polimer pot interacționa cu substratul.

În continuare, având condițiile optime determinate anterior: *n*-hexan ca și solvent, acetatul de vinil ca și agent de acilare, raport masic substrat:enzimă (g/g) de 8:1 și temperatura 30 °C, s-a studiat influența raportului substrat:acetat de vinil folosind 2 și 4 echiv. de agent de acilare. Astfel, atunci când a fost utilizat biocatalizatorul din nanofibre PLA, raportul optim a fost de 2 echiv. de acetat de vinil, conversia maximă fiind atinsă în 1.5 ore, comparativ cu 6 ore când 4 echiv. au fost folosiți. Deoarece preparatul enzimatic având ca și schelet nanofibre din PLA a fost cel mai activ dintre cei șase biocatalizatori, atingând conversia maximă în reacția de *O*-transesterificare a *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului în cea mai scurtă perioadă de timp, necesitând doar 2 echiv. de acetat de vinil, acest biocatalizator a fost ales pentru experimentele de recirculare.

4.2.3.4.3. Studii de reutilizare

Acilarea enantioselectivă a 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului racemic cu acetat de vinil a fost utilizată suplimentar pentru testarea reutilizabilității biocatalizatorului (timp de reacție 1 oră). Reacția a fost efectuată de 10 ori consecutiv, enzima imobilizată fiind separată și spălată cu *n*-hexan (3 x 0,5 ml) după fiecare ciclu și imediat utilizată în următorul. După cum este prezentată în **Figura 19**, activitatea sa rămâne ridicată chiar și după 10 cicluri, scăzând cu mai puțin de 12%. În concluzie, stabilitatea operațională pe termen lung face ca acest biocatalizator activ să fie promițător în sistemul de flux continuu, permițând o productivitate mai mare.

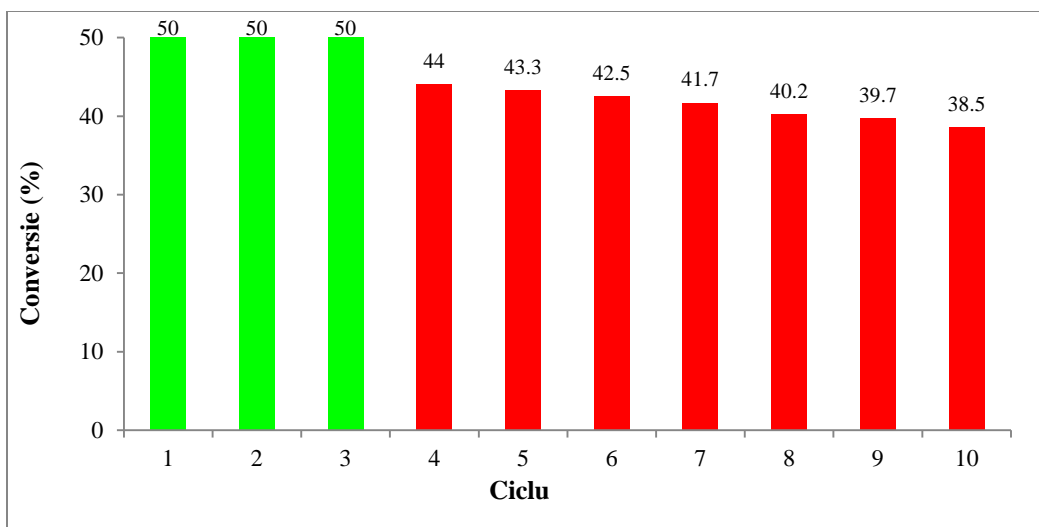
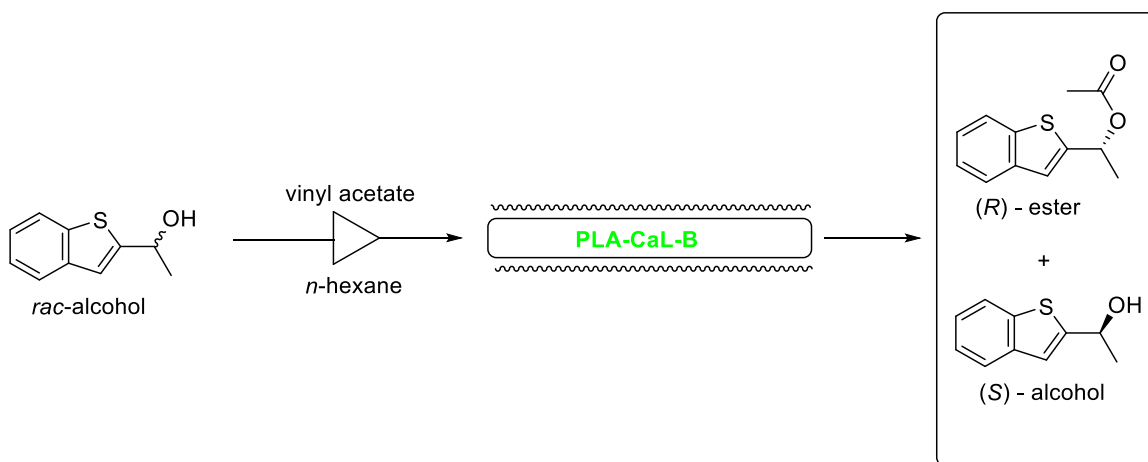


Figura 19. Reutilizarea PLA-CaL-B obținut prin adsorbție, utilizat în EKR a *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului (după 1 oră de reacție) cu acetat de vinil (2 echiv.) în *n*-hexan la 30 °C.

4.2.3.5. O-Acilarea Mediată de PLA-CaL-B a 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului cu Acetat de Vinil în Flux Continuu

În vederea creșterii eficienței procesului biocatalitic, cel mai bun bioconjugat al CaL-B-ului pe bază de nanofibre polimerice (PLA-CaL-B) a fost testat în experimente cu flux continuu, utilizând un reactor compactat (30×4,6 mm) în O-amilarea *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului cu acetat de vinil (2 echiv.) în *n*-hexan, folosind o concentrație a substratului de 8 mg/mL (**Schema 7**). Au fost investigați doi dintre cei mai importanți parametri care influențează productivitatea în sistemul cu flux continuu: temperatura și debitul.



Schema 7. O-amilare mediată de lipază a 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului racemic în reactor cu compactat în flux continuu.

Procesul a fost investigat la diferite debite în intervalul 0,2–0,5 mL/min și diferite temperaturi în intervalul 30–50 °C, utilizând o concentrație de substrat de 8 mg/mL și 2 echiv. de acetat de vinil. În toate cele patru cazuri, conversia a crescut odată cu temperatura, conversia maximă fiind atinsă la 50 °C la debite de 0,2 și 0,3 mL/min. După cum se observă în **Figura 20**, influența temperaturii este relativ nesemnificativă la un debit constant de 0,2 mL/min. La debitul de 0,3 mL/min, există o ușoară creștere de la 46% la conversia maximă de 50%. În cazurile

debitelor mai mari, 0,4 și respectiv 0,5, s-a observat o ușoară creștere, de la 38% la 43% la 0,4 mL/min și 35% la 41% pentru debitul de 0,5 mL/min odată cu creșterea temperaturii. În concluzie, atunci când se utilizează debite mai mici, o temperatură crescută nu este justificată, ci doar va crește costul total al procesului. După cum era de așteptat, conversia a crescut odată cu temperatura, dar a scăzut odată cu creșterea debitului.

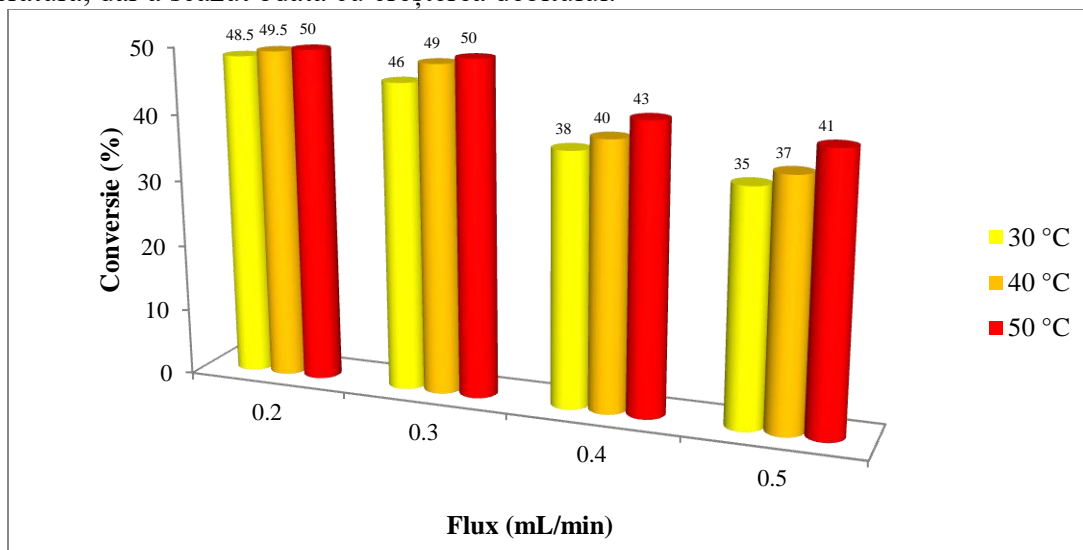


Figura 20. Influența temperaturii la debite constante asupra EKR în flux continuu al *rac* 1-benzo[*b*]tiofen-2-il-etanolului cu acetat de vinil (2 echiv.) în *n*-hexan.

4.3.3. Concluzii

Acest studiu a demonstrat că, compozitele bazate pe nanofibre ale CaL-B-ului, obținute prin adsorbție permit dezvoltarea unui biocatalizator stabil și activ pentru rezoluția cinetică enzimatică a heteroariletanolilor cu un schelet voluminos. Biocatalizatorul pe bază de nanofibre din PLA s-a dovedit a fi cel mai eficient, atingând conversia maximă (50%) în cea mai scurtă perioadă de timp (1.5 ore). Stabilitatea operațională a acestui preparat a fost studiată în experimente de reutilizare, păstrându-și 77% din activitatea sa inițială, făcându-l un candidat valoros pentru investigații în flux continuu. Au fost investigați doi parametri care pot influența viteza de reacție: temperatura (30–50 °C) și debitul (0,2–0,5 mL/min), menținând constantă concentrația substratului (8 mg/mL). Datele experimentale obținute au confirmat tendința așteptată în ceea ce privește viteza de reacție: conversia a crescut odată cu temperatura, atingând maximum la 50 °C, când au fost utilizate debite mai mici (0,2–0,3 mL/min). Totodată, a fost confirmată și influența debitului asupra vitezei de reacție, ultima scăzând cu 18–28% odată cu creșterea debitului.

5. Partea Experimentală

6. Concluzii

Studiile efectuate în prezenta teză prezintă optimizarea proceselor de rezoluție cinetică mediate de lipază folosind diferiți heteroarilalcooli secundari în ceea ce privește stabilitatea, activitatea și productivitatea preparatelor enzimatiche utilizate ca și catalizatori.

Șase preparate enzimatiche de CaL-B au fost obținute prin imobilizare covalentă pe nanoparticule magnetice acoperite cu chitosan (MNP-CS) folosind diferiți linkeri și brațe distanțiere. Cel mai activ preparat a fost cel obținut cu clorură de sebacoil ca și braț distanțier,

prezentând o activitate sintetică similară cu forma disponibilă comercial de CaL-B (Novozym 435). După stabilirea parametrilor optimi (45 °C, *n*-hexan ca solvent, acetat de vinil ca și agent de acilare, raport masic optim substrat:enzimă (5:1) și raportul optim substrat:acetat de vinil (1:2), preparatul a fost testat pe o serie de alcooli heretoaromatici secundari, obținându-se valori mari ale conversiei ($c > 49\%$) și exces enantiomeric de produs maxim ($ee_p > 99,9\%$) în timp de reacție relativ scurt (3–16 h). În același timp, s-a demonstrat că natura agentului de acilare influențează activitatea enzimei imobilizate. Pe baza conversiilor promițătoare în timp de reacții relativ scurți, reutilizarea acestui preparat a fost testată și în reacțiile de transesterificare ale *rac-2e* (1-benzo[*b*] tiofen-2-il-etanolului) și *rac-2i* (*N*-etil-fenotiazinil-3-etanolului). Biocatalizatorul nou dezvoltat a prezentat o stabilitate și activitate foarte bune (după un timp de reacție total de 10 ore, respectiv 100 ore), activitatea scăzând cu mai puțin de 5% după 10 cicluri, făcându-l un candidat promițător pentru procesele EKR în sistem continuu.

A fost sintetizat un preparat enzimatic obținut prin includerea enzimei folosind tehnica electrofilării, utilizându-se nanofibre de chitosan-PVA ca suport de imobilizare. După găsirea raportului optim între cei doi polimeri, fibrele obținute au fost analizate și caracterizate și s-a determinat activitatea sintetică a bioconjugatului, obținându-se o valoare de $6,1 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}_{\text{biocatalizator}}^{-1}$ (de trei ori mai mare decât Novozym 435 sau MNP-CS-SC-CaL-B). S-a studiat stabilitatea preparatului în solvenți organici și s-a constatat că *n*-hexanul este solventul optim. Acest nou bioconjugat de CaL-B a fost studiat în EKR a două serii de etanoli secundari fenotiazinil racemici: *N*-alchil-fenotiazin-2-il-1-etanoli și *N*-alchil-fenotiazin-3-il-1-etanoli. Toate substraturile au fost sintetizate conform literaturii, alături de noii derivați *N*-hexil pentru fiecare serie, care nu au fost raportați anterior. Bioconjugatul PVA-CS-CaL-B a prezentat o activitate ridicată în seria *N*-alchil-fenotiazin-2-il-etanolilor, obținându-se conversii bune pentru derivații de etil, propil și butil într-un timp relativ scurt (10-12 ore). În ceea ce privește seria *N*-alchil-fenotiazin-3-il-etanolii s-a observat că acetatul de vinil nu a fost agentul de acilare optim, conversiile au fost mai mici de 40%, chiar și cu un timp de reacție mai mare (48 ore), butanoatul de vinil a fost testat în continuare și obținându-se conversii mai ridicate (5–10%) în cazul tuturor derivaților după 48 de ore.

Reutilizarea acestui preparat a fost testată în EKR al *rac-1d* (*N*-butil-fenotiazin-2-il-1-etanol). Biocatalizatorul și-a menținut activitatea chiar și după 10 cicluri (timp de reacție 30 min pentru fiecare ciclu), cu o pierdere de activitate mai mică de 3%, făcându-l un candidat promițător pentru studiile de flux continuu.

CaL-B a fost, de asemenea, imobilizat prin metode de includere și adsorbție în/pe nanofibre din PLA și PVA, obținute prin tehnica electrofilării.

Biocatalizatorii obținuți au fost testați în EKR al *rac-1-benzo[*b*]-tiofen-2-il-etanolul* cu acetat de vinil ca și agent de acilare și *n*-hexan ca solvent la temperatura de 30 °C. Pe baza rezultatelor obținute, cel mai performant biocatalizator (bazat pe nanofibre PLA) a fost testat în continuare în experimente de reutilizare, folosind 2 echiv. de acetat de vinil și un raport masic substrat:enzimă de 8:1. Pe baza rezultatelor promițătoare obținute în sistemul discontinuu, acest preparat a fost utilizat în continuare în procesul cu flux continuu. Au fost studiați doi parametri de proces: temperatura (30–50 °C) și debitul (0,2–0,5 ml/min). Pe baza rezultatelor obținute, s-a observat că, conversia crește odată cu temperatura, atingând maximum la 50 °C, când s-au folosit debite mai mici (0,2–0,3 mL/min). S-a confirmat și influența debitului asupra vitezei de reacție, ultima scăzând cu 18–28% odată cu creșterea debitului (0,4–0,5 mL/min).

7. Bibliografie

1. A. Illanes, A. Cauerhff, L. Wilson and G.R. Castro, *Bioresour. Technol.* **2012**, *15*, 48–57.
2. A.Pellis, S. Cantone, C. Ebert and L. Gardossi, *New Biotechnol.* **2018**, *40*, 154–169.
3. R.A. Sheldon and J.M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.
4. G. Torrelo, U. Hanefeld and F. Hollmann, *Catal. Lett.* **2015**, *145*, 309–345.
5. A.M. Klibanov, *Nature* **2001**, *409*, 241–246.
6. K.M. Keller and C.H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232–240.
7. A. Kamal, M.A. Azhor, T. Krishnaji, M.S. Malik and S. Azeza, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 569–592.
8. V. Stepankova, S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, J. Chaloupkova and J. Damborsky, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2823–2836.
9. S. Riva, *Exploiting Enzyme Chemoselectivity and Regioselectivity In Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, G. Carrea and S. Riva, Eds., Wiley: Hoboken, NJ, USA, **2008**, pp. 146–167.
10. S. Datta, L.R. Christena and Y.R.S. Rajaram, *Biotech.* **2013**, *3*, 1–9.
11. D. Brady and A. Jordan, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639–1650.
12. K. Popikova and I. Safariq, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *96*, 545–548.
13. C. Pan, B. Hu, W. Li, Y. Sun, H. Ye and X. Zeng, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61*, 208–215.
14. J. Xu, J. Sun, Y. Wong, J. Sheng, F. Wang and M. Sun, *Molecules* **2019**, *19*, 11465–11486.
15. T. Siódmiak, M. Ziegler-Borowska and M.P. Marszał, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *94*, 7–14.
16. A. Sikora, D. Chełminiak-Dudkiewicz, T. Siódmiak, A. Tarczykowska, W.D. Sroka, M. Ziegler-Borowska and M.P. Marszał, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2016**, *134*, 43–50.
17. J. Kress, R. Zanaletti, A. Amour, M. Ladlow, J.G. Frey and M. Bradley, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3769–3772.
18. J.D. Cui, L.L. Li and H.J. Bian, *PLoS One* **2013**, *8*, e80581.
19. C.-G. Spelmezan, L.C. Bencze, G. Katona, F.D. Irimie, C. Paisz and M.I. Toşa, *Molecules*, **2020**, *25*(2), 350.
20. A. Rafique, K.M. Zia, M. Zuber, S. Tabasun and S. Rehman, *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *87*, 141–154.
21. A. Çay, M. Miraftab and E.P.A. Kumbasar, *Eur. Polym. J.* **2014**, *61*, 253–262.
22. P.L. Sóti, D. Weisser, T. Vigh, Z.K. Nagy, L. Poppe and G. Marosi, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 449–459.
23. C.-G. Spelmezan, G. Katona, L.C. Bencze, C. Paisz and M.I. Toşa, *RSC Reaction Chemistry and Engineering*, **2023**, *8*, 1109–1116.
24. C.-G. Spelmezan, A. Bacoş and G. Katona, *Studia UBB Chemia*, **2023**, *LXVIII*, *2*, 53–71.
25. G.D. Yadav and A.H. Trivedi, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 783–789.
26. R. Sharma, Y. Christi and U.C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627–662.
27. P.C. de Jesus, M.C. Rezende and M. da Graça Nascimento, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 63–66.
28. C. Garcia-Golan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernández-Lafuente and R.C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885–2904.
29. S.A. Costa, H.S. Azevedo and R.L. Reis, *Enzyme immobilization in biodegradable polymer for biomedical applications In Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative*

- medicine*, R.L. Reis and J.S. Roma, Eds., CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, **2005**, pp.: 301–323.
30. G. Taylor, *Proc. R. Soc. Lond. A: Math. Phys. Eng. Sci.* **1969**, *313*, 453–475.
 31. D. Yi, T. Boyer, C.P.S. Badenhorst, S.Wu, M.Doerr, M. Höhne and U.T. Bornscheuer, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 8003–8049.
 32. E.L. Bell, W. Finnigan, S.P. France, A.P. Green, M.A. Hayes, L.J. Hepworth, S.L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K.S. Ryan, N.J. Turner and S.L. Flitsch, *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, *1*, 46.
 33. A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Keiner, M. Wubbolts and B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
 34. U.T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543–547.
 35. A. Goswami and J.D. Stewart, *Organic Synthesis Using Biocatalysts*, Academic Press: Amsterdam, The Neatherlands, **2016**.
 36. P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M.E. Lesser and R. Miller, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 237–250.
 37. F.D. Irimie, *Elemente de Biochimie*, Erdelyi Híradó: Cluj-Napoca, Romania, **1998**.
 38. E. Abahazi, Z. Boros, D. Lestál and L. Poppe, *Molecules* **2016**, *21*, 767.
 39. M.T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145–150.
 40. K.-E. Jaeger and T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390–397.
 41. R.D. Schmid and R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1998**, *37*, 1608–1633.
 42. L.T. Kanerva and A. Liljebblad, *Transesterification –Biological In Encyclopedia of Catalysis*, Wiley: Hoboken, NJ, USA, **2010**.
 43. A. Ghanem, *Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates: a versatile method for the separation of enantiomers In Enantiomer Separation Fundamentals and Practical Methods*, F. Toda Ed., Springer: Dordrecht, The Neatherlands, **2004**, pp.: 193–230.
 44. A.I. Dudu, M.A. Lăcătuș, L.C. Bencze, C. Paizs, M.I. Toșa, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 5461-5469.
 45. M.A. Lăcătuș, A.I. Dudu, L.C. Bencze, G. Katona, F.-D. Irimie, C. Paizs, M.I. Toșa, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 1611-1617.
 46. K. Faber and S. Riva, *Synthesis* **1992**, *10*, 895–910.
 47. V. Gotor-Fernández and R. Brieva, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111–120.
 48. A. Mustranta, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 61–66.
 49. R.N. Patel, A. Banerjee, V. Nanduri, A. Goswami and F.T. Comezoglu, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 1015–1019.
 50. M. Singh, S. Singh, R.S. Singh, Y. Christi and U.C. Banerjee, *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 2116–2120.
 51. H.V. Ferreira, L.C. Rocha, R.P. Severino and A.L.M. Porto, *Molecules* **2012**, *17*, 8955–8967.
 52. V. Farina, J.T. Reeves, C.H. Senonoyoke and J.J. Song, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2734–2793.
 53. R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport and L.A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.
 54. Q. Jing and R.J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, *20*, 724–735.
 55. M. Cygler, P. Grochulski, R.J. Kazlauskas, J.D. Schrog, F. Bouthillier, B. Rubin, A.N. Serreqi and A.K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180–3186.
 56. N. Bashir, M.Saad and J.D. Bandaral, *Int. J. Chem. Stud.* **2020**, *8*, 254–261.
 57. A. Homaei, *Adv. Food Biotechnol.* **2016**, *1*, 145–164.
 58. B.C. Singh, *Biotechnology expanding horizons*, Kalyani Publishers: Ludhiana, India, **2010**.

59. S. Nisha, K.S.Arun and N. Gobi, *Chem. Sci. Rev. Lett.* **2012**, *1*, 148–155.
60. A. Sharma, K.S. Thatai, T. Kuthiala, G. Singh and S.K. Arya, *React. Funct. Polym.* **2021**, *167*, 105005.
61. R. Torres, C. Mateo, M. Fuentes, J.M. Palomo, C.Ortiz, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisan, A. Tam and M. Daminati, *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1221–1226.
62. K. Ovsejevi, C. Manta and F. Batista-Viera, *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1051*, 89–116.
63. M. Sardar, I. Ray and M.N. Gupta, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 672–679.
64. E. Jones, K. McClean, S. Housden, G.Gasparini and I. Archer, *Chem. Eng. Res. Des.* **2012**, *90*, 726–731.
65. G. Jas, and A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5708–5723.
66. I. Eş, J.D.G. Viera and A.C. Amaral, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 2065–2082.
67. M.P. Kamblead G.D. Yadav, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56*, 1750–1757.
68. J.C. Thomas, B.B. Aggio, A.R.M. Oliveira and L. Piovan, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 5964–5970.
69. I. Itabaiana, L.S.M. Miranda and R.O.M.A. de Souza, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85*, 1–9.
70. R.S. Keri, K. Chand, S. Budagumpi, S.B. Somappa, S.A. Patil and B.M. Nagaraja, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 1002–1033.
71. C.-H. Wu, L.-J. Bai, M.-H. Tsai, P.-C. Chu, C.-F. Chin, M.Y. Chen, S.-J. Chin, J.-H. Chiang and J.-R. Weng, *Sci. Rep.* **2016**, 27540.
72. A. Radadiya and A. Shah, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 356–376.
73. S.G. Dastidar, J.E. Kristiansen, J. Molnar and L. Amaral, *Antibiotics* **2013**, *2*, 58–72.
74. J. Kostantinović, M. Videnović, J. Srbljanović, O. Djurković-Djaković, K. Bogojević, R. Sciotti and B. Šolaja, *Molecules* **2017**, *22*, 343.
75. M.T. Chhabria, S. Patel, P. Modi and P.S. Brahmksatriya, *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2841–2862.
76. S. Ali, W. Zafar, S. Shafiq and M. Manzoor, *Int. J. Sci. Technol. Res.* **2017**, *6*, 64–72.
77. L. Cao, L. van Langen and R.A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 387–394.
78. A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello and R. Stevanato, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 185–205.
79. B.P. Dwivedee, J. Bhaumik, S.K. Rai, J.K. Laha and U.C. Banerjee, *Bioresour. Technol.* **2017**, *239*, 464–471.
80. A.C. Mathpati, V.K. Vyas and B.M. Bhanage, *J. Biotechnol.* **2017**, *262*, 1–10.
81. P. Torres-Salas, A. del Monte-Martinez, B. Cutiño-Avila, B. Rodriguez-Colina, M. Alcalde, A.O. Ballesteros and F.J. Plou, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5275–5282.
82. P. Nicolás, V. Lassalle and M.L. Ferreira, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 585–591.
83. Y.-C. Chang and D.-H. Chen, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *283*, 446–451.
84. F.-L. Mi, S.-J. Wu and Y.-C. Chen, *Carbohydr. Polym.* **2015**, *131*, 255–263.
85. J. Wang, W. Xu, L. Chen, X. Huang and J. Liu, *Chem. Eng. J.* **2014**, *251*, 25–34.
86. S. Nasirimoghaddam, S. Zeinali and S. Sabbaghi, *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *27*, 79–87.
87. X. Li, J. Wei, K.E. Aifantis, Y. Fan, Q. Feng, F.-Z. Cui and F. Watari, *J. Biomed. Mater. Res.* **2016**, *104*, 1285–1296.
88. S. Carregal-Romero, E. Caballero-Diaz, L. Beqa, A.M. Abdelmonem, M. Ochs, D. Huhn, B.S. Suau, M. Varcancel and W.J. Parak, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 53–81.
89. M. Iranifam, *Trend. Anal. Chem.* **2013**, *51*, 51–70.
90. V. Zamora-Mora, P.I.P. Soares, C. Echeverria, R. Hernández and C. Mijangos, *Gels* **2015**, *1*, 69–80.

91. D. Rivera, A.J. Schupper, A. Bouras, M. Anastasiadou, I. Kleinberg, D.L. Kraitchman, A.A. Haluri, R. Ivkov and C.G. Hadjipanoyis, *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2023**, *34*, 269–283.
92. P.V. Finotelli, D. da Silva, M. Sola-Penna, A.M. Rossi, M. Farina, L. Rodrigues-Andrade, A.Y. Takeuchi and M.H. Rocha-Leaõ, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *81*, 206–211.
93. S. Siavashy, M. Sottani, F. Ghorbani-Bidkorbek, N. Fallah, G. Farnam, S.A. Mortazavi, F.H. Shirazin and Md.H.H. Hamed, *Carbohydr. Polym.* **2021**, *265*, 118027.
94. T.N. Le, T.D. Tran and M.I. Kim, *Nanomaterials* **2020**, *10*, 92.
95. X. Wang, A. Deng, W. Cao, Q. Li, L. Wang, J. Zhou, B. Hu and X. Xing, *J. Mater. Sci.* **2018**, *53*, 6433–6449.
96. H. Veisi, S. Najafi and S. Hemmati, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 186–194.
97. C. Paizs, M.I. Toşa, V. Bódai, G. Szakács, I. Kmezc, B. Simándi, C. Majdik, L. Novák, F.-D. Irimie and L. Poppe, *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 1943–1949.
98. M.I. Toşa, S. Pilbák, P. Moldovan, C. Paizs, G. Szatzker, G. Szakács, L. Novák, F.-D. Irimie and L. Poppe, *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 1844–1852.
99. J. Brem, M.-I. Toşa, C. Paizs, A. Munceanu, D. Matcović-Čalogović and F.-D. Irimie, *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*, 1993–1998.
100. J. Brem, S. Pilbák, C. Paizs, G. Bánóczy, F.-D. Irimie, M.-I. Toşa and L. Poppe, *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22*, 916–923.
101. J. Zheng, X. Fu, X. Ying, Y. Zhang and Z. Wang, *Anal. Biochem.* **2014**, *452*, 13–15.
102. V. Pace, J.V. Sinisterra and A.R. Alcántara, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2384–2408.
103. C. Ortiz, M.L. Ferreira, O. Barbosa, J.C.S. dos Santos, R.C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L.E. Briand and R. Fernández-Lafuente, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380–2420.
104. R. Asmatulu and W.S. Khan, *Historical background of the electrospinning process In Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2019**, Chapter 2, pp.: 17–39.
105. T. Subbiah, G.S. Bhat, R.W. Tack, S. Parameswaran and S.S. Ramkumar, *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96*, 557–569.
106. M. Farockhi, F. Mottaghitalab, R.L. Reis, S. Ramakrishna and S.C. Kundu, *J. Control. Release* **2020**, *321*, 324–347.
107. D.H. Reneker and I. Chun, *Nanotechnol.* **1996**, *7*, 216–223.
108. W. Zhang, Z. He, Y. Han, Q. Jiang, C. Zhan, K. Zhang, Z. Li and R. Zhang, *Compos. Part A: Appl. Sci. Manuf.* **2020**, *137*, 106009.
109. L.Y. Yeo and J.R. Fried, *J. Exp. Nanosci.* **2006**, *1*, 177–209.
110. P.K. Baumgarthen, *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *36*, 71–79.
111. A. Kakoria, S. Sinho-Ray and S. Sinho-Ray, *Polymer* **2021**, *213*, 123333.
112. A.M. Al-Enizi, M.M. El-Halwany, S.F. Shaikh, B. Pandit and A. Yousef, *Arab. J. Chem.* **2022**, *15*, 104207.
113. M. Dehghani, M. Naseri, H. Nadeem, M.M.B. Holl and W. Batchelor, *J. Environ. Chem. Eng.* **2022**, *10*, 108686.
114. A. Detsi, E. Kavetsou, I. Kostopoulou, I. Pitterou, A.R.N. Pontilo, A. Tzani, P. Christodoulou, A. Siliachi and P. Zoumpoulakis, *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 669.
115. F. Tao, Y. Chen, X. Shi, H. Zhang, Y. Du, W. Xiang and H. Deng, *Carbohydr. Polym.* **2020**, *230*, 115658.
116. Md.M. Islam, Md. Shahruzzaman, S. Biswas, Md.N. Sakib and T.U. Rashid, *Bioact. Mater.* **2020**, *5*, 164–183.

117. S.B. Qasim, M.S. Zafar, S. Najeeb, Z. Khurshid, A.H. Shah, S. Husain and I.U. Rehman, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 407.
118. S.S. Narasagoudr, V.G. Hedge, R.B. Chougale, S.P. Masti, S. Vootla and R.B. Malabati, *Food Hydrocoll.* **2020**, *109*, 106096.
119. X. Chen, B. Lu, D. Zhou, M. Shao, W. Xu and Y. Zhou, *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *155*, 903–910.
120. K. Srisawat, W. Harnnarongchai, C. Sirisinha and K. Sirisinha, *Mater. Today: Proc.* **2023**, *77*, 1127–1131.
121. R. Ma, S. Wang, L. Ma, B. Li, Y. Hu, L. Zhang, L. Liu, J. Ma, Y. Fan, J. Yu and Z. Wang, *Ind. Crops Prod.* **2022**, *186*, 115217.
122. J.T. Orasugh, C. Pal, A.P. Samanta and D. Chattopadhyay, *Encyclopedia of Materials: Plastics and Polymers*, Elsevier: Amsterdam, The Neatherlands, **2022**, Volume 4, pp.: 837–859.
123. S. Jang, E.M. Go, J.-K. Kim, S.K. Kwak and J. Jin, *Compos. Part B. Eng.* **2022**, *247*, 110353.
124. M.B. Gelb, A. Punia, S. Sellers, P. Kadakia, J.D. Ormes, N.N. Khawaja, J. Wylie and M.S. Lamm, *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* **2022**, *68*, 103112.
125. A. Amani, S.T. Kalajahi, F. Yazdin, S. Mirzababaei, H. Rashedi, M.A. Famarazi and M. Vahidi, *Biotechnol. Prog.* **2022**, *38*, e3282.
126. Q. Wu, P. Soni and M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872–1881.
127. A. Liese, K. Seelbach, A. Buchholz and J. Haberland, *Industrial Biotransformations*, 2nd ed., Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2006**, pp.: 273–315.
128. A. Basso and S. Serban, *Mol. Catal.* **2019**, *479*, 110607.
129. E.M. Anderson, K.M. Larsson and O. Kirk, *Biocatal. Biotransformation* **1998**, *16*, 181–204.
130. A.D. Mosnaim, V.V. Ranade, M.E. Wolf, J. Puente and M.A. Valenzuela, *Am. J. Ther.* **2006**, *1*, 261–273.
131. M.K. Sharma, J. Machhi, P. Murumkar and M.R. Yadav, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1650.
132. M. Yuksel, K. Biberoglu, S. Onder, K.G. Akbulut and O. Tacol, *Biochimie* **2017**, *138*, 82–89.
133. J. Wang, Q. Niu, T. Wei, T.D. Li, T. Hu, J. Chen, X. Qin, Q. Yang and L. Yang, *Microchem. J.* **2020**, *157*, 104990.
134. J. Wang, Q. Niu, T. Hu, T. Li and T. Wei, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2019**, *348*, 112036.
135. T. Siódmiak, G.G. Haraldsson, J. Duleba, M. Ziegler-Borowska, J. Siómiak and M.P. Marzsał, *Catalysts* **2020**, *10*, 876.
136. D. Balogh-Weiser, C. Németh, F. Ender, B. Gyarmati, A. Szilágyi and L. Poppe, *Electrospun Nanofibers for Entrapment of Biomolecules, Electrospinning Method Used to Create Functional Nanocomposites Films*, 1st ed.; T.A. Tánski, P. Jarka and W. Matysiak Eds., IntechOpen: London, UK, **2018**.
137. A. Paiva, R. Caraveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis and A.R.C. Duarte, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 1036–1071.
138. J. Zdarta, A.S. Meyer, T. Jesionowski and M. Pinelo, *Catalysts* **2018**, *8*, 92.
139. A.H. Rather, R.S. Khan, T.U. Wani, M.A. Beight and F.A. Sheikh, *Biotechnol. Bioeng.* **2022**, *119*, 9–33.

140. P.H. Foroushani, E. Rahmani, I. Alemzadeh, M. Vossoughi, M. Pourmadadi, A. Rahda and A.M. Díez-Pascual, *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3426.
141. J.-H. Lin, B.-C. Shin, P.-W. Hsu, C.-W. Lou and J.-H. Lou, *Polymers* **2022**, *14*, 4470.
142. J. Wu, Q. Li, G. Su, R. Luo, D. Du, L. Xie, Z. Tang, J. Yan, J. Zhou, S. Wang and K. Xu, *Cellulose* **2022**, *29*, 5745–5763.
143. Z. Vargas-Osorio, F. Ruther, S. Chen, S.Sengupta, L. Liverani, M. Michálek, D. galusek and A.R. Boccaccini, *Biomed. Mater.* **2022**, *17*, 045019.
144. V. Koniienko, Y. Husak, J. Radwan-Pragłowska, V. Holubnycha, Y. Samokhin, A. Yanovska, J. Varava, K. Diedkova, Ł. Janus and M. Pogorielov, *Molecules* **2022**, *27*, 3343.
145. V. Chauhan, D. Khaushal, V.K. Dhiman, S.S. Kanwar, D. Singh, V.K. Dhiman and H. Pandey, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *10*, 794411.
146. N. Chuaponpat, T. Ueda, A. Ishigami, T. Kurose and H. Ito, *Polymers* **2020**, *12*, 1083.
147. K.H. Lam, A.J. Nijenhuis, H. Bartels, A.R. Postema, M.F. Jonkman, A.J. Pennings and P. Nieuwenhuis, *J. Appl. Biomater.* **1995**, *6*, 191–197.
148. M.S. Mohammadi, M.N. Bureau and S.N. Nazhat, *Poly(lactic Acid (PLA) Biomedical Foams for Tissue Engineering In Biomedical Foams for Tissue Engineering*, Woodhead Publishing: Cambridge, UK, **2014**, pp.: 313–334.
149. J.M. Lowen and J.K. Leach, *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1909089.
150. J. Ou, K. Liu, J. Jiang, D.A. Wilson, L. Liu, F. Wang, S. Wang, Y. Tu and F. Peng, *Small* **2020**, *16*, 1906184.
151. J.-C. Park, T. Ito, K.-O. Kim, K.-W. Kim, B.-S. Kim, M.-S. Khil, H.-Y. Kim and I.-S. Kim, *Polym. J.* **2010**, *42*, 273–276.
152. A. Kumar and S.S. Han, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2017**, *66*, 159–182.
153. A.M. Isloor, B. Kalluraya and K.S. Pai, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 825–830.
154. C. Bai, S. Ren, S. Wu, M. Zhu, G. Luo and H. Xiang, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *221*, 113543.
155. M. Seethaler, T. Hertlein, E. Hopke, P. Köhling, K. Ohlsen, M. Lalk and A. Hilgeroth, *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1138.
156. J.H. Bartha-Vári, M.-I. Toşa, F.-D. Irimie, D. Weisser, Z. Boros, B.G. Vértessy, C. Paizs and L. Poppe, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1122–1128.
157. M. Ziegler-Borowska, D. Chełminiak, T. Siódmiak, A. Sikora amd H.K. Marszałł, *Mater. Lett.* **2014**, *132*, 63–65.
158. N.G. Kandile and H.M. Mohamed, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *122*, 578–586.
159. C. Liu, D. Saeki and H. Matsuyama, *RSC. Adv.* **2017**, *7*, 48199–48207.
160. A.C. Alavarse, F.W. de Oliveira Silva, J.T. Colque, V.M. Da silva, T. Prieto, E.C. Venancio and J.J. Bonvent, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 271–281.
161. N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop and R.A. Wahab, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 205–220.