RAPORT ŞTIINŢIFIC ŞI TEHNIC 2016

Programul: Parteneriate in domenii prioritare, contract nr. 206/01/07.2014
Denumirea programului: Kit inovativ în sinteza compuşilor chimici optic puri prin combinarea biocatalizei cu procesarea prin reacţii tip click
Acronim proiect: BIOCLICK

Etapa 3. Sinteza în sistem continuu a compuşilor enantiomeric puri utilizând enzime imobilizate.

Rezumatul etapei

Au fost stabilite proceduri de separare de tip click pentru o serie de substraturi sintetizate și caracterizate de tipul propiniloxi-acetaţi, substraturi obținute prin esterificarea etanolilor aromatici corespunzatori și a unor esteri propargilici care au fost testati ca și agenți de acilare. Pentru etapa de separare prin reacții de tip click a fost sintetizată o amina terțiară funcționalizată cu grupare azido. Condițiile optime de reacție au fost stabilite pe baza studiilor utilizând diferiți catalizatori de Cu (I) la diferite intervale de timp (6-96h).

A fost elaborată o metodologie de separare enzimatică a unor amestecuri racemice (derivați ai benzofuranil etanolilor) prin metodologie de tip click. În acest sens au fost testate lipaze imobilizate din diferite surse microbiene disponibile comercial sau imobilizate în laborator, în diferite medii de reacție, utilizând 4 tipuri de acil donori, la temperaturi în domeniul 30-50°C.

A fost determinată stabilitatea operațională a enzimelor imobilizate în etapa anterioară în mai multe cicluri de reacție, iar pentru fiecare substrat investigat a fost selectat biocatalizatorul cel mai eficient pentru utilizarea într-un bioreactor continuu.

Rezoluția cinetică enzimatică în sistem continuu a fost testată cu succes pentru 3 substraturi aromatice și un substrat alifatic. S-au obținut valori maxime ale conversiilor substraturilor la valorile minime ale debitelor testate și valori mai mari de 50 $\mu mol min^{-1} g^{-1}$ ale productivității în cazul debitelor mai mari de 1 ml/min. Biocatalizatorii utilizați au prezentat o stabilitatea operațională excelentă și vor fi utilizați pentru stabilirea condițiilor optime de reacție în sistem continuu pentru rezoluția cinetică enzimatică a substraturilor racemice propargilice sintetizate.

Au fost obținute preparate enzimatice noi prin entrapare în matrici de sol-gel și entrapare combinată cu adsorbție pe Celită 545 și pulberi magnetice. Preparatele au fost utilizate cu succes pentru substraturi racemice alifatice și aromatice.

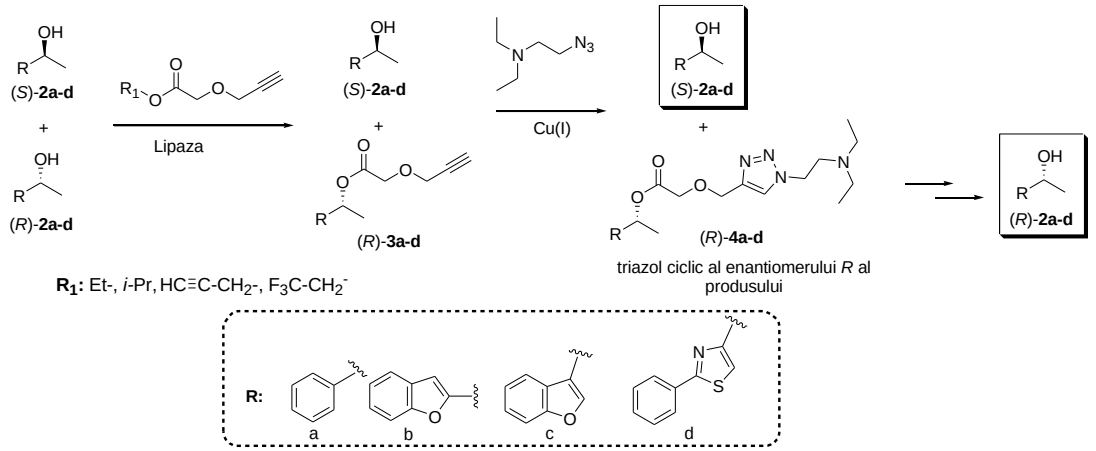
Pentru toți produşii de reacţie dar şi pentru substraturi au fost elaborate metodele de separare şi analiză cromatografică a izomerilor optici.

Rezultatele acestei etape au fost diseminate în două lucrări științifice acceptate la reviste cu factor de impact (ISI) şi prin participare cu șase lucrări la conferințe internaționale de prestigiu și nouă lucrări la conferințe naționale cu participare internațională din domeniul biocatalizei și nanomaterialelor. În concluzie, se poate afirma că toate obiectivele asumate pentru Etapa 3 a proiectului au fost îndeplinite.

Descrierea ştiinţifică şi tehnică

Activitatea 3.1. Studiul prelucrării produșilor prin reacții de tip click - Partea II

Studiul efectuat propune o strategie de separare a produşilor rezoluţiei cinetice enzimatice (EKR) utilizând o reacţie tip click care să înlocuiască etapa de purificare cromatografică mai dificil de realizat la nivel industrial. Conform acesteia, amestecul racemic este supus rezoluţiei cinetice mediate de lipaze în prezenţa unui ester având grupare etinilică terminală. În urma acestui proces un enantiomer al substratului rămâne netransformat iar celălalt este transformat în produs enantiopur capabil să reacţioneze cu azida printr-o reacţie tip click, conducând la formarea unui compus triazolic ciclic care include enantiomerul produsului. S-a ales această amină terţiară funcţionalizată cu grupare azido datorită proprietăţii sale de a putea fi extrasă într-o soluţie apoasă acidă. Astfel, separarea celor doi compuşi se realizează printr-o extracţie. Ultima etapă constă în regenerarea celuilalt enantiomer al substratului prin hidroliza legăturii esterice a compusului triazolic.

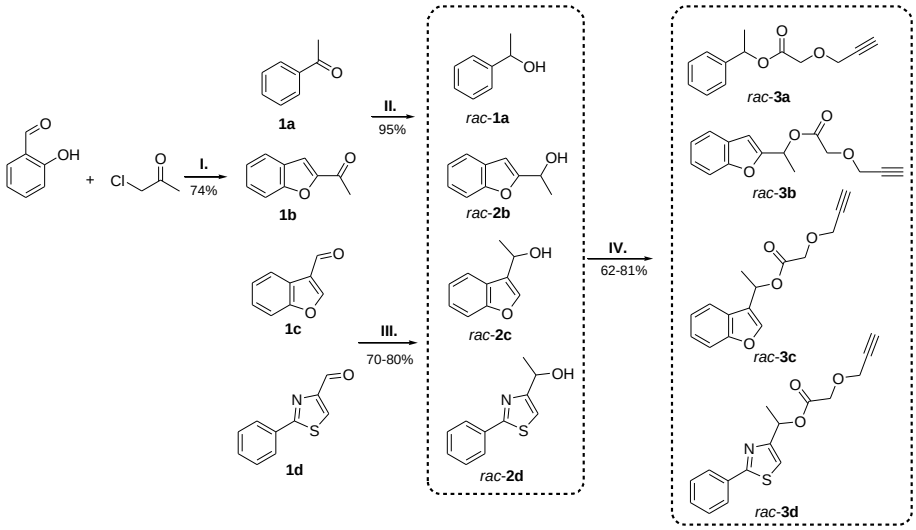


Schema 1. Metodologie de separare a produşilor rezoluţiei cinetice enzimatice (EKR) utilizând o reacţie tip click

Sinteze chimice

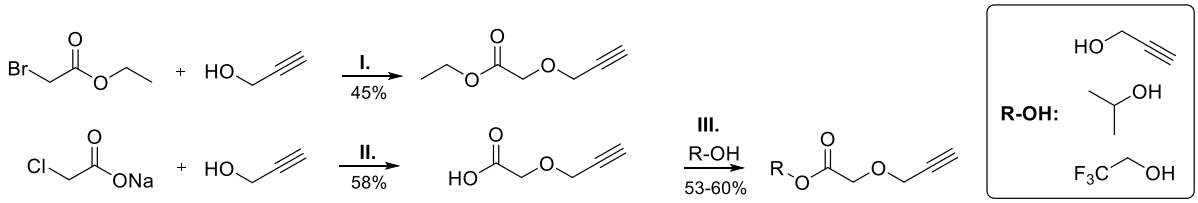
Iniţial s-a realizat sinteza chimică a etanolilor aromatici *rac*-**2a-d**, a propiniloxi-acetaţilor corespunzători *rac*-**3a-d**, a agenţilor de acilare propargilici şi a azidei necesare în reacţiile click, utilizând metode descrise în literatură. Alcoolii secundari *rac*-**2a,b** au fost obţinuţi prin reacţii de reducere a cetonelor corespunzătoare **1a,b**[i,ii] iar *rac*-**2c,d** au fost sintetizaţi prin reacţii Grignard pornind de la aldehidele **1c,d**[iii,iv].

Propiniloxi-acetaţii racemici *rac*-**3a-d** au fost obţinuţi prin esterificarea *rac*-**2a-d** cu acidul prop-2-iniloxi-acetic în prezenţa *N,N*'-diciclohexilcarbodiimidei şi a 4-dimetilamino-piridinei (**Schema 2**). Aceştia au fost utilizaţi atât pentru stabilirea metodelor de separare cromatografică chirală cât şi pentru elaborarea protocolului de separare bazat pe reacţii click.



Reactivi şi condiţii de reacţie: **I.** KOH, MeOH, reflux, 2h; **II.** $NaBH_4$, MeOH, rt, 1h; **III.** CH_3MgI, eter etilic, Ar, rt, 16h; **IV**. acid prop-2-iniloxi-acetic, DCC, DMAP, CH_2Cl_2, rt, 3h.
Schema 2. Sinteza chimică a etanolilor (hetero)aromatici *rac*-**2a-d** şi a propiniloxi-acetaţilor corespunzători *rac*-**3a-d**

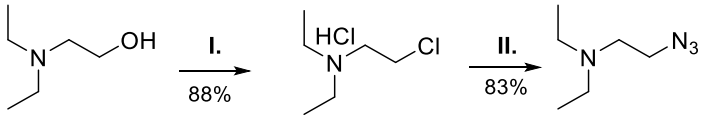
S-a realizat de asemenea sinteza acidului prop-2-iniloxi-acetic şi a unor esteri[v] ai acestuia care au fost testaţi apoi în etapele de rezoluţii cinetice enzimatice. Sinteza acestor agenţi de acilare decurge după schema de reacţii de mai jos:



Reactivi şi condiţii de reacţie: **I.** NaH, THF, Ar, rt, 12h; **II**. MTBE, NaOH, TBAB, rt, **III.** DCC, DMAP, CH_2Cl_2, 3h.

Schema 3. Calea de sinteză a esterilor propargilici

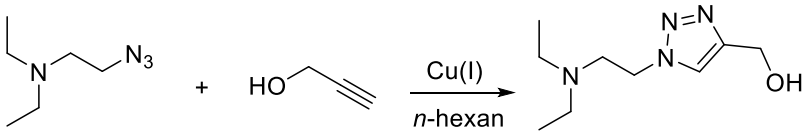
Pentru etapa de separare a produşilor EKR prin reacţii tip click s-a optat pentru o amină terţiară funcţionalizată cu grupare azido ((2-azido-etil)-dietilamina) datorită proprietăţii acesteia de a putea fi extrasă într-o soluţie apoasă acidă. **Schema 4** redă etapele de sinteză a acesteia[vi].



Reactivi şi condiţii de reacţie: **I.** $SOCl_2$, $CHCl_3$, 0°C-reflux, 4h; **II.** NaN_3, H_2O, 80°C.
Schema 4. Sinteza (2-azido-etil)-dietilaminei

În scopul găsirii condiţiilor optime pentru reacţiile click ale compuşilor investigaţi, iniţial s-au testat diferiţi catalizatori de Cu(I) în reacţia model dintre alcoolul propargilic şi (2-azido-etil)-dietilamina. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 1**. În cazul reacţiilor catalizate de CuI şi $CuI(PPh_3)$ s-a observat conversia totală a azidei după 25 de ore, iar în cazul în care s-a utilizat sistemul catalitic $Cu_2SO_4 \times 5H_2O$ + $N_2H_4 \times H_2O$ a fost nevoie de un timp de reacţie mult mai lung (95 de ore). S-a studiat de asemenea şi efectul a două baze asupra reacţiei click. Adăugarea unui echivalent de Et_3N determină o scădere a timpului de reacţie (20 de ore), în timp ce 1 echiv. de

DIPEA nu a produs nicio modificare. La adăugarea a 2 echiv. de Et_3N s-a observat o creştere semnificativă a vitezei reacţiei. Pentru a nu complica procedura de prelucrare ulterioară, s-a optat în experimentele următoare pentru un sistem de reacţie cât mai simplu utilizând CuI ca sursă de Cu(I) în absenţa oricărui aditiv.



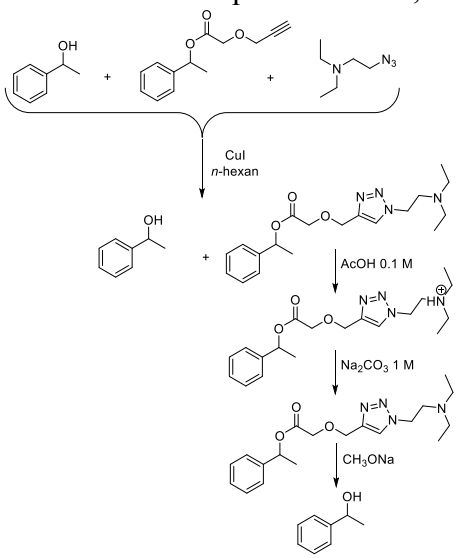
Tabel 1. Studiul de optimizare a reacţiei click

Sursa de Cu(I) (0.1 echiv.)	Bază	Timp (h)[a]
CuI	–	25
$CuI(PPh_3)$	–	25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ $N_2H_4 \cdot H_2O$	–	95
CuI	Et_3N (1 echiv.)	20
$CuI(PPh_3)$		20
CuI	DIPEA (1echiv.)	25
$CuI(PPh_3)$		26
CuI	Et_3N (2 echiv.)	6

[a]transformarea completă a azidei confirmată prin TLC

Stabilirea procedurilor de separare de tip click pentru suporturile sintetizate

În continuare, a fost elaborat protocolul de separare prin metodologie tip click utilizând racemicii *rac*-**2a** şi *rac*-**3a** ca şi compuşi model care simulează amestecul de reacţie de la finalul unui proces de EKR (**Schema 5**). După realizarea reacţiei click, printr-o extracţie cu o soluţie apoasă acidă, triazolul ciclic este trecut în faza apoasă, în timp ce feniletanolul rămâne în faza organică. După ajustarea pH-ului fazei apoase la valoarea 10 şi transferarea produsului click din nou în faza organică, prin ruperea legăturii esterice în mediu puternic bazic, se recuperează feniletanolul.

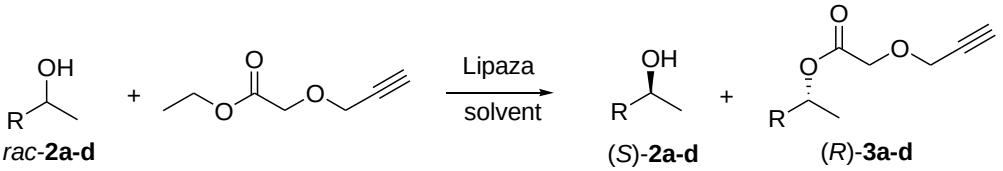


Schema 5. Separarea produşilor EKR prin metodologie tip click

Sinteze enzimatice

În scopul obţinerii unor compuşi cu purităţi optice ridicate la conversii cât mai mari au fost testati 4 agenţi de acilare şi o serie de solvenţi organici în reacţii de acilare enzimatică a *rac*-**2a-d** la scară analitică. Procesele de EKR au fost mediate de lipaza B din *Candida antarctica* sub forma preparatului comercial Novozym 435 sau imobilizată prin legare covalentă de nanotuburi de carbon (CaL-B-SWCNT). În cazul 1-(benzofuran-2-il)etanolului *rac*-**2b** s-a testat şi lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK) întrucât aceasta s-a dovedit optimă în studii anterioare de EKR ale acestui substrat[ii]. Donorii de acil investigaţi sunt esteri ai acidului prop-2-iniloxi-acetic: esterii etilic, isopropilic, propargilic şi 2,2,2-trifluoroetilic. Solvenţii testaţi sunt: *n*-hexan, CH_2Cl_2, acetonitril, tetrahidrofuran, metil-*terţ*-butil-eter, diisopropil eter, ciclohexan şi toluen.

Într-o primă etapă s-a stabilit solventul optim pentru fiecare substrat în parte utilizând 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil ca agent de acilare (**Schema 6**). Rezultatele sunt prezentate în **Tabelele 2** şi **3**.



Schema 6. Screening-ul de solvent pentru EKR a *rac*-**2a-d**

Tabel 2. Efectul solventului in rezoluţiile cinetice enzimatice ale benzofuranil-etanolilor (*rac*-**2b,c**) cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil (1 echiv.) (30°C, raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

Nr. crt.	Substrat	Solvent	Timp (h)	ee_S (%)	ee_P (%)	c (%)	E
1	*rac*-**2b**[a,b]	***n*-Hexan**	100	**34.6**	**>99**	**25.7**	**»200**
2	*rac*-**2c**[c]	*n*-Hexan	15	10.5	>99	9.5	»200
3		CH_2Cl_2		11.6	>99	10.4	»200
4		Acetonitril		22.0	>99	18.0	»200
5		THF		16.9	>99	14.5	»200
6		MTBE		22.2	>99	18.2	»200
7		DIPE		26.0	>99	20.6	»200
8		**Ciclohexan**		**42.2**	**>99**	**29.7**	**»200**
9		Toluen		35.0	>99	25.9	»200

[a]produsul nu a fost detectat în nici unul din ceilalţi solvenţi după 100 h
[b]Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK)
[c]Lipaza B din *Candida antarctica* (Novozym 435)

Tabel 3. Screening-ul de solvent pentru rezoluţiile cinetice mediate de Novozym 435 ale *rac*-1-feniletan-1-olului (*rac*-**2a**) şi *rac*-1-(2-feniltiazol-4-il)etan-1-olului (*rac*-**2d)** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil (1 echiv.) (30°C, raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

Nr. crt.	Substrat	Solvent	Timp (h)	ee_S (%)	ee_P (%)	c (%)	E
1	***rac*-2a**	***n*-Hexan**	20	**30.4**	**>99**	**23.3**	**»200**
2		Ciclohexan		18.6	>99	15.7	»200
3	*rac*-**2d**[a]	**CH_2Cl_2**	130	**18.1**	**>99**	**15.3**	**»200**
4		Toluen		18.5	86.1	17.7	16

[a] în ACN şi THF nu s-a obervat formarea produsului nici după 100 h iar în ceilalţi solvenţi reacţiile nu sunt enantioselective

După cum reiese din Tabele 2, 3, toate procesele de EKR au decurs cu stereoselectivitate maximă, dar cu conversii scăzute. În continuare, în încercarea de a mării conversia proceselor enzimatice studiate s-a realizat un studiu al efectului temperaturii, raportului substrat:biocatalizator şi raportului substrat:agent de acilare în reacţia de acilare a 1-(benzofuran-3-il)etanolului *rac*-**2c**. **Tabelele 4** şi **5** prezintă rezultatele acestui studiu.

Tabel 4. Screening-ul de temperatură şi raport substrat:biocatalizator pentru reacţia de acilare enzimatică a *rac*-**2c** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil (1 echiv.) în ciclohexan la 30°C, catalizată de Novozym 435 după 10 h

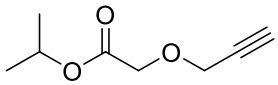
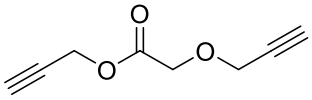
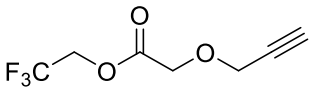
Conversie (%)			
Raport masic Substrat:biocatalizator	**Temperatură (°C)**		
	30	**40**	**50**
1:2	11.1	7.3	11.8
1:3	12.4	11.2	9.3
1:4	9.0	7.9	9.1

Tabel 5. Screening-ul de cantitate de agent de acilare pentru reacţia de acilare catalizată de Novozym 435 a *rac*-**2c** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de etil în ciclohexan la 30°C (raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

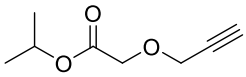
Conversie (%)				
Echiv. agent de acilare	**Timp (h)**			
	18	**30**	**50**	**140**
1	26.3	27.7	30.5	31.0
2	29.6	32.1	32.6	32.8
3	31.0	35.0	35.2	36.4

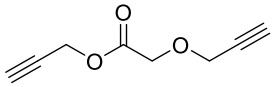
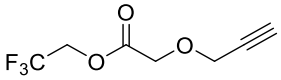
Deoarece creşterea temperaturii reacţiei, a cantităţii de biocatalizator sau de agent de acilare nu a condus la îmbunătăţiri semnificative ale conversiei reacţiei studiate s-au testat în continuare alţi donori de acil.

Tabel 6. Screening-ul de agent de acilare (1 echiv.) pentru reacţia de acilare mediată de Novozym 435 a *rac*-**2a** în *n*-hexan la 30°C (raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

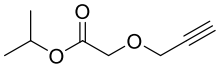
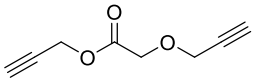
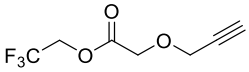
Conversie (%)			
Donor de acil	**Timp (h)**		
	4	**10**	**58**
	18.0	23.3	24.6
	23.1	36.9	37.7
	39.6	**50.0**	**-**

Tabel 7. Screening-ul de agent de acilare (1 echiv.) pentru reacţia de acilare mediată de lipaza L-AK a *rac*-**2b** în ciclohexan la 30°C (raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

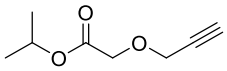
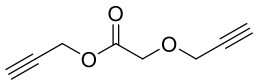
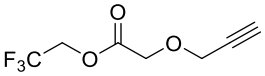
Conversie (%)		
Donor de acil	**Timp (h)**	
	42	**90**
	10.1	10.2

	18.2	31.8
	34.6	**47.0**

Tabel 8. Screening-ul de agent de acilare (1 echiv.) pentru reacţia de acilare mediată de Novozym 435 a *rac*-**2c** în *n*-hexan la 30°C (raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

Conversie (%)		
Donor de acil	**Timp (h)**	
	4	**18**
	31.2	30.0
	40.4	44.5
	43.1	**50.0**

Tabel 9. Screening-ul de agent de acilare (1 echiv.) pentru reacţia de acilare mediată de Novozym 435 a *rac*-**2d** în CH_2Cl_2 la 30°C (raport masic substrat:biocatalizator 1:2)

Conversie (%)		
Donor de acil	**Timp (h)**	
	18	**42**
	18.1	20.2
	39.7	39.7
	41.2	**47**

Utilizând agentul de acilare care a oferit cele mai bune rezultate s-a testat un biocatalizator dezvoltat în cadrul grupului de cercetare şi anume lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată prin legare covalentă pe nanotuburi de carbon. Acest biocatalizator a dovedit stabilitate remarcabilă în timp la temperaturi ridicate (60°C) fiind un candidat promiţător pentru reacţii în sistem continuu.

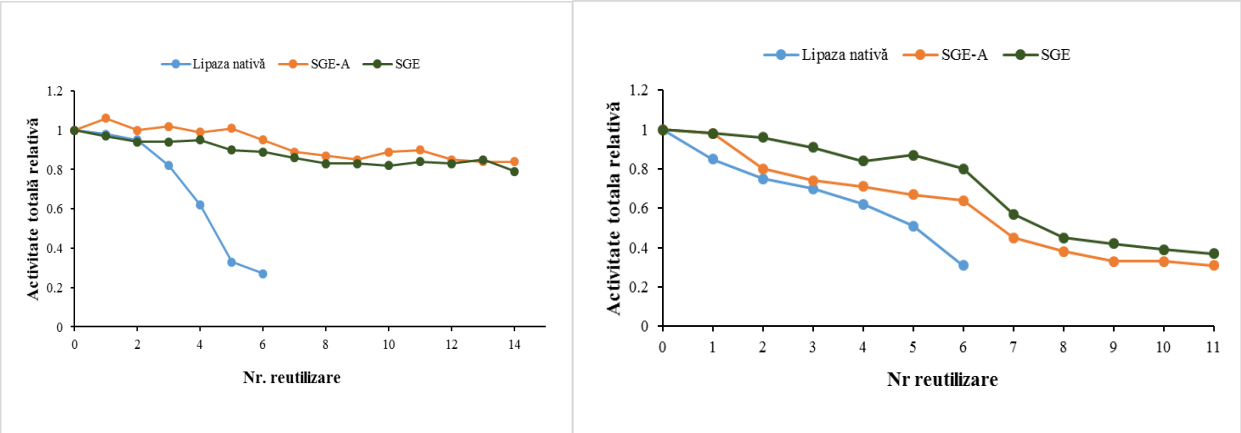
Tabel 10. Screening-ul de biocatalizator pentru rezoluţiile cinetice enzimatice ale *rac*-**2a-d** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil în solventul optim la 30°C

Nr. crt.	Substrat	Biocatalizator	Timp (h)	ee_S (%)	ee_P (%)	c (%)	E
1	*rac*-**2a**	Novozym 435	2	32.1	>99	24.3	»200
2		CaL-B-SWCNT		20.3	>99	16.9	»200
3	*rac*-**2b**	L-AK	18	24.9	>99	19.9	»200
4		Novozym 435	2	26.2	>99	20.7	»200
5		CaL-B-SWCNT		44.3	>99	30.7	»200
6	*rac*-**2c**	Novozym 435	2	33.0	>99	24.8	»200
7		CaL-B-SWCNT		53.2	>99	34.7	»200
8	*rac*-**2d**	Novozym 435	2	30.9	>99	23.6	»200
9		CaL-B-SWCNT		38.9	>99	28.0	»200

<u>Activitatea 3.2.</u> Determinarea stabilităţii operationale a enzimelor imobilizate în condiţii de reutilizare multiplă-Partea II

Studiul stabilitatii operationale a biocatalizatorilor selectati

În cadrul acestei activităţi s-a studiat potenţialul de reutilizare a lipazelor din *Candida antarctica* B (CAlB) şi *Pseudomonas fluorescens* (Ps.F) imobilizate prin entrapare în sol-gel şi entrapare în sol-gel combinată cu adsorbţie pe Celite 545. Matricea sol-gel a fost obţinută utilizând amestecuri ternare de silani precursori feniltrimetoxisilan/viniltrimetoxisilan/tetrametoxisilan PhTMOS:VTMOS:TMOS, la un raport molar de 1.6:0.4:1, folosind tetrafluoroboratul de 1-octil-3-metil-imidazoliu [Omin]BF_4 ca şi aditiv. Reacţiile au fost realizate la 40˚C în n-hexan ca mediu de reacţie. În cazul lipazelor native din CAlB si Ps.F activitatea relativă după şase cicluri de reacţie a scăzut semnificativ, fiind 27% din valoarea iniţială. În cazul preparatelor imobilizate utilizând lipaza CalB valoarea activităţii relative după 14 cicluri de reacţie a fost de aproximativ 80% **(Figura 1a)**. Deşi stabilitatea preparatelor obţinute utilizând lipaza din Ps.F a fost mai scăzută, după 11 cicluri de reacţie 40% din valoarea activităţii iniţiale a fost totuşi recuperată.



(a) (b)

Figura 1. Activitatea totală relativă a lipazei din *Candida antarctica* B (a) si a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (b) native şi imobilizate în cazul utilizării repetate în reacţia de acilare a 2-hexanolului, la 40°C în n-hexan. (SGE-A – entarpare sol-gel şi adsorpţie, SGE – entrapare sol-gel).

Evaluarea stabilităţii operaţionale a altor enzime entrapate in matrici de sol-gel

Stabilitatea operaţională în mai multe cicluri de reacţie a fost evaluată şi pentru β-galactozidaza din *Kluyveromyces lactis*, entrapată în matrici de sol-gel obţinute prin utilizarea unui amestec de silani TEOS:nOcTEOS 23:1. Influenţa numărului de reutilizări asupra activităţii preparatului enzimatic a fost studiată pentru două reacţii de hidroliză a substratului artificial (ONPG) cât şi a lactozei. După fiecare reutilizare preparatul a fost recuperat prin centrifugare. Activitatea preparatului a fost determinată pe baza cantităţii de produs format (o-nitrofenol, respectiv glucoză) în 15 minute pentru ONPG, respectiv 30 min în cazul lactozei.

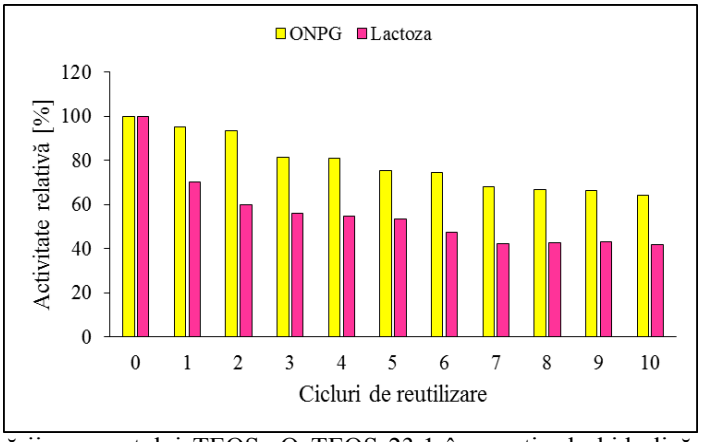
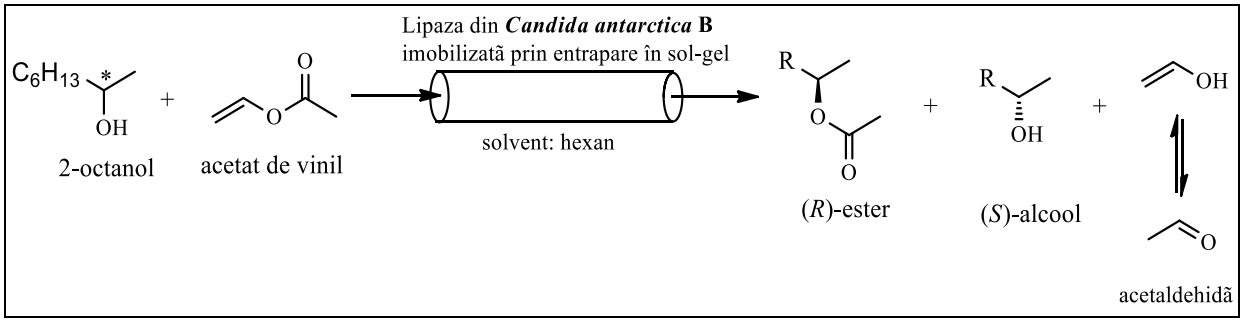


Figura 2. Studiul reutilizării preparatului TEOS:nOcTEOS 23:1 în reacţia de hidroliză a ONPG şi a lactozei în sistem discontinuu

Din **Figura 2** se observă că activitatea enzimei imobilizate scade după fiecare reutilizare, dar activitatea relativă a preparatului după 10 reutilizări este totuşi de peste 60% în cazul hidrolizei ONPG şi 40% în cazul hidrolizei lactozei.

Activitatea 3.3. Studiul rezolutiei cinetice enzimatice utilizând un bioreactor continuu - Partea I

În vederea realizării unui proces eficient în bioreactorul continuu a fost selectat biocatalizatorul cu cele mai bune performanțe din în sistem discontinuu, iar reacţia investigată a fost acilarea 2-octanolului. Lipaza din *CalB* imobilizată prin entrapare în sol-gel a fost introdus într-un reactor tubular din oțel inoxidabil, termostatat, iar substratul dizolvat în mediul de reacție a fost vehiculat cu ajutorul unei pompe HPLC.



Schema 7. Sistem continuu de rezolutie cinetică enzimatică a 2-octanolului catalizată de lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol gel

Studiul parametrilor care influenţează activitatea şi selectivitatea enzimei in bioreactorul continuu

Influența debitului asupra activității și selectivității enzimei în bioreactorul continuu

Testarea bioreactorului continuu (conținând 1,28 g biocatalizator) pentru acilarea 2-octanolului cu acetat de vinil în mediu de n-hexan, s-a realizat la o concentrație a substratului de

0,1 M, la un raport molar acetat de vinil:2-octanol de 3:1, temperatura de 40°C și la diferite valori ale debitului (0,1, 0,2 și 0,5 ml/min).

Probele prelevate la intervale de timp stabilite au fost analizate prin cromatografie de gaze chirală. Au fost calculate: productivitatea raportată la enzimă (exprimată în μmoli $min^{-1}g^{-1}$), raportul enantiomeric E și conversia (%). Rezultatele obținute (**Figurile 3 a,b**) indică o creștere a valorilor parametrilor determinați în primele 40 min, urmată de menținerea eficienței catalitice ridicate în regim continuu, demonstrată prin stabilitatea valorilor productivității și raportului enantiomeric până la 240 min de exploatare.

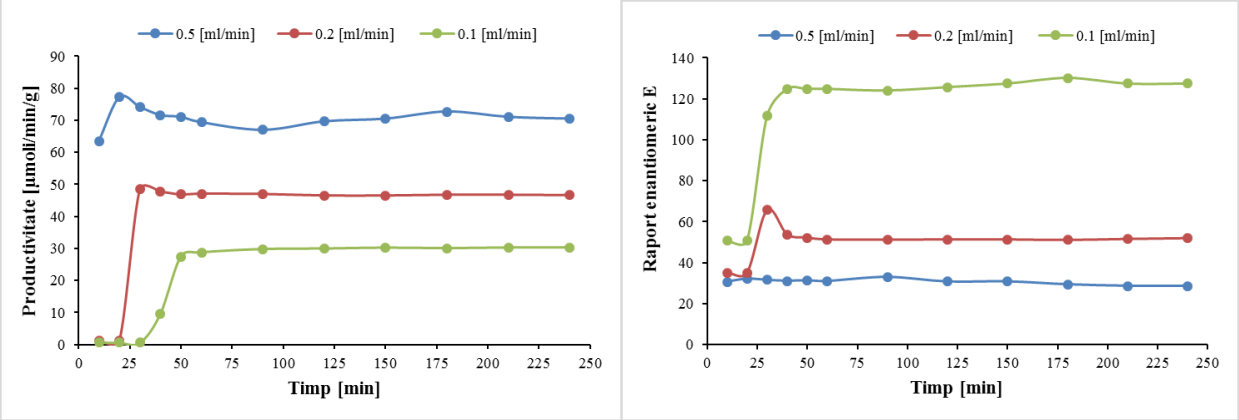


Figura 3. Influența debitului asupra productivității (a) și a raportului enantiomeric (b) în reacția de acilare a 2-octanolului cu acetat de vinil în mediu de n-hexan, în sistem continuu.

Influența temperaturii asupra activității și selectivității enzimei în bioreactorul continuu

Influența temperaturii s-a studiat în bioreactorul tubular la o concentrație a 2-octanolului de 0,275 M, la un raport molar acetat de vinil:2-octanol de 3:1, la trei valori diferite ale temperaturii (40°C, 50°C și 60°C) și a debitului (0,1, 0,3 și 0,5 ml/min). Rezultatele prezentate în **Tabelul 11** indică o creștere a productivității cu creșterea temperaturii și a debitului. În ceea ce privește raportul enantiomeric valorile cele mai ridicate au fost determinate în urma experimentelor efectuate la 40°C, valorile parametrului E fiind invers corelate cu valorile temperaturii.

Tabel 11. Influența temperaturii asupra productivității și raportului enantiomeric

Debit [ml/min]	Productivitate [μmoli/min/g]			Raport enantiomeric E		
	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
0.1	12	22	17	176	55	6
0.3	35	37	38	155	92	81
0.5	54	60	78	232	148	8

Influența donorul de acil asupra activității și selectivității enzimei în bioreactorul continuu

Influența donorului de acil a fost studiată utilizând acetatul de vinil și 2-(prop-2-in-1-iloxi) acetat de 2,2,2-trifluoroetil utilizând ca și substrat racemic *rac*-2a. Rezultate obținute sunt prezentate în Tabelele 12 și 13.

Se observa că, odată cu creșterea temperaturii, gradul de transformare al feniletanolului crește până aproape de valoarea maximă de 50%; creșterea e cu atât mai pronunțată cu cât debitul este

mai mic, adică timpul de rezidență în reactor al substratului crește. Deși conversia maximă se atinge la debitul minim testat de 0,2 mL/min, productivitatea maximă a reactorului se obține la debitul de 0.5 ml/min, la temperatura de 65°C, când conversia atinsă este de 42,1%.

Tabel 12. Productivitatea reactorului în sistem continuu în reacția de acilare a *rac*-2a (10 mM) cu acetat de vinil (3 echiv.) la diferite temperaturi şi debite de alimentare

Debit (mL/min)	Temperatura (°C)	Conversie (%)	Productivitate (μmol $min^{-1}g^{-1}$)
0.5	25	29.8	23.4
	35	34.4	27.0
	45	38.5	30.2
	50	39.6	31.0
	55	40.39	31.7
	60	41.2	32.3
	65	42.1	33.0
0.4	25	33.7	22.1
	35	38.3	25.1
	45	41.8	27.4
	50	43	28.2
	60	45	29.5
	65	45	29.5
0.3	65	47.5	23.4
0.2	25	45.3	14.0
	35	47.2	14.6
	45	48.5	15.0
	50	48.9	15.2
	55	49	15.2
	60	49.2	15.3

S-a testat şi un mini-reactor tubular cu deplasare (30 × 4.6 mm) în care s-a introdus biocatalizatorul CaL-B-SWCNT (119 mg), alimentat continuu cu soluţia formată din substratul (*rac*-2a), agentul de acilare (2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil) şi *n*-hexan. S-au luat probe pentru HPLC din timp în timp pentru a verifica atingerea regimului staţionar şi pentru a determina conversia. Temperatura de operare a fost de 60°C, concentraţia *rac*-2a a fost 10 mM şi s-a utilizat 1 echivalent de agent de acilare. Rezultatele obţinute sunt trecute în **Tabelul 13**.

Tabelul 13. EKR în sistem continuu a *rac*-2a (10 mM) cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil (1 echiv.) în *n*-hexan la 60°C

Debit (mL/min)	Conversie (%)	Productivitate (μmol $min^{-1}g^{-1}$)
0.5	50.0	21.0
0.7	43.2	25.4
0.8	41.2	27.7
1	34.3	28.8
2	34.1	57.3

Utilizarea sistemului de bioreactor continuu pentru rezoluţia cinetică enzimatică în regim continuu a unor substraturi racemice aromatice

Două substraturile racemice aromatice de interes farmaceutic au fost selectatea pentru studiul rezoluţiei cinetice enzimatice în bioreactorul continuu: 1,5-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen (*rac*-II) și acidul 2-cloro mandelic (*rac* V). Pentru ambele substraturi condițiile optime de reacție

(temperatura şi mediul de reacţie) au fost determinate anterior în sistem discontinuu şi aceste valori au fost utilizate şi pentru experimentele realizate în sistem continuu.
Astfel, în cazul substratului *rac*-II ca mediu de reacţie a fost utilizat amestecul acetat de vinil:tetrahidrofuran (7:3, v/v) la 40°C, iar bioreactorul folosit a conţinut 1.45 g lipază din *Burkholderia cepacia* entrapată utilizând un amestec echimolar de silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS. S-a studiat influenţa debitului (în intervalul 0.3-0.7 ml/min) şi a concentraţiei de substrat (în intervalul 10-100 mM). Rezultatele obţinute (**Tabel 14**) indică valori ridicate ale enantioselectivităţii şi raportului molar la valori mai reduse ale debitului, cu toate că în toate cazurile studiate s-au înregistrat valori ale lui E>200. Deşi valorile calculate pentru productivitate au fost mai ridicate la concentraţii şi debite mai ridicate, pentru selectarea condiţiilor optime a fost necesară şi evaluarea conversiilor substratului şi raportului enantiomeric. Stabilitatea preparatului a fost testată periodic, acesta dovendind o stabilitate excelentă în condţiile de reacţie considerate.

Tabel 14. Influenţa concentraţiei de substrat şi a debitului asupra rezoluţiei cinetice a *rac*-II

Debit [ml/min]	**Timp de reactie [h]**	**Conversie [%]**			**ee_s [%]**			**E**			**Productivitate [μmol h^{-1} g^{-1}]**		
		Concentratie substrat [mM]											
		10	**50**	**100**	**10**	**50**	**100**	**10**	**50**	**100**	**10**	**50**	**100**
0.3	1	44	42	42	73	63	64	>400	>350	>300	43	203	452
	1.5	43	41	41	69	62	64				44	209	412
	2	44	41	42	72	62	63				44	205	387
	2.5	43	41	42	71	62	63				44	207	385
0.5	1	36	34	33	47	43	39	>300	>300	>250	57	360	556
	1.5	37	35	34	50	45	39				61	280	499
	2	38	35	29	52	46	33				63	287	700
	2.5	38	34	33	52	42	39				63	283	519
0.7	1	33	29	28	41	30	28	>250	>250	>250	77	312	612
	1.5	33	30	27	41	32	27				76	307	595
	2	32	30	29	40	32	33				78	306	979
	2.5	33	30	27	40	32	27				76	308	577

În cazul substratului *rac*-V ca mediu de reacţie a fost selectat dizopropil eterul, iar temperatura de reacţie a fost 40°C. Optimizarea reacţiei în bioreactorul care a conţinut 0.844 g biocatalizator, obţinut prin entraparea combinată cu adsorbţie pe Celită 545 a lipazei din *Candida antarctica* A pe baza unui amestec 1.6:0.4:1 de silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS, s-a realizat prin studiul influenţei debitului (0.3-0.5 ml/min) şi a concentraţiei de substrat (5-10 mM). Rezultatele obţinute (**Tabel 15**) indică o tendinţă similară rezultatelor obţinute pentru substratul *rac*-II, adică valori ridicate ale enantioselectivităţii şi a raportului enantiomeric la valori scăzute ale debitului. Stabilitatea preparatului a fost şi de această dată excelentă în condiţiile de reacţie stabilite.

Tabel 15. Influența concentrației de substrat și a debitului asupra rezoluției cinetice a *rac*-V

Debit [ml/min]	Timp de reactie [h]	Conversie [%]		ee_s [%]		E		r_{flow} [µmol h^{-1} g^{-1}]	
		Concentratie substrat [mM]							
		5	10	5	10	5	10	5	10
0.3	1	24	24	27	26	>200	>200	80	94
	1.5	22	22	39	5			31	95
	2	19	20	25	49			55	89
	2.5	21	19	39	20			26	67
0.5	1	17	25	26	19	>200	>200	63	78
	1.5	16	24	13	17			104	94
	2	18	27	12	22			122	103
	2.5	15	28	13	26			95	110

Activitatea 3.4. Imobilizarea enzimelor, personalizată pentru substraturi specifice- Partea II

În cadrul acestei activități s-au continuat cercetările de imobilizare pentru lipaza din *Candida antarctica* A (C-Lecta), prin entrapare în matrici de sol-gel combinată sau nu cu depunere pe suport (Celite sau particule magnetice), folosind două tehnici de imobilizare în matrici sol-gel.

Continuarea investigării tehnicilor de imobilizare: entrapare combinată cu depunere pe suport

A. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu depunere pe suport - SGE-A

Mod de lucru:

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml soluție enzimă (120 mg/ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), 200 µl lichid ionic ($OmimBF_4$), 100 µl soluție florură de sodiu 1 M și 200 µl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menţinut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) cu menţinerea agitării până la gelifiere, moment în care s-a introdus **0,5 g Celite 545 sau 0,240 g particule magnetice**. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic şi 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obţinut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore şi la etuva de vid timp de 24 de ore.

B. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu depunere pe suport – SGE-prep-A

Mod de lucru:

Într-o filoă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de o oră pe un agitator magnetic a 3 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare, 0,2 ml apă distilată şi 30 µl acid clorhidric 0,04M. Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml soluție enzimă (120 mg/ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), 200 µl soluție lichid ionic şi 200 µl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menţinut 30 minute pe agitatorul magnetic (600 rpm) pentru omogenizare. SOL-ul apos obţinut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml şi s-au mai introdus sub agitare 1,4 ml soluţie de lipază şi 100 µl amoniac 25%. Agitarea s-a menţinut până când amestecul a gelifiat, moment în care s-a introdus **0,5 g Celite 545** sau **0, 240 g particule magnetice**. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic şi 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obţinut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore şi la etuva de vid timp de 24 de ore.

C. Reacții de acilare enantioselectivă cu lipazele imobilizate

Evaluarea activităţii şi enantioselectivităţii preparatelor enzimatice imobilizate, în comparaţie cu lipazele native, s-a realizat inițial pentru reacţia de acilare a unor alcooli secundari model (2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol) cu acetat de vinil în mediu de solvent organic (n-hexan), la 40°C.

Mod de lucru:
Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus alcool secundar şi acetat de vinil (raport molare de 1:3), 1 ml solvent organic şi 15 µl n-decan sau n-dodecan (standard intern). La momentul zero al reacţiei s-a introdus 25 mg preparat enzimatic obţinut. Fiola de sticlă conţinând amestecul de reacţie a fost plasată într-o incintă termostatată la 40ºC şi supusă agitării la 300 rotaţii/min. Reacţia a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la 24 de ore de reacţie cu ajutorul unei micropipete. Pe baza analizelor efectuate, prin metoda standardului intern s-au calculat conversia alcoolului C (%), masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate A_{tr} ($\mu mol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$) şi randamentul de regăsire a activităţii enzimatice η_{reg} (%) la 24 de ore de reacţie. Pentru calculul randamentelor de regăsire ale activităţii enzimatice după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleaşi condiţii, în care s-a utilizat 5 mg lipază nativă.
Pe baza datelor din literatură [vii], s-a presupus că lipazele utilizate sunt (*R*)-specifice în reacţia de acilare a alcoolilor secundari testaţi, deci produsul principal a fost considerat a fi (*R*)-esterul. Excesul enantiomeric al produsului (e.e.$_P$) a fost calculat pe baza ariilor picurilor enantiomerilor. Separarea celor 2 enantiomeri (*S*) şi (*R*) ai esterului obţinut prin reacţia de transesterificare s-a realizat pe o coloană gaz-cromatografică chirală Astec Chiraldex B-PM (30m x 0,25 mm), iar ca fază mobilă s-a utilizat H_2 la un debit de 2 ml/min.

Acilarea alcoolilor secundari catalizată de lipaze imobilizate prin entrapare în sol-gel

S-a studiat influența metodei de imobilizare și naturii suportului asupra proprietăților catalitice ale preparatelor imobilizate obținute. Rezultatele obținute în urma reacțiilor de acilare a substraturilor selectate (2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol), după 24 de ore de reacție cu acetat de vinil, în n-hexan la 40°C, sunt prezentate în Tabelele 16-18.

Tabelul 16 Acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil în n-hexan la 40°C catalizată de lipaza din *Candida antarctica* A imobilizată prin entrapare în sol-gel (PhTMOS:VTMOS:TMOS, raport molar 1.6:0.4:1) combinată cu depunere pe suport (SGE-A şi SGE-prep-A).

Suport	**Conversie (%)**		**Activitate ($\mu mole \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)**		**Activitate totală relativă**		**e.e. (%)**		**E**	
	SGE-A	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***
Particule magnetice	68	17	0,521	0,117	2,6	0,3	-	98	1	135
Celite 545	73	11	0,592	0,057	2,9	0,2	-	98	1	111
CALA nativă	57		1,903		1		6		1	

Tabelul 17. Acilarea 2-heptanolului cu acetat de vinil în n-hexan la 40°C catalizată de lipaza din *Candida antarctica* A imobilizată prin entrapare în sol-gel (PhTMOS:VTMOS:TMOS, raport molar 1.6:0.4:1) combinată cu depunere pe suport (SGE-A şi SGE-prep-A).

Suport	**Conversie (%)**		**Activitate ($\mu mole \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)**		**Activitate totală relativă**		**e.e. (%)**		**E**	
	SGE-A	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***
Particule magnetice	94	16	0,675	0,036	18,2	0,5	1	96	1	56
Celite 545	93	14	0,643	0,010	17,5	0,2	2	96	1	63
CALA nativă	17		0,348		1		2		1	

Tabelul 18 Acilarea 2-octanolului cu acetat de vinil în n-hexan la 40°C catalizată de lipaza din *Candida antarctica* A imobilizată prin entrapare în sol-gel (PhTMOS:VTMOS:TMOS, raport molar 1.6:0.4:1) combinată cu depunere pe suport (SGE-A și SGE-prep-A).

Suport	**Conversie (%)**		**Activitate ($\mu mole \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)**		**Activitate totală relativă**		**e.e. (%)**		**E**	
	SGE-A	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***	***SGE-A***	***SGE-prep-A***
Particule magnetice	96	5	0,809	0,047	15,4	0,5	1	96	1	57
Celite 545	96	3	0,834	0,025	16,1	0,3	3	97	2	79
CALA nativă	10		0,490		1		15		1	

Din **Tabelele 16-18** se observă că biocatalizatorii obținuți prin entrapare în sol-gel combinată cu depunere pe suport (metoda SGE-A) prezintă activități de aproape 1,7 ori mai mari decât cele ale lipazei native pentru substraturile 2-heptanol și 2-octanol. Excepție a fost substratul 2-hexanol unde s-a înregistrat o scădere de 3,4 ori a activității după imobilizare. Nu se observă diferențe semnificative în ceea ce privește tipul suportului folosit. Prin contrast, metoda *SGE-prep-A* (metoda care se bazează pe formarea unui sol prepolimer) a condus la biocatalizatori imobilizati cu activități de acilare foarte mici în comparație cu lipaza nativă.

Așa cum era de așteptat, pentru preparatele obținute cu metoda combinată *SGE-A* activitatea totală relativă a crescut de până la 17-18 ori comparativ cu lipaza nativă, atunci când biocatalizatorii au fost testați în reacția de acilare a 2-heptanolului și 2-octanolului (Tabele 17-18), eficienţa catalitică fiind mai ridicată comparativ cu preparatul obținut doar prin entrapare în sol-gel.

În ceea ce privește excesul enantiomeric, se poate observa din valorile enantioselectivității în reacțiile de acilare catalizate de preparatele imobilizate obținute în conformitate cu metoda *SGE-A* au fost foarte mici pentru toți alcoolii testați. Biocatalizatorii obținuți cu sol-gel prepolimer (metoda *SGE-prep-A*) au avut enantioselectivitate ridicată (valori ale excesului enantiomeric e.e. >96 % și rapoarte enantiomerice E mari) pentru toate substraturile testate.

În cazul substraturilor aromatice, lipaza din *Candida antarctica* A s-a dovedit eficientă pentru compusul *rac*-V. Ca mediu de reacție a fost utilizat diizopropil eterul. Reacțiile s-au efectuat cu acetat de vinil ca donor de acil, la 40°C, timp de 24h și utilizând 40 mg preparat. Rezultatele prezentate in **Tabelele 19-20** indică valori mai ridicate ale conversiilor și excesului enantiomeric pentru preparatele obținute prin metoda *SGE*, respectiv *SGE-A*.

Tabelul 19 Utilizarea preparatelor de *Candida antarctica* A imobilizate prin metoda *SGE-A* în reacția de acilare enantioselectivă a substratului *rac-V* .

Silani precursori	**Raport molar**	**Conversie [%]**	***ees* [%]**
V:TMOS	1:1	14	6
Ph:TMOS	1:1	43	67
Oc:TMOS	1:1	44	60
Ph:Me:TMOS	1.6:0.4:1	47	82
Ph:V:TMOS	1.6:0.4:1	48	86
Ph:V:TMOS + Celite 545	1.6:0.4:1	48	90
Ph:V:TMOS+particule magnetice	1.6:0.4:1	41	47

Tabelul 20. Utilizarea preparatelor de *Candida antarctica* A imobilizate prin metoda *SGE-prep-A* în reacţia de acilare enantioselectivă a substratului *rac-V*.

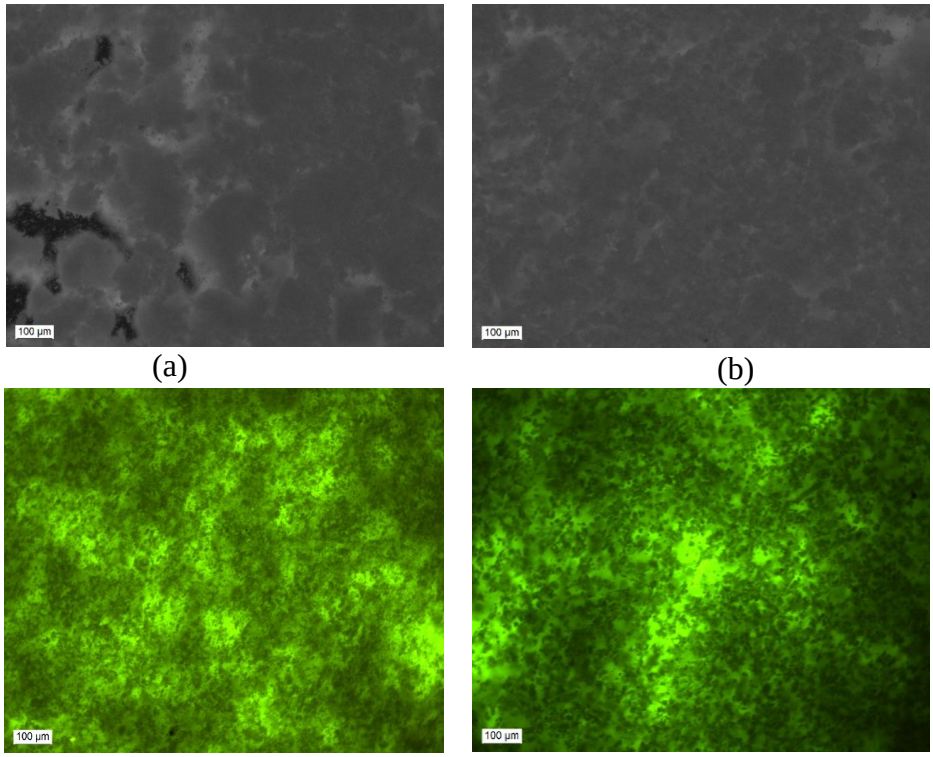
Silani precursori	Raport molar	Conversie [%]	*ees* [%]
V:TMOS	1:1	43	1
Oc:TMOS	1:1	32	3
Ph:V:TMOS	1.6:0.4:1	47	2
Ph:Me:TMOS	1.6:0.4:1	47	0
Ph:V:TMOS + Celite 545	1.6:0.4:1	22	0
Ph:V:TMOS+ particule magnetice	1.6:0.4:1	26	1

Caracterizarea biocatalizatorilor imobilizați

Investigarea biocatalizatorilor prin microscopie cu fluorescență

Distribuția enzimei imobilizate în matricea sol-gel a fost investigată prin microscopie cu fluorescență. În acest scop lipaza din *Candida antarctica* A a fost marcată cu izotiocianat de fluoresceină (FITC), un derivat al fluoresceinei care conţine o grupare reactivă izotiocianat și care reacţionează cu grupările amino primare, sulfhidril, imidazoil, tirozil sau carbonil din proteine, peptide sau alte biomolecule.

Marcarea lipazei din *Candida antarctica* A (Figura 4) a fost realizată folosind metoda descrisă în PIERCE EZ-LabelTM FITC Labeling Kit, iar imobilizarea enzimei marcate a fost realizată utilizând aceleași metode ca și în cazul enzimei nemarcate.



(a) (b) (c) (d)

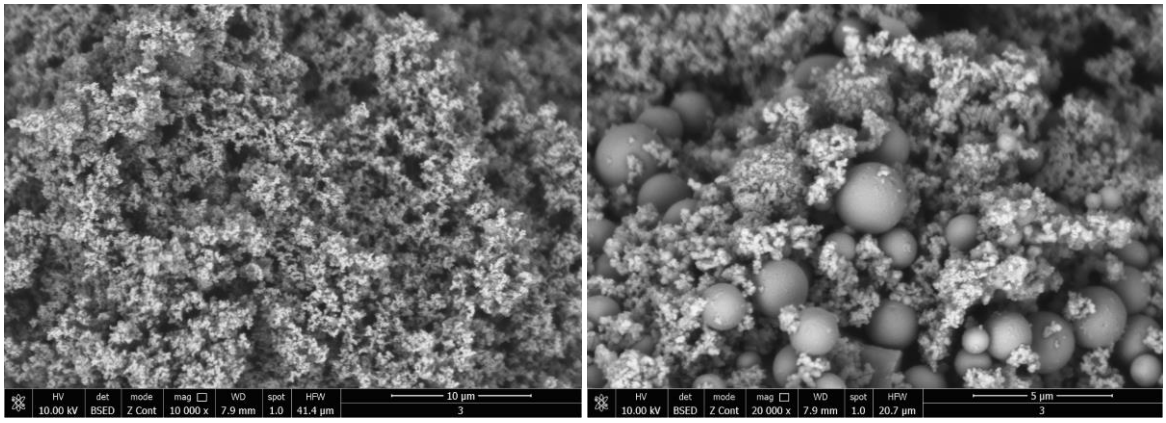
Figura 4. Imaginile fluorescente (magnificaţie *10 X*) ale preparatelor enzimatice cu lipaza din *Candida antarctica* A obţinute cu PhTMOS, VTMOS şi TMOS (raport molar 1,6:0,4:1) şi [Omim]BF_4 ca aditiv şi Celite 545 ca suport: *(a)* SG-martor (*SGE-A*); *(b)* SG-lipază (*SGE-A*); *(c)* SG-lipază-FITC (*SGE-A*); *(d)* SG-lipază-FITC (*SGE-prep-A*).

Din **Figura 4 (a-d)** se poate observa că numai lipaza marcată prezintă fluorescenţă în timp ce probele martor (sol-gel fără enzimă şi sol-gel cu lipaza imobilizată nemarcată) nu au această proprietate. Agentul de marcare este distribuit în întreaga matrice, ceea ce indică o distribuţie uniformă a enzimei în masa preparatului. Se poate observa că nu există diferenţe semnificative în ceea ce priveşte fluorescenţa preparatului obţinut prin cele doua tehnici de imobilizare. Rezultă că diferenţele semnificative în ce priveşte valorile activităţii nu sunt cauzate de distribuţia diferită a enzimei în interiorul matricii, ci probabil de morfologia diferită a acestora, în special forma şi dimensiunile porilor care pot cauza limitări importante în privinţa transferului de masă în interiorul matricii de sol-gel.

Investigarea biocatalizatorilor prin microscopie electronică de scanare (SEM)

În cadrul acestui studiu, s-a realizat caracterizarea biocatalizatorilor obținuți prin entrapare în sol-gel (folosind cele 2 metode prezentate) în vederea stabilirii influenței metodei de imobilizare asupra morfologiei suprafeţei preparatelor enzimatice, în relaţie cu proprietățile catalitice ale acestora.

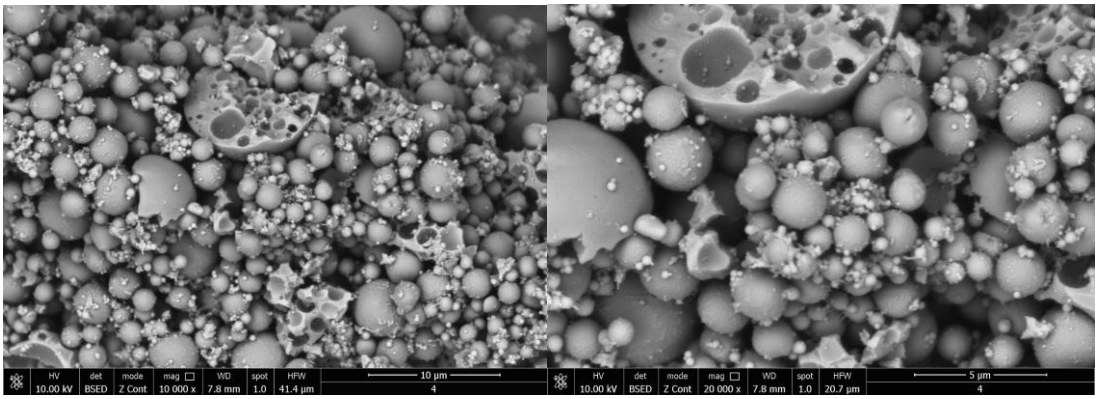
Imaginile SEM ale biocatalizatorilor cu lipaza din *Candida antarctica* A imobilizată prin entrapare în sol-gel și prin entrapare în sol-gel cu sol prepolimer, folosind un sistem ternar de silani precursori (PhTMOS, VTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1) și lichidul ionic [Omim]BF_4 ca aditiv sunt prezentate în Figura **5 a, b.**



(a) (b)

Figura 5. Imaginea SEM a lipazei din *Candida antarctica* A imobilizatată prin entrapare în sol-gel realizată la diferite magnificații: *(a) 10000 X; (b) 20000 X*. Matricea sol-gel a fost obţinută cu silanii precursori PhTMOS, VTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1 folosindi lichidul ionic [Omim]BF_4 ca aditiv (Metoda 1).

Pentru preparatul obținut prin entrapare în sol-gel la un raport molar de 1,6: 0,4:1 al silanilor precursorilor, s-a obținut o structură poroasă specifică nanomaterialelor tip silice. Se observă o structură granulară formată din particule nanostructurale cu microcanale pe toată suprafața scanată, combinată cu particule sferice de dimensiuni între 0,5-2 µm, care este corelată cu cele mai bune valori ale activității de transesterificare pentru toate subtraturile testate (Figura 5). Acest lucru poate fi datorat prezenței acestor microcanale, prin care substratul poate ajunge cu ușurință la centrul activ al lipazei, fără a fi împiedicat de matricea sol-gel.



(a) (b)

Figura 6. Imaginea SEM a lipazei din *Candida antarctica* A imobilizatată prin entrapare în sol-gel cu sol-prepolimer, realizată la diferite magnificații: *(a) 10000 X; (b) 20000 X*. Matricea a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, VTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1 și lichidul ionic [Omim]BF_4 ca aditiv (Metoda 2).

Imaginile SEM ale preparatului enzimatic obținut cu metoda de entrapare în sol-gel cu sol prepolimer sunt diferite. Din Figura 6 se observă o aglomerare de particule sferice de dimensiuni între 0,1-7 µm, cu foarte puține zone granulare (în secțiune se observă că particulele prezintă o structură poroasă). Această structură a biocatalizatorului este corelată cu valori scăzute ale activității pentru substraturile testate, dar spre deosebire de studiile anterioare unde odată cu scăderea activității enzimatice a scăzut și enantioselectivitatea preparatului enzimatic, în acest caz s-au obținut valori excelente ale excesului enantiomeric și raportului enantiomeric E.

<u>Activitatea 3.5</u>. Diseminarea rezultatelor prin publicare în reviste cotate ISI şi prezentări la conferinţe internaţionale

În conformitate cu planul de activităţi al proiectului, s-a realizat diseminarea trimiterea la publicare a două lucrări în reviste cu factor de impact, prin participare cu șapte lucrări la conferințe internaționale de prestigiu și nouă lucrări la conferințe naționale cu participare internațională, din domeniul biocatalizei și nanomaterialelor.

Articole în reviste de specialitate indexate în baza de date Web of Science (ISI)

1. Adinela Cimporescu, Anamaria Todea, Valentin Badea, Cristina Paul, Francisc Peter, Efficient kinetic resolution of 1,5-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase in batch and continuous-flow system, *Process Biochemistry*, acceptată spre publicare, http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.023.

2. Diana Aparaschivei, Anamaria Todea, Iulia Păuşescu, Valentin Badea, Mihai Medeleanu, Eugen Şişu, Maria Puiu, Adela Chiriţă-Emandi, Francisc Peter, Synthesis, characterization and enzymatic degradation of copolymers of ε-caprolactone and hydroxy-fatty acids, *Pure and Applied Chemistry*, acceptată spre publicare, DOI: 10.1515/pac-2016-0920.

Studii prezentate la conferințe internaționale

1. Mădălina Elena Moisă, Csaba Paizs, László Poppe, Florin Dan Irimie, Monica Ioana Toşa: Click Reaction Strategy Applied in the Enzymatic Kinetic Resolution Processes, *„Systems Biocatalysis" COST Training School*, Siena, Italy, 27th-30th April **2016**, poster.

2. Mădălina Elena Moisă, Csaba Paizs, László Poppe, Florin Dan Irimie, Monica Ioana Toşa: Click Reactions for Efficient Enzymatic Kinetic Resolution Processing *,3Ird Symposium „Biotransformations 2016”*, Warsaw, Poland, 30th June-2nd July **2016**, prezentare orală.

3. Anamaria Todea, Diana Aparaschivei, Carmen G. Boeriu, Francisc Peter, A green chemistry route to novel copolyesters, OR 57, *16th International Conference on Polymers and Organic Chemistry*, Hersonissos, Crete, Greece, 13–16 June **2016** Book of Abstracts p 45, prezentare orală.

4. Anamaria Todea, Diana Aparaschivei, Adinela Cimporescu, Valentin Badea, Carmen G. Boeriu, Francisc Peter, Efficient biocatalytic route towards new ε-caprolactone copolyesters using microbial lipases, PS 44, *16th International Conference on Polymers and Organic Chemistry*, Hersonissos, Crete, Greece, 13–16 June **2016** Book of Abstracts p 139, poster.

5. Cristina Paul, Paula Borza, Anamaria Todea, Francisc Péter, Sol-gel immobilized biocatalyst for continuous-flow enantioselective acylation, *The 17th European Congress on Biotechnology*, 3–6 Iulie 2016, Krakow, Poland, *Abstracts / New Biotechnology* **2016**, 33S, S104, P8-32, ISSN 1871-6784, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1086, poster.

6. Emese Biro, Gianina Bratiloveanu, Anamaria Todea, Francisc Peter, Synthesis of galacto-oligosaccharides by immobilized galactosidase using alkyl or aryl substituted silane precursors for efficient sol-gel entrapment, *The 17th European Congress on Biotechnology*, 3–6 Iulie 2016, Krakow, Poland, *Abstracts / New Biotechnology* **2016**, 33S, S104, P8-30, ISSN 1871-6784, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1084, poster.

7. Valentin Badea, Vasile Bercean, Alina Mihaela Muscoi Mindruleanu, Synthesis and characterization by 2D NMR spectroscopy of a new 1-(1H-4-ethoxycarbonyl-3-methyl-pyrazol-5-yl)-azo-2,7-dihydroxynaphthalene and its cyclized derivatives of 8-hydroxy-2-methyl-naphtho[2,1-e]pyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazine, *18th Central and Eastern European NMR Symposium & Bruker Users' Meeting CEUM*, 18-20 September **2016**, Sofia, Bulgaria, p 43, P 15, poster.

Studii prezentate la conferințe nationale cu participare internationala

1. Mădălina Elena Moisă, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Gábor Hornyánszkiy, Monica IoanaToşa: Click chemistry - an efficient tool in biocatalysis, *Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE I)*, Cluj-Napoca, Romania, 12th-14th May **2016**, poster.

2. Botond Nagy, Zsolt Galla, Csaba Paizs, Enikő Forró, Ferenc Fülöp: Synthesis and enzymatic kinetic resolution of novel 3-amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propanoic acid ethyl esters, *Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE I)*, Cluj-Napoca, Romania, 12th-14th May **2016**, poster.

3. Mădălina Elena Moisă, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Francisc Péter, Monica Ioana Toşa: Studii de activitate, selectivitate şi stabilitate ale unor preparate noi de lipaze imobilizate pentru ekr a unor etanoli heteroaromatici, *”QUALITY AND EXCELLENCE IN DOCTORAL RESEARCH”* Conference organised in the frame of POSDRU/187/1.5/S/155383 project, Băile Felix, Romania, 16th-20th December 2015, prezentare orală.

4. Gianina Bratiloveanu, Francisc Péter, Emese Biró, Anamaria Todea, Improvement of β-galactosidase properties by immobilization in sol-gel matrices using substituted silane precursors,

The 9th edition of the Symposium with International Participation New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection, Timișoara, România, 9-10th June **2016**, P6, poster.

5. Francisc Peter, Anamaria Todea, Diana Aparaschivei, Valentin Badea, Carmen G. Boeriu, Lipases: powerful enzymes for biomaterials synthesis starting from renewable sources, *XXXIVth Romanian Chemistry Conference*, Călimăneşti-Căciulata, România, October 4-7, **2016**, P 1, C.S.IV.-1, prezentare orală.

6. Anamaria Todea Francisc Peter, Linda G. Otten, Isabel W.C.E. Arends, Carmen G. Boeriu, One-pot system for synthesis of estolides by using a combination of two enzymes, *XXXIVth Romanian Chemistry Conference*, Călimăneşti-Căciulata, October 4-7, **2016**, P 17, C.S.I. - 17, prezentare orală.

7. Valentin Badea, Vasile Nicolae Bercean, Alina Mihaela Muscoi Mîndruleanu, Ana Maria Todea, Synthesis of azaheterocyclic compounds or their precursors and 1H-15N 2D NMR spectroscopy as a useful tool for structure determination, *XXXIVth Romanian Chemistry Conference, Călimăneşti-Căciulata*, October 4-7, **2016**, P 10, CP 10, conferinta plenară.

8. Paula Borza, Adinela Cimporescu, Anamaria Todea, Cristina Paul, Francisc Peter, Continuous kinetic resolution of racemic aromatic alcohols in packed bed bioreactors, *XXXIVth Romanian Chemistry Conference*, Călimăneşti-Căciulata, October 4-7, **2016**, P.S.I.-35, CP 10, poster.

9. Diana Aparaschivei, Anamaria Todea, Iulia Păușescu, Valentin Badea, Mihai Medeleanu, Eugen Șișu, Maria Puiu, Adela Chiriță-Emandi, Francisc Peter, Enzymatic degradation of new copolymers synthesized from e-caprolactone and hydroxy-fatty acids, *The XVIIIth Symposium Young People and Multidisciplinary Research*, Timișoara, Romania, November 10-11, **201**6, p 22, B2, prezentare orală.

Referinţe bibliografice

[i] Paizs C., Toşa M., Majdik C., Moldovan P., Novák L., Kolonits P., Marcovici A., Irimie F. D., Poppe L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1495-1501

[ii] Paizs C., Toşa M., Bódai V., Szakács G., Kmecz I., Simándi B., Majdik C., Novák L., Irimie F. D., Poppe L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1943-1949

[iii] Toşa M. I., Pilbák S., Moldovan P., Paizs C., Szatzker G., Szakács G., Novák L., Irimie F. D., Poppe L., *Tetrahedron: Asymmetry* **2008,** *19*, 1844-1852

[iv] Hapău D., Brem J., Moisă M. E., Toşa M. I., Irimie F. D., Zaharia V., *Heterocycles 32:J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2013**, *94*, 88-94;

[v] Starck M., Kadjane P., Bois E., Darbouret B., Incamps A., Ziessel R., Charbonnière L. J. *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 9164-9179

[vi] Xiao C., Cheng Y., Zhang Y., Ding J., He C., Zhuang X., Chen X. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2014**, *52*, 671-679

[vii] Hasan F., Shah A.A., Hameed A., *Enzyme Microb Tech*, **2006**, *39 (2)*, 235-251.

Director proiect,
Prof. Dr. Ing. Francisc Péter