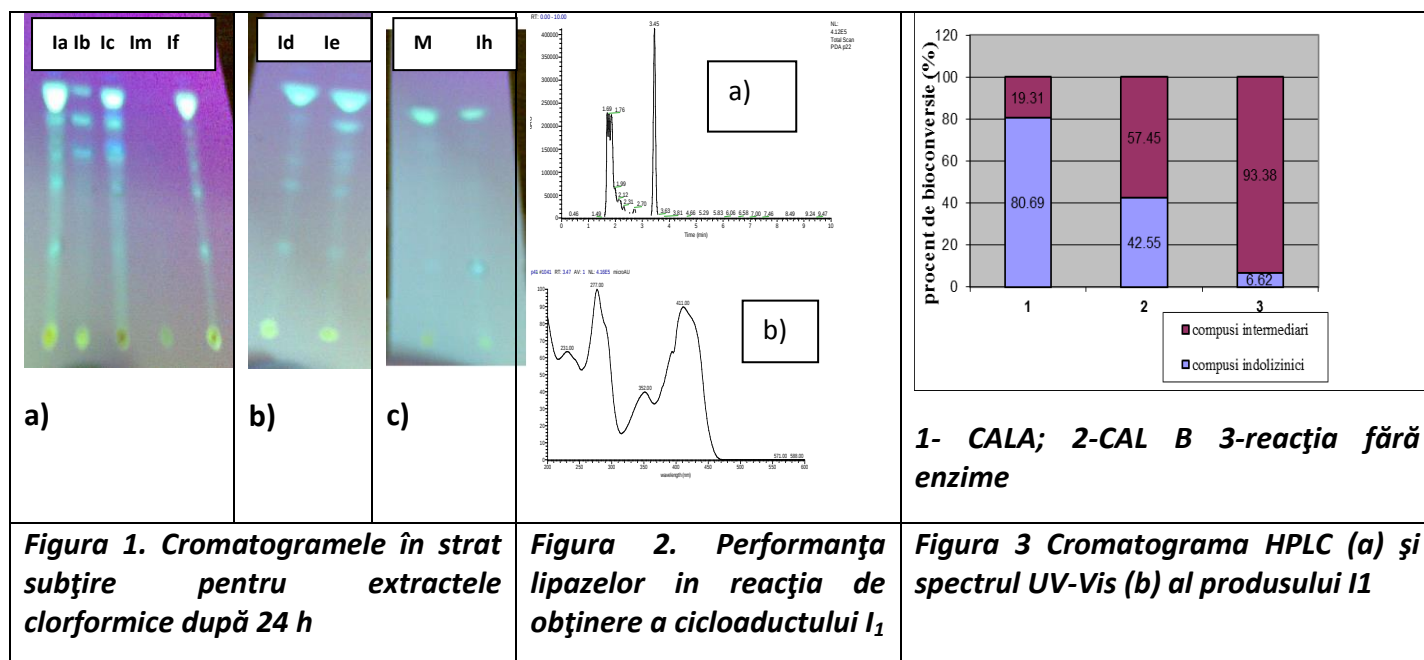


Raport științific

privind implementarea proiectului în perioada ianuarie – decembrie 2012

Obiectivele acestei etape au avut ca scop sinteza unor compuși organici cu diverse proprietăți- bioactive, fluorescente- prin reacții de cicloadiție, reacții care s-au desfășurat în spiritul „chimiei verzi” (reacții în prezența catalizatorilor enzimatici, în solvenți netoxici și reacții activate de microunde-mw sau ultrasunete-us).

O.II.1 Sinteza moleculelor fluorescente prin reacții de cicloadiție s-a realizat utilizând cataliza enzimatică, microunde, ultrasunete și solvenți netoxici. Rezultatele acestei etape au constat în realizarea cu succes a unor reacții de ciclizare utilizând ca **materiale de plecare** mai mulți **heterocicli cu azot**, diferiți **derivați halogenați** reactivi și **compuși cu triplă** legătură activată de o grupare atrăgătoare de electroni. Reacțiile biocatalizate au fost multiple, deoarece am variat compușii de plecare pentru a obține compuși diferit funcționalizați, care pot avea proprietăți diferite, **bioactive, fluorescente**, datorită substituenților prezenți în moleculă. Reacțiile enzimatică s-au desfășurat utilizând atât **enzime comerciale** cât și enzime provenite din **biomasa microbiană**. Reacțiile au fost activate și cu ajutorul microundelor sau a ultrasunetelor. Reacțiile s-au desfășurat comparativ, atât prin metoda clasică (încălzire, solvenți organici), cât și prin metode alternative (biocataliză, microunde, ultrasunete, mediu apos) pentru a demonstra avantajul utilizării biocatalizatorilor. **Reacțiile** desfășurate **prin metoda clasică** au loc **în trei etape** (i, ii, iii), conform schemei 1. Etapa (i) s-a desfășurat în acetonitril, etapele (ii), (iii) în N-metilpirolidonă sau benzen. **Reacțiile biocatalizate** s-au desfășurat în mediu apos, la 25°C, respectiv 40 °C sau 50°C, **într-o singură etapă**, („one-pot”) adăugând simultan în mediul de reacție N-heterociclul, agentul alchilant și dipolarofilul. Reacțiile au fost urmărite prin cromatografie pe strat subțire (CSS) și prin HPLC/MS. În **reacțiile** realizate în prezența **catalizatorilor enzimatici comerciali** am utilizat: lipaza din *Candida Antarctica* **CAL A** (10 mg) – proba Ia, lipaza din *Candida Antarctica* **CAL B** (10 mg) – proba Ib, lipaza din *Candida Rugosa* (10 mg) – proba Ic, **alcool dehidrogenaza** din *Sacharomyces cerevisiae* (2.5mg) – proba Id, **alcool dehidrogenaza** din *Deinococcus radiodurans recombinant* din *E. Coli* (10μL) – proba Ie, **lipaza din pancreas de porc** (10 mg) – proba If, **enzimele din hrean**(*Amoracia rusticana*) – proba Ih. În paralel, s-a realizat și reacția martor în mediu apos la pH 7, în absența catalizatorilor enzimatici – Im. Evoluția reacțiilor s-a urmărit comparativ cu produsul pur (M), sintetizat anterior de noi (R.Dinica, et all, Synlett, 1013, 2001), prezența produsului indolizinic urmărit fiind pusă în evidență prin CSS (sub forma unui spot puternic fluorescent verde-albăstrui, cu Rf 0.85-fig.1) prin HPLC (timp de retenție 3,45 -eluent CH₃CN), prin UV-VIS (maxime caracteristice la 231nm, 277 nm, 352 nm respectiv 411 nm (fig 2a,b) iar în spectrul de masă (APCI) apare picul specific ionului molecular. Analizând cromatogramele obținute (Fig 1, a, b, c), **reacțiile catalizate de lipazele Cal A, Candida Rugosa și lipaza din pancreas de porc, au avut cea mai ridicată conversie** în produsul dorit, în timp ce pentru Cal Bau avut o conversie mai scăzută. De asemenea, reacțiile catalizate de dehidrogenaze au decurs rapid, cu o conversie aproape totală în produsul dorit. Se remarcă de asemenea, **efectul catalitic puternic al hreanului (Amoracia rusticana)**, prin realizarea relativ rapidă a reacției de cicloadiție “one-pot”, cu formarea cicloaductului dorit de o **puritate ridicată**, în mediul de reacție observându-se absența altor produși secundari, care apar în măsură mai mare sau mai mică în celelalte reacții enzimatică, necesitând prificarea produșilor. În cazul reacției fără catalizatori enzimatici, obținerea cicloaductului a fost cu randament scăzut. Activarea reacției biocatalizate cu ultrasunete sau microunde a condus la creșterea randamentului dar și la scurtarea timpului de reacție. În figura 3 se poate observa că **reacția catalizată de CAL A are loc cu o conversie foarte bună**, în 2 h, dacă reacția este activată cu **ultrasunete**, comparativ cu reacția neactivată, efectuată în 48h.



Obținerea de noi sintoni cu funcția oximă în poziția 4, de tipul sărurilor cuaternare de piridiniu, a avut ca scop obținerea de noi compuși bioactivi, funcțiunea oximă regăsindu-se în numeroase medicamente importante în tratarea intoxicațiilor cu fosfați organici (Acharya, *Eur. J. Med. Chem.* 46 3926, 2011,) antibiotice (Lorke, *Curr. Med. Chem.*, 15 743, 2008), sau având activitate inhibitorie asupra kinazei supraexprimată în boli neurodegenerative precum Alzheimer sau Parkinson. Acționând ca nucleaze artificiale, pot deveni instrumente utile în biotehnologie, în terapia genică sau în chimioterapie (Fernandes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 4499, 2008). Astfel, pornind de la **4-piridin-aldehidă**, am obținut **oxima** prin două căi. Reacțiile dezvoltate în prezența mw sau us se desfășoară în timp scurt (1-6h) și cu **randament cantitativ**. Obținerea de noi alchine activate cu funcția amidă, ester și tioester va conduce la noi indolizine cu potențial bioactiv. Este interesant de remarcat că **reacțiile au loc doar catalizate de enzime** (CAL A, (CAL B, lipază porcină tip II), în timp ce pe cale **clasică nu au loc**. Parte din aceste cercetări au fost efectuate în stagiul extern, 2012, la UJF, Grenoble, Franța și comunicate la sesiuni științifice internaționale (**REncontres en Chimie Organique Biologique, Recob14, 2012, Grenoble, France, Journée SCF Rhone-Alpes 2012**) iar altele sunt trimise spre publicare (EuJOC). Aceleași tipuri de reacții au fost catalizate de unele **microorganisme** selectate în etapa I a proiectului și evaluate prin CSS și HPLC/MS. În această etapă au fost, deasemenea, realizate reacțiile biocatalizate de microorganisme.. Cromatogramele CSS și HPLC/MS, arată că **primele rezultate** apar după 24 h de reacție. Reacțiile au fost catalizate utilizând culturi de microorganisme la 72, 96, 120 și 124h de cultivare pe parcursul a 6 zile de reacție. Toate experimentele s-au realizat în triplicat. Evaluarea rezultatelor reacțiilor biocatalizate de biomasa microbiană a condus la concluzii importante cum ar fi că extractele enzimatice folosite catalizează diferit reacțiile de cicloadiție. Din cele 4 tulpini utilizate, 27D, P01, RO13 (*Yarrowia lipolytica*) și GC (*Geotrichum candidum*) cele mai active sunt **cultura PO1 și Gc și lichidul cultural de RO13** obținute **după 96 h** de cultivare (4a). Din graficele 4b, 4c reiese că pentru Gc capacitate biocatalitică superioară are lichidul cultural, obținut după 120h iar pentru tulpina RO13 lichidul cultural după 144h de cultivare în sistem submers. În figura 4d se regăsesc cele mai performante preparate enzimatice utilizate în obținerea compusului **I1**. O observație de asemenea importantă a fost că în reacțiile catalizate de biomasă chiar dacă randamentul de bioconversie este mai mic, se obțin produșii cu puritatea cea mai ridicată.

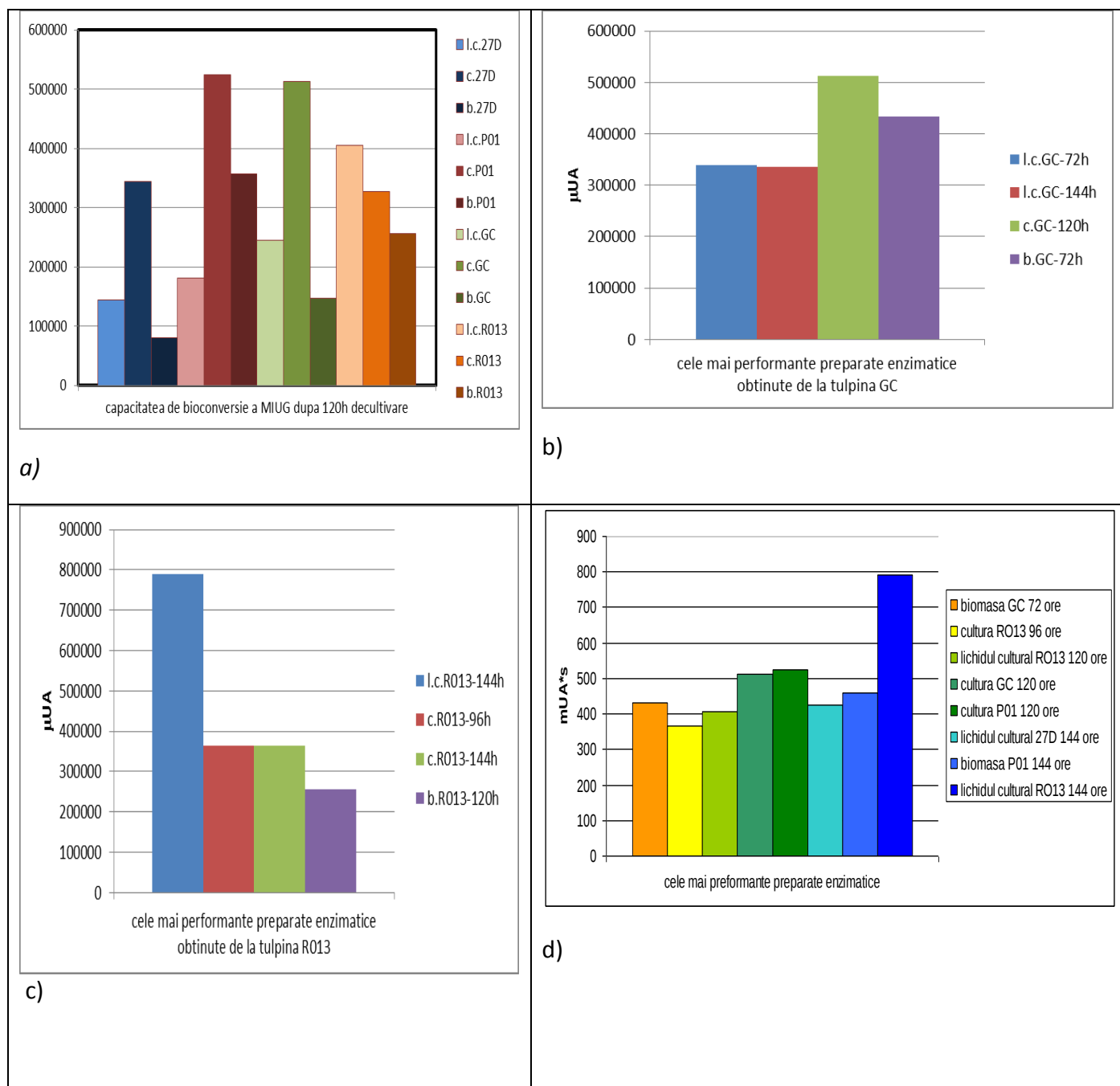


Figura 4 Rezultatele bioconversiei reacțiilor de cicloadiție cu microorganisme din colecția MIUG

Rezultatele obținute arată că reacțiile desfășurate în prezența biocatalizatorilor sunt mai avantajoase din următoarele motive: reacțiile se desfășoară în timp mult mai scurt, se elimină solvenți toxici, compuși obținuți au puritate ridicată iar randamentele sunt comparabile cu cele obținute pe cale clasică. Parte din rezultatele acestor cercetări au fost publicate în **Tetrahedron**, **68**, **2012**, **6164-6168**, comunicate la conferințe internaționale (**Septieme Colloque Franco-Roumain de Chimie Applique-COFRoCA**, 27-29 iunie, 2012, Bacău, **13th Tetrahedron Symposium, Challenges in Bioorganic & Organic Medicinal Chemistry**, 27-29 iunie, 2012, Amsterdam, Olanda, **Third Regional Symposium on Electrochemistry South-East Europe**, București, 13-17 mai 2012, 63rd, **Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Electron transfer in proteins and enzymes**, 19-24 August 2012, Praga, Cehia) sau trimise spre publicare la **Marine Drugs-FI** 3,85.

O.II.2 Sinteza moleculelor fluorescente prin reacții de cuplare a constat în realizarea unor reacții de ciclizare utilizând ca materiale de plecare 4-bromo-1,8- naftalinanhidrida, compuși aminici și compuși cu triplă legătură activată de o grupare atrăgătoare de electroni cu acces la **noi** compuși fluorescenți derivați de triazol (schema 3), care pot fi utilizați în sinteza controlată a moleculelor bioactive complexe. Reacțiile catalizate de enzime au fost realizate în **lichide ionice**, solvenți mai puțin toxici, sunt selective, nu necesită

protejarea altor funcțiuni (amine, alcooli...) prezente în sintoni și conduc la produși în general puri (urmăriți prin CSS). care nu generează decât puține deșeuri.

Schema 3 Reacții de cuplare cu obținere de derivați de triazol

Concluzii Pentru prima dată au fost obținuți compuși noi, compuși cu proprietăți fluorescente din clasa indolizinelor, prin reacții "one-pot" (la care participă trei componenți) utilizând cataliză enzimatică. Multe din metodele de obținere a acestor compuși necesită catalizatori metalici, precum cuprul, platina, argintul, aurul sau paladiul, timp îndelungat de reacție, solvenți toxici (Singh, Eur.J.Med.Chem, 46, 5237, 2011, Liu, Org. Biomol. Chem., 8 2449, 2010, Wang, Chin. J. Chem., 24, 279, 2006). Pentru prima oară în reacții de cicloadiție am utilizat biocatalizatori enzime comerciale, microorganisme din colecția Platformei Bioaliment a UDJ sau enzime de proveniență vegetală (hrean). Reacțiile au avut loc în mediu apos, la temperaturi cuprinse între 25-50°C, reacții care s-au realizat și prin activare cu mw și us. S-a constatat că atât enzimele cât și mw sau us cresc viteza reacției și, în unele cazuri crește puritatea produșilor. Rezultatele sunt promițătoare având în vedere că reacțiile decurg în condiții blânde, în apă, cu enzime care pot fi procurate cu ușurință și care sunt materiale regenerabile. Avantajul utilizării biocatalizatorilor reiese din tabelul I în care sunt comparate două procese posibile prin care se poate realiza reacția de cicloadiție- clasic, respectiv enzimatic.

Procesul biocatalitic utilizat de noi necesită un consum energetic mai mic datorită condițiilor blânde de lucru și a etapelor mai puține, precum și utilizarea de solvenți mai puțin toxici, putând fi astfel considerat un proces care are loc în cadrul conceptului de „green chemistry”.

Rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul acestei etape contribuie la elucidarea mecanismului de acțiune al biocatalizatorilor în reacții de

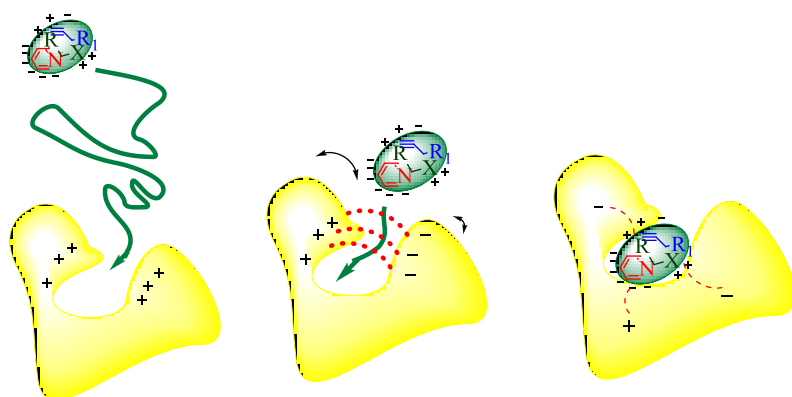


Figura 5

electric poate ajuta la formarea legăturilor în reactanții noștri ar putea fi ilustrate ca în figura 5 și pot fi utilizate chiar de o singură enzimă.

acțiune al biocatalizatorilor în reacții de cicloadiție. Moleculele utilizate ca substrat în reacțiile noastre sunt specii încărcate. Deși situsurile active ale enzimelor expun spații hidrofobe, câmpul electrostatic global produs de proteină cu toate grupările ei polare și încărcate poate conduce la un potențial electrostatic cu o sarcină netă în regiunea situsului activ fiind posibil ca acest potențial să direcționeze substratul în situsul activ cu sarcină opusă, crescând astfel probabilitatea de a produce legatura. Căile prin care câmpul

Director proiect,

Conf.dr.chim.Dinică Rodica Mihaela