

Raport stiintific

privind implementarea proiectului

ACCESUL LA NOI MOLECULE BIOACTIVE PRIN

DEZVOLTAREA UNOR BIOCATALIZATORI ORIGINALI PENTRU REACTII TIP CLIK-CHEMISTRY

in perioada octombrie – decembrie 2011

Proiectul vizează identificarea, analiza și utilizarea unor noi biocatalizatori din biodiversitatea României, microorganisme și vegetale, care să fie utilizate în catalizarea unor reacții importante pentru chimia organică.

Scopul proiectului este de a sintetiza compuși N-heterociclici funcționalizați, cu proprietăți bioactive (Girija S. Singh, Edward E. Mmatli, Recent progress in synthesis and bioactivity studies of indolizine, European Journal of Medicinal Chemistry 46, 2011, 5237-525), fluorescente, prin metode clasice și neconvenționale, utilizând biocatalizatori, activare cu microunde, ultrasunete, metode cunoscute ca aparținând “chimiei verzi”.

Schema generală de obținere este prezentată în figura 1:

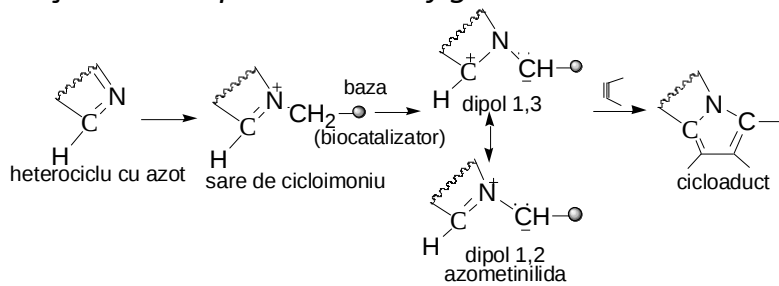


Figura 1. Schema generală care stă la baza sintezei cicloaductivilor

Obiectivele acestei etape sunt **selecția biocatalizatorilor** și **sinteza** compușilor organici care sunt **materiale de plecare** în reacțiile de cicloadiție.

Utilizarea enzimelor în sinteza organică este acum larg acceptată și din ce în ce mai multe lucrări de sinteză demonstrează ca enzimele sunt o sursă alternativă de cataliza fiind la fel de robuste ca alți catalizatori chimici, utilizarea lor continuând să capete o largă extindere(Benjamin G. Davis and Viviane Boyer, *Biocatalysis and enzymes in organic synthesis*, Nat. Prod. Rep., 2001, 18, 618–640).

Progresul științific arată că enzime provenite din specii diferite pot prezenta caracteristici catalitice diferite, care includ selectivitate de substrat sau stereochimică. În cazul biocatalizei, avantajele unei sinteze selective (chemo-, regio- si stereoselective) sunt asociate cu beneficiile aduse de strategia prietenoasă față de mediu. În comparație cu metodele de sinteză chimică clasică, metodele de sinteză chemoenzimatică ale substanțelor medicamentoase, obținute prin asocierea reacțiilor enzimatică cu reacții chimice moderne, constau de obicei în mai puțini pași de reacție, conduc la o cantitate mai mică de deșeuri și prezintă o eficiență mărită atât în ceea ce privește randamentul de biotransformare cât și în ceea ce privește enantio și/sau diastereoselectivitatea (Ramesh N. Patel, Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis, Coordination Chemistry Reviews 252, 2008, 659–701)

Analiza datelor pe fluxul principal de publicații și experimentele preliminare realizate în prima etapa de derulare a proiectului dovedesc clar aplicabilitatea catalizei cu enzime în sinteza unor intermediari care la rândul lor pot conduce la molecule cu proprietăți bioactive Margaret M. Kayser, "Designer reagents' recombinant microorganisms: new and powerful tools for organic synthesis, *Tetrahedron* 65, 2009, 947–974).

Proiectul a vizat ca prim obiectiv **selecția biocatalizatorilor** care vor fi utilizați în cataliza reacțiilor de sinteză a N-heterociclorilor. S-au avut în vedere enzime comerciale, sau surse naturale de enzime (microorganisme și țesuturi vegetale). Celulele microorganismelor (bacterii, drojdii și mușcăiuri) au fost testate atât din punct de vedere a potențialului de a produce diferite enzime extracelulare, cu rol în biocataliză, cât și utilizarea biomasei în calitate de biocatalizatori complecși. Complexul enzimatic al celulelor întregi este mult mai util comparativ cu enzimele pure datorită existenței unor complexe enzimatice care pot cataliza diferite reacții. De asemenea, celulele vegetale vor fi utilizate tot cu întregul sistem celular, sistemele de celule vii nenecesitând cofactori sau sisteme de regenerare a cofactorilor. Comparativ cu biocatalizatorii de origine microbiană, plantele au căi metabolice mult mai complexe, care sunt mult mai puțin înțelese, pot avea enzime necunoscute și unice. Deoarece cele mai multe secvențe genomice ale ADN-ului din fructe și legume nu sunt disponibile, este de mare importanță exploatarea celulelor din plante, cu activitățile extrem de bune catalitice (B. Xie et al., *Enantioselective reduction of fluorenones in surfactant-aqueous solution by fruits and vegetables* / *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61, 2009, 284–288.) Biocatalizatori precum biomasa microorganismelor sau țesuturile vegetale sunt eficiente a fi utilizate în sinteza organică deoarece sunt ușor de procurat de pe piață și ușor de manipulat (Emre M. Isin, F. Peter Guengerich, *Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 2007, 314–329).

Studiile preliminare realizate au urmărit utilizarea unor celule microbiene și enzime sintetizate de acestea, țesuturi vegetale sau enzime comerciale ca biocatalizatori în reacții de cicloadiție cu scopul de a obține compuși cu proprietăți bioactive, fluorescente, antioxidante. 4,4'-bipiridilul (bpy), ω -bromacetofenona (wBr), dibromura de N,N'-di(p-metoxifenacil)-4,4'-bipiridiniu și propiolatul de etil (PE) au fost alese în această etapă ca substraturi model pentru selecția biocatalizatorilor.

Microorganismele testate în calitate de biocatalizatori au fost tulpini de: bacterii, *Pseudomonas* spp., bacterii filamentoase, *Streptomyces* spp. (tulpini izolate din soluri polare); drojdii, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida arborea*, mușcăiuri, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, *Epicoecum nigrum*; celule vegetale (*Armoracia rusticana*, *Daucus carota*, *Petroselinum hortense-sativum*, *Raphanus sativus*, *Allium porrum*, *Fagopyrum sagittatum*), și enzime comerciale (lipaze, din *Candida*).

În cazul microorganismelor s-a testat potențialul biocatalitic al biomasei (celule întregi), a culturilor cu vârste diferite și a preparatelor enzimatic brute eliberate extracelular. Selecția biocatalizatorilor s-a realizat în funcție de capacitatea acestora de a produce transformări ale substraturilor cu formare de compuși fluorescenți, proprietate care s-a fost pusă în evidență prin cromatografie pe strat subțire și vizualizarea fluorescenței în UV.

Selecția culturilor active s-a realizat prin inoculare în punct și cultivare în sistem staționar pe mediul YPD (yeast extract peptone dextrose) cu agar, suplimentat cu soluții de concentrații % din compușii de plecare: bpy, wBr, PE. După dezvoltarea coloniilor s-a urmărit formarea compușilor fluorescenți în mediul din vecinătatea coloniilor.

Studiile au continuat cu experimentări în care drojdia *Yarrowia lypolitica* a fost utilizată în calitate de biocatalizator. S-au obținut culturi de drojdie în vârstă de 24, 48 și 72 de ore, prin cultivare submersă pe mediul YPD lichid. Un volum de 5 mL cultura s-a amestecat cu bpy (0,05 mmol), wBr (0,15 mmol), PE (0,15 mmol). Reacțiile s-au realizat în condiții foarte blânde, în soluție pH 7,2, la temperatura de 25°C, cu agitare la 200 rpm, timp de 72 h. Producții de reacție au fost detectați prin cromatografie în strat subțire (TLC). Apariția pe cromatogramă a unui spot fluorescent, vizualizat cu lampa UV, evidențiază eficacitatea biocatalizatorilor (figura 2).

Reacțiile biocatalizate de celule vegetale s-au efectuat cu materialul vegetal tăiat în bucăți de dimensiuni mici în condiții sterile în aceleași condiții foarte blânde, în soluție tampon fosfat pH 7,2, la temperatura de 25°C, cu agitare la 200 rpm, timp de 72 h.

Toate reacțiile de sinteză biocatalizate au fost monitorizate prin TLC (figura 2).

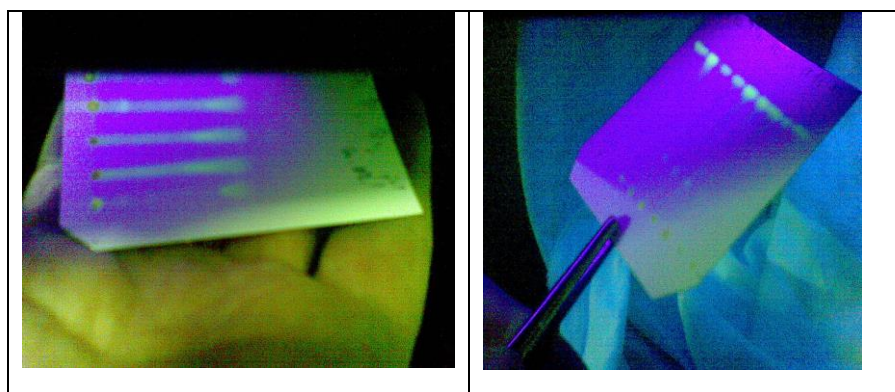


Figura 2 Cromatograme de monitorizare a reacțiilor biocatalizate

Reacțiile de sinteză biocatalizate, care conduc la formarea de N-heterocicluri fluorescente s-au realizat prin două variante.

Prima variantă s-a realizat în două etape, urmând aceeași cale de sinteză care se utilizează la sinteza prin metoda clasică, fără biocatalizatori (figura 3):

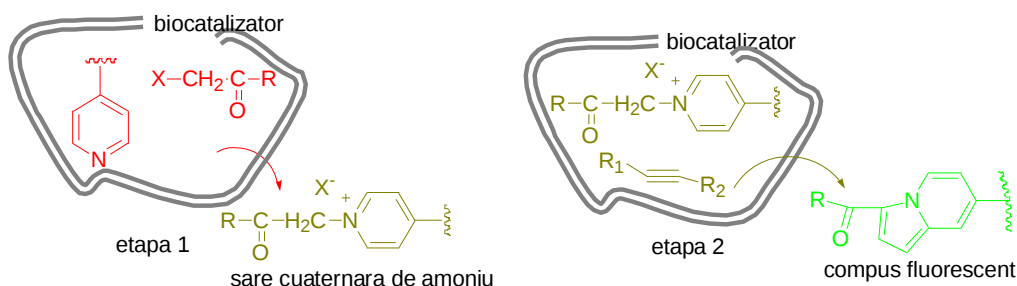


Figura 3. Biocataliza realizată în două etape: 1-obținerea sărurilor cuaternare de amoniu; 2-reacția sărurilor cu dipolarofili cu obținerea ciclului indolizinic fluorescent

2) A doua variantă se realizează prin sinteză "one-pot", într-o singură etapă, (figura 4), metoda fiind mult mai avantajoasă (timp mai scurt, randament global mai mare) .

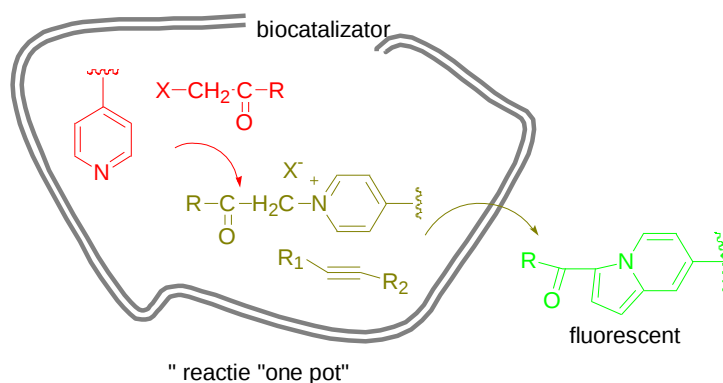


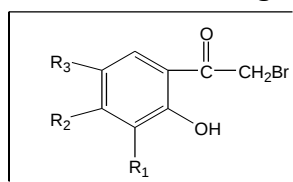
Figura 4. Sinteza biocatalizată într-o singură etapă

Pentru obținerea cicloaducțiilor fluorescenți precursorii necesari sunt **derivații halogenați reactivi** utilizați apoi în sinteza noilor **săruri cuaternare de amoniu**. Sinteza acestor compuși a constituit un alt obiectiv îndeplinit al acestei etape.

Acești compuși au fost obținuți după metodele de obținere din literatura de specialitate (R. Dinica, B. Furdui, G. Bahrim, M. Demeunynck, Rev. Roum. Chim, 2008, 53(1), 21)

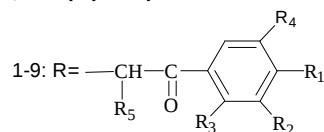
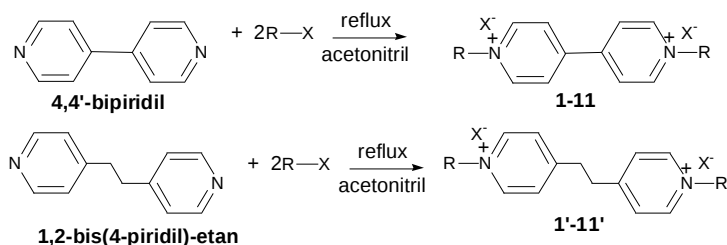
Procedeu general de obținere a o-hidroxicetonelor halogenate-derivați halogenați reactivi

La o soluție de o-hidroxicetonă în acid acetic glacial se adaugă brom în decurs de 30 minute



și se menține sub agitare. Amestecul de reacție se refluxează până la decolorarea soluției. După răcire, amestecul este turnat în apă rece, se lasă câteva ore la temperatura camerei, iar produsul solid obținut se filtrează și se recristalizează din solvent potrivit.

Ulterior, derivații halogenați s-au utilizat pentru obținerea sărurilor cuaternare de amoniu, precursori în obținerea indolizinelor. Compușii s-au obținut după schema de reacție de mai jos:



1,1': R₁=H, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=Br
 2,2': R₁=Br, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=Br
 3,3': R₁=OCH₃, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=Br
 4,4': R₁=NO₂, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=Br
 5,5': R₁=Cl, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=Br
 6,6': R₁=H, R₂=OCH₃, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=Br
 7,7': R₁=OH, R₂=OH, R₄=H, R₅=H, X=Cl
 8,8': R₁=H, R₂=H, R₃=OH, R₄=Br, R₅=CH₃, X=Br

9,9': R=CH₂-COOMe X=Br

10,10': R=CH₂-COOEt X=Br

11,11': R = X=Br

Studiile preliminare demonstrează că biocatalizatorii testați au capacitatea de bioconversie a compușilor cu formare de produși fluorescenți, procesul de biotransformare fiind influențat de timpul de reacție, pH, temperatura, proprietățile catalitice ale biocatalizatorului. În cazul microorganismelor, bioconversia evoluează diferit în funcție de tip, particularitățile metabolice și energetice ale celulelor, precum și de vârsta acestora și condițiile de cultivare. În cazul celulelor vegetale utilizate până în prezent, reacția a decurs cu viteză mai mare, comparativ cu a culturilor microbiene în calitate de biocatalizatori.

Director proiect,

Conf.dr. Dinică Rodica Mihaela