

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC 2014

Programul: Parteneriate in domenii prioritare, contract nr. 206/01/07.2014

Denumirea programului: Kit inovativ în sinteza compușilor chimici optic puri prin combinarea biocatalizei cu procesarea prin reacții tip click

Acronim proiect: BIOCLICK

Etapa 1. Sinteza chimică și separarea enantiomerică la scală analitică a substraturilor racemice

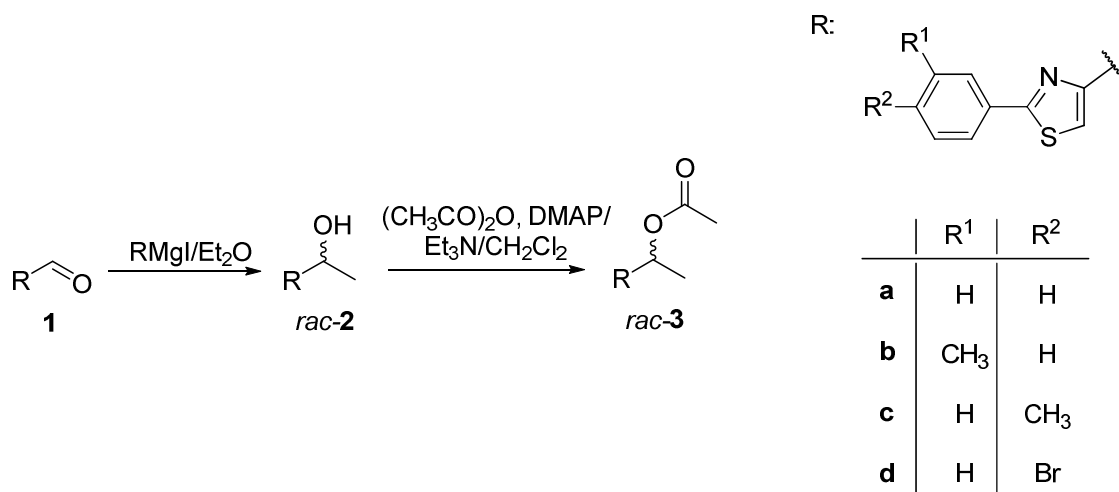
Rezumatul etapei

S-a realizat sinteza și purificarea avansată a unor substraturi racemice cu structură de heteroaril-etanooli și α -hidroxiacizi heteroatomici, utilizând metode de reacție și purificare cunoscute din chimia orgânică. Structura compușilor obținuți a fost validată prin spectrometrie de masă și spectrometrie de rezonanță magnetică ^1H și ^{13}C . Aceste substraturi racemice prezintă importanță ca posibili intermediari pentru compuși cu acțiune biologică și vor fi studiate în etapa următoare în ce privește separarea lor în enantiomeri. În acest scop, au fost elaborate metodele de separare și analiză cromatografică a izomerilor optici ai compușilor de tip alcooli, esteri și hidroxiacizi. Cromatografia chirală prezintă o serie de dificultăți în sensul că faza staționară trebuie să fie compatibilă stereochemic cu structura compusului analizat pentru a fi posibilă separarea. Testele preliminare de imobilizare a lipazelor realizate prin două metode, incluziune în structuri de tip sol-gel și legare covalentă pe particule magnetice, au dus la rezultate bune pentru compușii model, cu randamente mari de regăsire a activității enzimatică totale după imobilizare și enantioselectivitate mai mare decât a enzimei native. Aceste metode urmează să fie ajustate fin, în funcție de caracteristicile substraturilor țintă, pentru a obține eficiența catalitică și efectul de discriminare cinetică optime. O parte dintre rezultatele acestei etape au fost diseminate la două manifestări științifice, o conferință internațională și una națională cu participare internațională, sub forma unei prezentări orale (conferință în secțiune) și trei postere. În concluzie, se poate afirma că toate obiectivele asumate pentru Etapa 1 a proiectului au fost îndeplinite.

Descrierea științifică și tehnică

Activitatea 1.1. Sinteza unor substraturi racemice

A. Sinteza substraturilor chirale racemice cu structura de heteroaril-etanoliⁱ



Schema 1. Sinteza heteroaril-etanolilor racemici

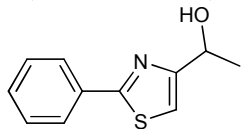
Pentru sinteza etanolilor chirali cu diferiți substituenți se utilizează în general ca materii prime, fie disponibile comercial, fie obținute prin reacții de formilare. Prin reacția Grignard a acestor aldehide cu ioduri sau bromuri de alchil, în eter, se obține amestecul racemic al alcoolilor chirali. Sinteza esterilor corespunzatori racemici s-a realizat prin acilare cu anhidridă acetică în prezența trietilaminei și a dimetilaminopiridinei (DMAP) ca și catalizator.

Spre exemplu, obținerea 2-fenil-tiazol-4-il-etanolilor s-a realizat prin adaugarea lentă, sub argon, a soluției aldehidei (3.73 mmol) în dieteil eter (10 mL) într-o soluție care conține iodura de metil magneziu, preparată din magneziu (5.6 mmol, 0.134 mg) și iodura de metil (5.6 mmol, 0.79 g, 0.348 mL) în eter etilic (5 mL). Reacția se perfectează 2 ore la 50°C; amestecul se tratează la 0°C cu o soluție saturată de clorură de amoniu (12 mL) iar din stratul organic se reia extracția în eter (2 x 10 mL). După uscarea straturilor organice reunite pe Na₂SO₄ anhidru și eliminarea solventului prin distilare la vid, alcoolul se purifică pe silicagel folosind ca eluent amestecul CH₂Cl₂/acetona (25:1 v/v).

Mod de lucru: În soluția unui heteroariletanol (*rac-2a-d*, 0.6 mmol) în diclorometan anhidru (3 mL) se adaugă trietilamina (0.66 mmol, 66.8 mg, 92.1 μL), anhidrida acetică (0.66 mmol, 67.32 mg, 62.2 μL) și DMAP (0.016 mmol, 2 mg). Reacția se perfectează la temperatură camerei, se adaugă apă (10 mL), iar din stratul organic uscat pe Na₂SO₄ anhidru se separă după îndepărtarea la vid a solventului produsul pur prin cromatografie pe coloana cu silicagel folosind ca eluent amestec diclorometan-acetona (25:1, v/v).

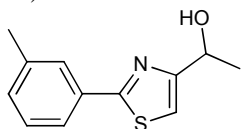
Structura compușilor sintetizați a fost confirmată prin spectrometrie de masă și spectre de rezonanță magnetică nucleară.

1-(2-feniltiazol-4-il)etanol (*rac*-2a)



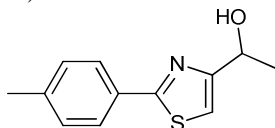
η : 80%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.60(d, J = 6.1 Hz, 3H); 5.04(q, J = 6.1 Hz, 1H); 7.11(s, 1H); 7.32-7.50(m, 3H); 7.81-8.00(m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 22.9; 66.6; 112.9; 126.6; 128.9; 130.1; 133.4; 161.7; 168.5; HRMS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NOS}$): 205.0565 (205.0561); ESI^+ -MS: m/z (%): 206 (M+1, 16); 205 (M, 31); 190 (100); 162 (63); 121 (15); 104 (15); 77 (20); 59 (19); 45 (12); 43 (24).

1-(2-m-toliltiazol-4-il)etanol (*rac*-2b)



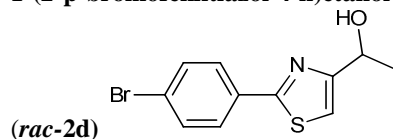
η : 82%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.62 (d, J = 6.4 Hz, 3H); 2.41 (s, 3H); 5.04 (q, J = 5.0 Hz, 1H); 7.10 (s, 1H); 7.23 (d, J = 7.5 Hz, 1H); 7.32 (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.72 (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.77 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 21.3; 22.9; 66.7; 112.4; 123.7; 127.0; 128.8; 130.9; 133.4; 138.7; 161.5; 168.6; HRMS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NOS}$): 219.0722 (219.0718); ESI^+ -MS: m/z (%): 220 (M+1, 29); 219 (M, 45); 204 (100); 176 (59); 135 (10); 118 (16); 91 (14); 59 (13); 45 (10); 43 (12).

1-(2-p-toliltiazol-4-il)etanol (*rac*-2c)



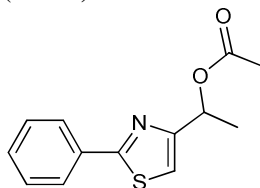
η : 78%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.60 (d, J = 6.5 Hz, 3H); 2.38 (s, 3H); 5.03 (q, J = 6.5 Hz, 1H); 7.1 (s, 1H); 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 2H); 7.81 (d, J = 8.1 Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 21.4; 22.8; 66.5; 112.1; 126.4; 129.5; 130.8; 140.2; 161.4; 168.5; HRMS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NOS}$): 219.0721 (219.0718); ESI^+ -MS: m/z (%): 220 (M+1, 20); 219 (M, 46); 204 (100); 176 (61); 135 (10); 118 (20); 91 (15); 59 (16); 45 (12); 43 (16).

1-(2-p-bromofeniltiazol-4-il)etanol (*rac*-2d)



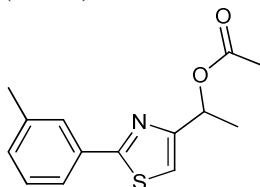
η : 80%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.59 (d, J = 6.5 Hz, 3H); 5.00 (q, J = 6.3 Hz, 1H); 7.13 (s, 1H); 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 2H); 7.77 (d, J = 8.6 Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 22.9; 66.6; 113.0; 124.2; 127.9; 132.0; 132.3; 161.9; 167.0; HRMS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrNOS}$): 282.9662 (282.9666); ESI^+ -MS: m/z (%) = 286 (M+1, ^{81}Br , 17); 285 (M, ^{81}Br , 39); 284 (M+1, ^{79}Br , 21); 283 (M, ^{79}Br , 37); 270 (87); 268 (100); 242 (43); 240 (44); 201 (6); 199 (6); 184 (5); 182 (5); 161 (30); 134 (9); 59 (21); 45 (20); 43 (18).

Acetat de 1-(2-feniltiazol-4-il)etil (*rac*-3a)



η : 91%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.68 (d, J = 6.6 Hz, 3H); 2.11 (s, 3H); 6.09 (q, J = 6.6 Hz, 1H); 7.18 (s, 1H); 7.40-7.42 (m, 3H); 7.93-7.96 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 20.1; 21.2; 68.7; 114.9; 126.5; 128.7; 130.0; 133.4; 157.0; 168.2; 170.1; HRMS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$): 247.0670 (247.0667); ESI^+ -MS: m/z (%) = 248 (M+1, 2); 247 (M, 8); 204 (100); 188 (21); 162 (10); 104 (11); 77 (7); 45 (11); 43 (19).

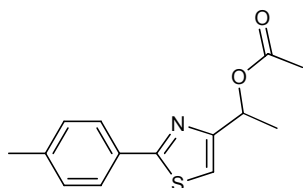
Acetat de 1-(2-m-toliltiazol-4-il)etil (*rac*-3b)



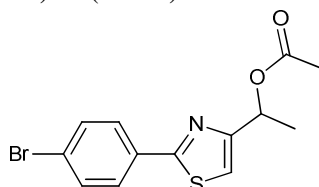
η : 90%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.67 (d, J = 6.6 Hz, 3H); 2.11 (s, 3H); 2.40 (s, 3H); 6.08 (q, J = 6.6 Hz, 1H); 7.17 (s, 1H); 7.22 (d, J = 7.6 Hz, 1H); 7.30 (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.71 (d, J = 7.6; 1H); 7.77 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 20.3; 21.3; 68.8; 114.8; 123.8; 127.0; 128.7; 130.8; 133.4; 138.6; 157.0; 168.6; 170.2; HRMS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$): 261.0820 (261.0823); ESI^+ -MS: m/z (%) = 262 (M+1, 2); 261 (M, 9); 218 (100); 202 (16); 200 (9); 176 (9); 118 (12); 43 (15).

Acetat de 1-(2-p-toliltiazol-4-il)etil (*rac*-3c)

η : 92%; ulei transparent; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.67 (d, J = 6.6 Hz, 3H); 2.11 (s, 3H); 2.38 (s, 3H); 6.07 (q, J = 6.6 Hz, 1H); 7.15 (s, 1H); 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 2H); 7.83 (d, J = 8.2 Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz,



Acetat de 1-(2-p-bromofeniltiazol-4-il)etil (*rac*-3d)



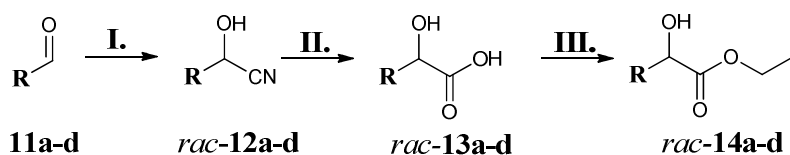
CDCl₃): δ = 20.3; 21.3; 21.4; 68.8; 114.5; 126.5; 129.5; 130.9; 140.3; 157.0; 168.6; 170.3; HRMS: M⁺ determinat (M⁺ calc. pentru C₁₄H₁₅NO₂S): 261.0821 (261.0823); ESI⁺-MS: m/z (%) = 262 (M+1, 2); 261 (M, 10); 218 (100); 202 (17); 200 (9); 176 (10); 118 (13); 43 (14).

η : 91%; solid alb; m.p.: 54-55°C; ¹H NMR : (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.66 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); 2.11 (s, 3H); 6.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H); 7.20 (s, 1H); 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H); 7.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H); ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.2; 21.3; 68.6; 115.3; 124.2; 128.0; 132.0; 132.4; 157.3; 167.0; 170.2; HRMS: M⁺ determinat (M⁺ calc. pentru C₁₃H₁₂BrNO₂S): 324.9769 (324.9772); ESI⁺-MS: m/z (%) = 328 (M+1, ⁸¹Br, 7); 327 (M, ⁸¹Br, 11); 326 (M+1, ⁷⁹Br, 6); 325 (M, ⁷⁹Br, 10); 284 (100); 282 (98); 268 (29); 266 (30); 242 (6); 240 (6); 187 (10); 102 (8); 84 (10); 58 (15); 45 (26); 43 (49).

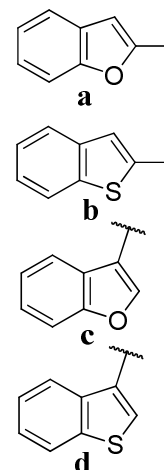
B. Sinteza substraturilor chirale racemice cu structura de α -hidroxiacizi heteroaromaticiⁱⁱⁱ

Pentru sinteza α -hidroxiacizilor s-au utilizat ca intermediari cianhidrinele racemice, preparate tot din aldehidele corespunzatoare,ⁱⁱⁱ prin adiția cianurii de trimetilsiliciu, catalizată de iodură de zinc anhidra, în diclorometan, conform reacțiilor din Schema 3.

Prin hidroliza cianohidrinelor racemice în mediu acid se obțin α -hidroxiacizii doriți, iar pentru esterificarea acestora se activează mai întâi gruparea carboxilică sub formă de clorură.



I. 1. TMSCN, ZnI₂; 2. HCl/MeOH; II. HCl conc./1.4-dioxan; III. SOCl₂, etanol



Schema 3. Sinteza α -hidroxiacizilor heterociclici racemici

Mod de lucru:

În soluția aldehidei **11a-d** (1 mmol) în diclorometan anhidru (10 mL) se adaugă o cantitate catalitică de ZnI₂ anhidru (3.2 mg, 20 μ mol) și cianura de trimetilsiliciu (119 mg, 1.2 mmol). Reacția se perfectează la temperatura camerei până la transformarea complete a aldehidei (control cromatografic). Se evaporă solventul iar amestecul rezultat se

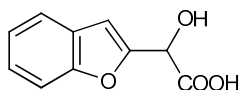
redizolvă în metanol (10 mL) și se descompune complexul format cu HCl (3 M, 5 mL). Masa de reactiv se evaporă la un volum final de 5 mL, se adaugă apa (5 mL) și diclorometan (10 mL) pentru extracția și separarea amestecului. Din faza organică uscată pe Na₂SO₄ se evaporă solventul la vid.

Hidroliza cianohidrinei se realizează prin adaugarea în soluția cianohidrinei racemice brute (1 mmol) în 1,4-dioxan (10 mL) a unui exces de HCl 32% (8 mmol), la reflux, timp de 24 h. Amestecul se concentrează la vid, amestecul brut rezultat se dizolvă în apă (15 mL) și apoi se extrag produșii cu acetat de etil (3×10 mL). Faza organică se spală cu soluție NaHCO₃ (2×15 mL) și apoi se acidulează cu atenție la pH 2, se realizează extracția în acetat de etil (3×5 mL). Fazele organice reunite se spală cu saramura (15 mL), se usuca peste MgSO₄ și se evaporă la vid solventul, obținându-se α-hidroxiacidul urmărit.

Pentru sinteza esterilor, în 10 mL etanol se adaugă în picături 0.36 mL (1 echiv.) SOCl₂ proaspăt distilată astfel încât temperatura să nu depășească -10 °C. În soluția formată se adaugă un hidroxiacid **13a-d** (1 mmol), reacția se perfectează timp de 30 minute la 0 °C și apoi la temperatura camerei pentru încă 3 ore și în final o oră la reflux. Din soluția concentrată la vid se izolează esteri urmăriti *rac*-**14a-d** prin cromatografie pe coloana cu CH₂Cl₂ ca eluent.

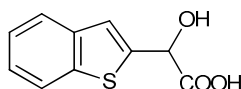
Structura compușilor sintetizați a fost confirmată prin spectrometrie de masă de înaltă rezoluție și spectre de rezonanță magnetică nucleară.

Acid 2-(benzofuran-2-il)-2-hidroxi-acetic (*rac*-13a)



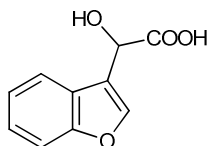
η: 99%; solid galben; pt: 85-86 °C; ¹H-NMR (300 MHz, Acetona): δ = 5.45 (1H, s); 6.91 (1H, s); 7.21-7.33 (2H, m); 7.49 (1H, d, *J* = 8.3 Hz); 7.62 (1H, d, *J* = 7.5 Hz); ¹³C-NMR (75 MHz, Acetona): δ = 68.9, 106.7; 112.8; 123.1; 124.7; 126.3; 129.9; 156.6; 157.0; 173.0; MS: M⁺ determinat (M⁺ calc. pentru C₁₀H₈O₄): 192.0(192.0); MS m/z (%) = 193(68.95, M+1), 192(6.97, M⁺), 149(43.04), 148.1(43.59), 147(23.62), 154(11.24), 126.9(24.45), 104(15.96), 101.1(6.67), 91.1(13.2), 89.1(44.07), 88.1(21.45), 87(12.89), 75(15.21), 73(18.94), 59.1(11.10), 58.1(18.98), 45(100), 44(30.6), 43(22.47).

Acid 2-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-hidroxi-acetic (*rac*-13b)



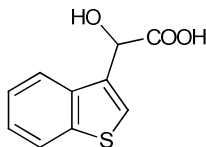
η: 40%; semisolid; ¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 5.12 (1H, s); 7.21-7.36 (3H, m); 7.70 (1H, d, *J* = 8.3 Hz); 7.82 (1H, d, *J* = 7.5 Hz); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO): δ = 70.6, 120.8, 122.6, 123.5, 124.2, 124.5, 139.1, 139.7, 147.1, 173.7; MS: M⁺ determinat (M⁺ calc. pentru C₁₀H₈O₃S): 208.0(208.0); MS m/z (%) = 209(24.67, M+1), 208(5.47, M⁺), 164(11.49), 163(48.62), 162(22.10), 136(5.87), 135(51.69), 134(19.85), 89.1(40.51), 58.1(18.88), 45.1(100).

Acid 2-(benzofuran-3-il)-2-hidroxi-acetic (*rac*-13c)



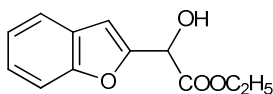
η: 95%; semisolid galben; ¹H-NMR (300 MHz, Acetona): δ = 5.51 (1H, s); 7.22-7.34 (2H, m); 7.51 (1H, d, *J* = 7.5 Hz); 7.80 (1H, d, *J* = 6.7 Hz); 7.90 (1H, s); ¹³C-NMR (75 MHz, Acetona): δ = 67.3, 113.4, 121.6, 122.8, 124.4, 126.3, 127.8, 145.1, 157.2, 174.9; MS: M⁺ determinat (M⁺ calc. pentru C₁₀H₈O₄): 192.1(192.0); MS m/z (%) = 193(25.19, M+1), 192.1(3.14, M⁺), 153(9.90), 149(15.26), 148.1(29.25), 147(100), 146(19.94), 145(16.27), 126.9(7.71), 104(15.58), 91.1(52.11), 90.1(10.48), 89.1(33.16), 77(22.98), 73(13.94), 45.1(93.94).

Acid 2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-2-hidroxiacetic (*rac*-13d)



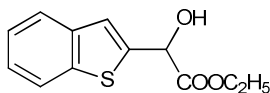
η : 95%; solid galben; pt: 108-109 °C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetona): δ = 5.67 (1H, s); 7.35-7.43 (2H, m); 7.72 (1H, s); 7.95 (1H, d, J = 6.0 Hz); 8.08 (1H, d, J = 9.0 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Acetona): δ = 70.3, 124.4, 124.8, 125.8, 126.3, 126.8, 136.4, 139.2, 142.3, 174.8; MS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$): 208.0(208.0); MS m/z (%) = 208(4.86, M^+), 193.1(59.14), 178(31.72), 163(38.52), 162(23.45), 161(54.35), 149(29.76), 148.1(34.48), 147(18.74), 135(15.69), 133(19.95), 126.9(17.43), 104(13.87), 89.1(60.51), 88.1(21.75), 58.1(20.78), 45.1(100).

2-(benzofuran-2-il)-2-hidroxiacetat de etil (*rac*-14a)



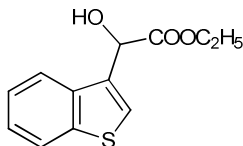
η : 64%; ulei galben; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.29 (3H, t, J = 7.1 Hz); 4.26-4.39 (2H, m); 5.30 (1H, s); 6.80 (1H, s); 7.23-7.35 (2H, m), 7.50 (1H, d, J = 8.3 Hz); 7.59 (1H, d, J = 7.5 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 13.9, 62.7, 67.3, 105.3, 111.4, 121.2, 122.9, 124.7, 127.7, 153.2, 154.9, 171.1; MS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$): 220.1(220.0); MS m/z (%) = 220.1(18.16, M^+), 148.1(10.05), 147.1(100), 118.1 (7.93), 92.1(5.65), 91.1(82.78), 90.1(8.87), 89.1(13.57), 65.1 (16.58).

2-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-hidroxiacetat de etil (*rac*-14b)



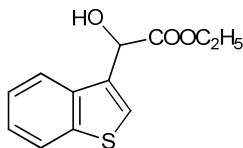
η : 42%; solid alb; pt: 133-134 °C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.30 (3H, t, J = 6.7 Hz); 4.24-4.36 (2H, m); 5.49 (1H, d, J = 5.2 Hz); 7.30-7.38 (3H, m); 7.73 (1H, d, J = 6.7 Hz); 7.81 (1H, d, J = 9.0 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 13.9, 62.7, 69.5, 121.9, 122.3, 123.6, 124.3, 124.4, 139.2, 139.6, 142.0, 172.1; MS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$): 236.1(236.1); MS m/z (%) = 236.1(21.27, M^+), 165(4.94), 164(9.21), 163(100), 162(3.71), 161(7.02), 136(6.67), 135(63.06), 134(27.23), 133(3.63), 91.1(46.49), 89(7.58), 77(3.14).

2-(benzofuran-3-il)-2-hidroxiacetat de etil (*rac*-14c)



η : 52%; ulei galben; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.25 (3H, t, J = 7.5 Hz); 4.17-4.37 (2H, m); 5.43 (1H, s); 7.24-7.36 (2H, m); 7.51 (1H, d, J = 7.5 Hz); 7.70 (1H, d, J = 5.2 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 13.9, 62.4, 65.9, 111.5, 118.5, 120.4, 122.7, 124.6, 125.4, 143.0, 155.5, 172.9; MS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$): 220.1(220.0); MS m/z (%) = 220.1(19.04, M^+), 148.1(6.94), 147.1(74.73), 145(6.91), 92.1(6.89), 91.1(100), 90.1(6.95), 89.1(8.98), 65.1(14.08).

2-(benzo[*b*]tiofen-3-il)-2-hidroxiacetat de etil (*rac*-4d)



η : 62%; semisolid; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.19 (3H, t, J = 7.1 Hz); 4.11-4.34 (2H, m); 5.53 (1H, s); 7.32-7.41 (2H, m); 7.48 (1H, s); 7.86 (1H, d, J = 7.5 Hz); 7.91 (1H, d, J = 6.7 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 13.9, 62.3, 68.6, 122.4, 122.7, 124.2, 124.5, 125.2, 133.0, 136.8, 140.6, 173.0; MS: M^+ determinat (M^+ calc. pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$): 236.1(236.0); MS m/z (%) = 236.1(34.21, M^+), 165(4.36), 164(12.62), 163(100), 162.1(4.91), 161(8.03), 136.1(7.26), 135(70.62), 134(26.65), 133(4.01), 102.1(4.33), 91.1(63.85), 90.1(4.4), 89.1(13.03).

Activitatea 1.2. Separarea enantiomerilor la scală analitică

Pentru analiza stereoselectivității proceselor enzimatică pe care acest proiect și le propune este necesară determinarea exceselor enantiomerice ale produșilor de reactive. Cea mai accesibilă și în același timp exactă și rapidă metoda este cromatografia de lichide pe coloane chirale (HPLC). În plus, dacă este posibilă separarea celor doi enantiomeri, atât ai substratului cât și ai produsului, în același timp, se poate determina și conversia procesului.

În cele ce urmeaza vor fi prezentate spre exemplificare condițiile de separare cromatigrafică ale substraturilor sintetizate în cadrul activității 1.1.

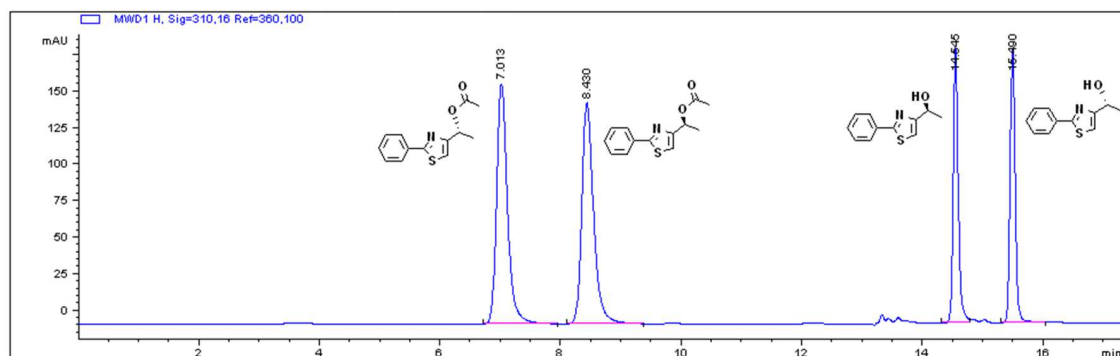
A. Analiza chirală a etanolilor prin HPLC

În cazul etandiolilor heterociclici separarea celor două perechi de enantiomeri, ai alcoolilor și ai esterilor, s-a realizat folosind o coloana Chiralpak IB column (4.6 x 250 mm) iar ca eluent un amestec *n*-hexan-2-propanol la un debit de 1 mL/min, în condițiile prezentate în Tabelul 1.

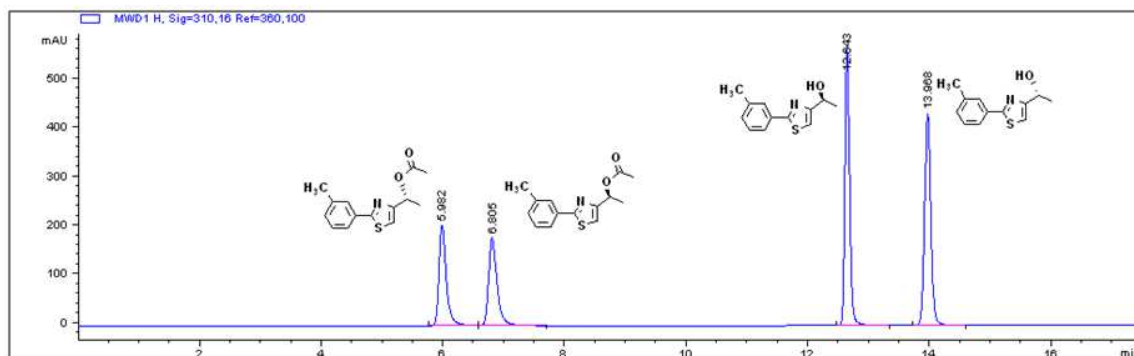
Tabelul 1. Timpii de retenție ai enantiomerilor alcoolilor și esterilor *rac*-**2,3a-d** pe coloana Chiralpak IB cu amestec amestec *n*-hexan-2-propanol ca eluent și gradient

Nr	Compus	t_R (min)	Compus	t_R (min)	Compus	t_R (min)	Compus	t_R (min)	Gradientul separării	
									Timp (min)	% 2-PrOH
1	<i>(R)</i> - 3a	7.0	<i>(S)</i> - 3a	8.4	<i>(S)</i> - 2a	14.5	<i>(R)</i> - 2a	15.5	0-9	1
									9.1-16	20
2	<i>(R)</i> - 3b	6.0	<i>(S)</i> - 3b	6.8	<i>(S)</i> - 2b	12.6	<i>(R)</i> - 2b	14.0	0-7.5	2
									7.6-18	20
3	<i>(R)</i> - 3c	6.4	<i>(S)</i> - 3c	7.4	<i>(S)</i> - 2c	13.2	<i>(R)</i> - 2c	14.0	0-7.5	2
									7.6-18	20
4	<i>(R)</i> - 3d	6.7	<i>(S)</i> - 3d	7.7	<i>(S)</i> - 2d	13.4	<i>(R)</i> - 2d	14.0	0-7.5	2
									7.6-18	15

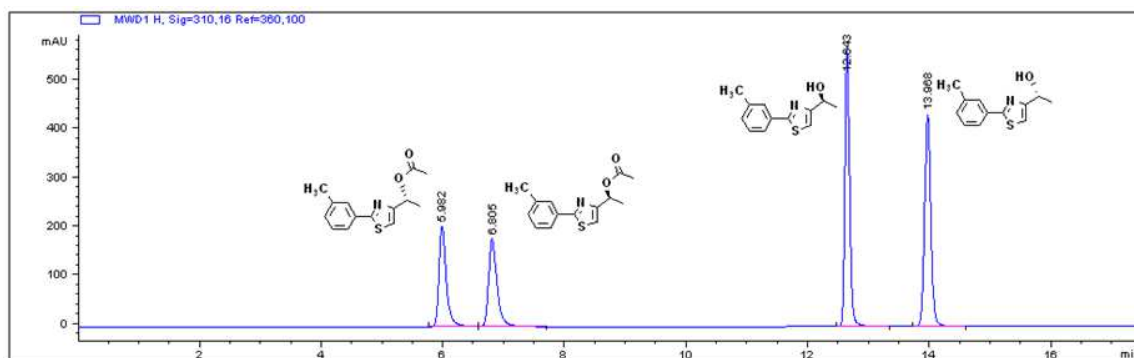
Separarea cromatografică a enantiomerilor *rac*-**2,3a** pe coloana Chiralpak IB column, în gradient, cu *n*-hexan: 2-propanol = 99:1 – 80:20 (v/v), conform programului de gradient din Tabelul 1, punctul 1.



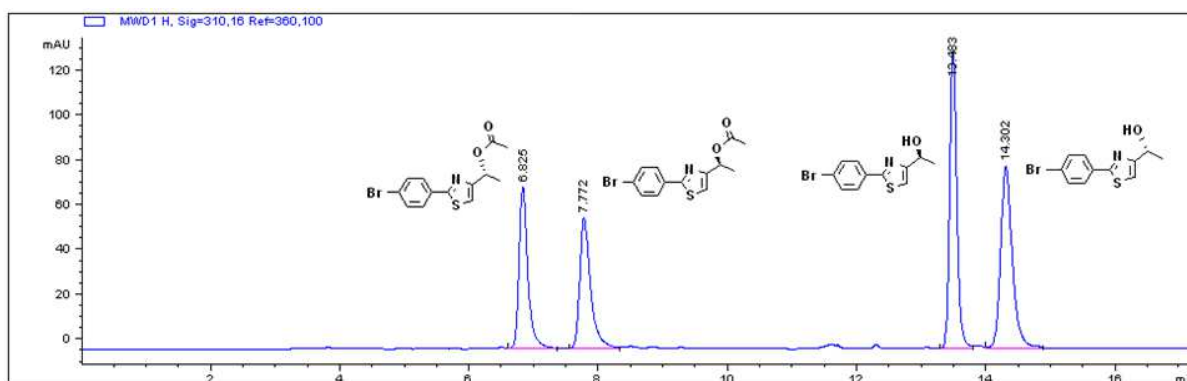
Separarea cromatografică a enantiomerilor *rac*-**2,3b** pe coloana Chiralpak IB column, în gradient, cu *n*-hexan: 2-propanol = 99:1 – 80:20 (v/v), conform programului de gradient din Tabelul 1, punctul 2.



Separarea cromatografică a enantiomerilor *rac*-**2,3c** pe coloana Chiralpak IB column, în gradient, cu *n*-hexan: 2-propanol = 99:1 – 80:20 (v/v), conform programului de gradient din Tabelul 1, punctul 3.



Separarea cromatografică a enantiomerilor *rac*-**2,3d** pe coloana Chiralpak IB column, în gradient, cu *n*-hexan: 2-propanol = 99:1 – 80:20 (v/v), conform programului de gradient din Tabelul 1, punctul 4.



B. Analiza cromatografică a hidroxiacizilor chirali

Pentru separarea α -hidroxiesterilor racemici *rac*-**14a** a fost necesară utilizarea unui tandem de două coloane chirale Chiralpak IC-IA (4.6×250 mm) cu un amestec de *n*-hexane și 2-propanol 90:10 (v/v) ca eluent; *rac*-**14b,d** au fost separati pe o coloana Chiralpak IC cu un amestec de *n*-

hexan și 2-propanol 95:5 (v/v) ca eluent, iar pentru *rac*-**14c** s-a utilizat tot un tandem de coloane Chiralpak IC-IB și *n*-hexan- 2-propanol 90:10 (v/v) ca eluent.

Activitatea 1.3. Studii preliminare privind imobilizarea enzimelor de interes

Datorită utilizării tot mai extinse a lipazelor în procese biocatalitice din chimia organică, există un interes considerabil pentru elaborarea unor metode eficiente de imobilizare în vederea creșterii stabilității enzimei, pentru a face posibilă reutilizarea și a îmbunătăți activitatea și selectivitatea ei.

Imobilizarea este în general necesară pentru a obține performanțe optime în medii neapoase. Există numeroase metode bine documentate pentru imobilizarea lipazelor, cum sunt legarea de suport, legarea covalentă și entraparea. În principiu, toate aceste metode urmează să fie studiate în cadrul proiectului, pentru a putea alege metoda cea mai eficientă în funcție de caracteristicile substratului și procesului

În cadrul acestei activități, au fost studiate mai multe lipaze de interes (lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AMANO AK), *Burkholderia cepacia* (AMANO PS) și *Candida antarctica* B (C-Lecta) realizându-se imobilizarea acestora prin metoda entrapării în sol-gel, metoda de entrapare combinată cu adsorbție și prin legare covalentă pe particule magnetice. Dintre posibili precursori silanici a fost selectat vinil-trimetoxisilanul (VTMOS), care dincolo de rolul activ în formarea matricii de sol-gel oferă și o serie de posibilități de post-reacție. Acest precursor s-a utilizat în amestecuri ternare cu fenil-trimetoxisilan (PhTMOS) și tetrametoxisilan (TMOS).

A. Imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel

Mod de lucru:

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/ ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), care a fost menținută la agitare (700 rpm) timp de 30 minute. Soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml supernatant de lipază, 200 μl soluție lichid ionic 100 μl soluție fluorură de sodiu 1 M și 200 μl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici la diferite rapoarte molare cu menținerea agitării până la gelificare.

Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu alcool izopropilic, apă distilată, din nou alcool izopropilic și n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 de ore.

Tabelul 2. Condiții de imobilizare ale preparatelor obținute prin entrapare în sol-gel.

Cod preparat enzimatic	Enzima	Silani precursori PhTMOs:VTMOs:TMOs (raport molar)	Cantitate de preparat obținut (mg)
AK1	Amano AK	1:1:1	850,6
AK2		1,6:0,4:1	598,4
AK3		0,4:1,6:1	511,4
PS1	Amano PS	1:1:1	564,2
PS2		1,6:0,4:1	602,2
PS3		0,4:1,6:1	502,7
CALB1	CAL-B	1:1:1	574,0
CALB2		1,6:0,4:1	604,0
CALB3		0,4:1,6:1	505,6

B. Imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Mod de lucru:

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/ ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), care a fost menținută la agitare (700 rpm) timp de 30 minute. Soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml supernatant de lipază, 200 μl soluție lichid ionic, 100 μl soluție fluorură de sodiu 1 M și 200 μl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici la diferite rapoarte molare cu menținerea agitării până la gelifiere, moment în care s-a introdus 0,5 g Celite 545.

Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 ore.

Tabelul 3. Condiții de imobilizare ale preparatelor obținute prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe 0,5g Celite 545.

Cod preparat enzimatic	Enzima	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	Cantitate de preparat obținut (mg)
AK4		1:1:1	1035,4
AK5	Amano AK	1,6:0,4:1	1108,7
AK6		0,4:1,6:1	974,4
PS4		1:1:1	1043
PS5	Amano PS	1,6:0,4:1	1080,3
PS6		0,4:1,6:1	865,9
CALB4		1:1:1	1026,5
CALB5	CAL-B	1,6:0,4:1	1037,8
CALB6		0,4:1,6:1	681,0

C. Imobilizarea lipazelor prin legare covalentă

S-a preparat 45 ml soluție de chitosan 1,5% în acid acetic 2% în care s-au introdus 20,28 g particule magnetice funcționalizate cu grupări amino terminale (raport molar 5:1). Omogenizarea s-a făcut într-o baie de ultrasonare timp de 1 oră. Macroparticulele au fost precipitate într-o soluție de NaOH 1M conținând alcool etilic 26% ^{iv}. După precipitare au fost spălate cu apă distilată. Ulterior macroparticulele au fost particularizate cu glutaraldehidă. Pentru imobilizare s-au folosit 5 ml soluție de lipază [48 mg x mL⁻¹] la 2 g de particule ude de chitosan, amestecarea s-a făcut cu 125 rpm timp de 4 h la 25 °C. Preparatul obținut a fost spălat de 5 ori cu o soluție de tampon fosfat 20 mM și uscat la 40°C sub vid timp de 60 de ore.

Tabelul 4. Condiții de imobilizare ale preparatelor obținute prin legare covalentă

Lipaza	Cantitate proteina supusa imobilizarii [mg]	Masa particule ude [g]	Masa particule uscate [g]
CALB7	240	2.28	0.134
CALB8	480	2.49	0.246
AK7	240	2.16	0.161
PS7	240	2.31	0.127

D. Reacții de transesterificare

Evaluarea activității de acilarea enantioselectivă a preparatelor enzimatiche imobilizate sau a lipazelor native, a excesului enantiomeric și a selectivității reacției s-a realizat în această etapă pe substraturi model de alcooli secundari (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 0,5 mmoli alcool secundar (2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol), 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 ml solvent organic și 15 μl n-decan sau n-dodecan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus 25 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție. Fiola de sticlă conținând amestecul de reacție a fost plasată într-o incintă termostată la 40°C și supusă agitării la 300 rotații/min. Reacția a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la 24 de ore de reacție 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} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) și randamentul de regăsire a activității enzimatiche η_{reg} (%) la 24 de ore de reacție. Pentru calculul randamentelor de regăsire ale activității enzimatiche după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleași condiții, în care s-a utilizat 5 mg lipază nativă.

Pe baza datelor din literatură^v, s-a presupus că lipazele Amano AK, Amano PS și CALB sunt (R)-specifice în reacția de acilare a alcoolilor secundari testați, deci produsul principal a fost considerat a fi (R)-esterul. Excesul enantiomeric al produsului (e.e._p) a fost calculat pe baza ariei picurilor enantiomerilor.

Raportul enantiomeric (E) a fost calculat în conformitate cu^{vi}, folosind relația:

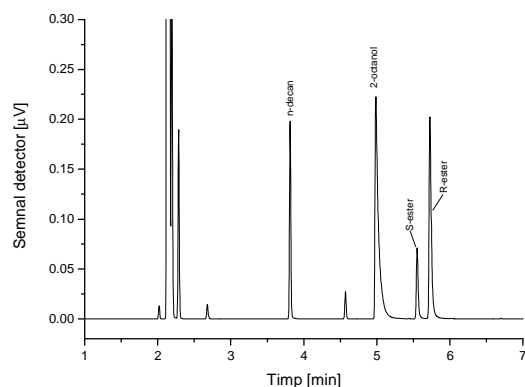
$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e.e._p)]}{\ln[1 - c(1 - e.e._p)]}$$

unde:

e.e._p = excesul enantiomeric al produsului

c = conversia alcoolului

Separarea (S) și (R) esterilor obținuți prin reacția de transesterificare a alcoolului secundar cu acetat de vinil s-a realizat prin cromatografie de gaze chirală, folosind o coloană Astec Chiraldex B-PM (30m x 0,25 mm), gaz purtător H₂ la un debit de 2 ml/min.



Separarea enantiomerilor acetatului de 2-octil prin cromatografie de gaze chirală

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

Rezultatele obținute prin testarea biocatalizatorilor în reacția de acilare a alcoolilor secundari studiați în mediu de *n*-hexan (după 24 de ore reacție) sunt prezentate în Tabelele 5-13.

Tabelul 5. Acilarea 2-hexanolului folosind lipază immobilizată prin metoda sol-gel

Cod preparat enzimatic	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	C (%)	A_{tr} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	32	1,334	-	74	9
AK1	1:1:1	5	0,041	23	74	7
AK2	1,6:0,4:1	14	0,114	46	86	15
AK3	0,4:1,6:1	11	0,093	32	88	17
PS _{nativă}	-	31	1,227	-	80	13
PS1	1:1:1	29	0,236	502	86	19
PS2	1,6:0,4:1	38	0,306	695	84	19
PS3	0,4:1,6:1	17	0,136	258	86	16
CALB _{nativă}	-	23	0,900	-	93	36
CALB1	1:1:1	47	0,379	313	97	183
CALB2	1,6:0,4:1	46	0,381	331	97	170
CALB3	0,4:1,6:1	47	0,366	266	96	134

Tabelul 6. Acilarea 2-heptanolului folosind lipază imobilizată prin metoda sol-gel

Cod preparat enzimatic	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	C (%)	A _{tr} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	34	1,416	-	70	8
AK1	1:1:1	21	0,172	92	78	10
AK2	1,6:0,4:1	32	0,251	95	78	12
AK3	0,4:1,6:1	7	0,061	20	72	7
PS _{nativă}	-	16	0,630	-	86	16
PS1	1:1:1	27	0,221	916	86	18
PS2	1,6:0,4:1	43	0,344	1522	84	22
PS3	0,4:1,6:1	14	0,119	440	86	15

Tabelul 7. Acilarea 2-octanolului folosind lipază imobilizată prin metoda sol-gel

Cod preparat enzimatic	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	C (%)	A _{tr} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	45	1,853	-	50	4
AK1	1:1:1	30	0,249	102	56	4
AK2	1,6:0,4:1	39	0,342	99	56	5
AK3	0,4:1,6:1	12	0,105	26	46	3
PS _{nativă}	-	19	0,798	-	74	8
PS1	1:1:1	41	0,338	1106	76	12
PS2	1,6:0,4:1	54	0,457	1597	70	14
PS3	0,4:1,6:1	22	0,185	540	74	8
CALB _{nativă}	-	20	0,842	-	89	21
CALB1	1:1:1	50	0,426	376	95	146
CALB2	1,6:0,4:1	51	0,429	398	95	201
CALB3	0,4:1,6:1	51	0,426	331	95	201

- Acilarea alcoolilor secundari catalizată de lipaze immobilizate prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Tabelul 8. Acilarea 2-hexanolului folosind lipază immobilizată prin metoda combinată

Cod preparat enzimatic	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	C (%)	A _{tr} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	32	1,334	-	74	9
AK4	1:1:1	24	0,196	135	86	17
AK5	1,6:0,4:1	23	0,190	141	86	17
AK6	0,4:1,6:1	11	0,085	55	98	111
PS _{nativă}	-	31	1,227	-	80	13
PS4	1:1:1	31	0,196	744	86	18
PS5	1,6:0,4:1	30	0,190	788	86	18
PS6	0,4:1,6:1	26	0,085	534	86	17
CALB _{nativă}	-	23	0,900	-	93	36
CALB4	1:1:1	37	1,299	961	99	360
CALB5	1,6:0,4:1	43	1,477	1104	99	449
CALB6	0,4:1,6:1	32	1,108	544	99	316

Tabelul 9. Acilarea 2-heptanolului folosind lipază immobilizată prin metoda combinată

Cod preparat enzimatic	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	C (%)	A _{tr} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	34	1,416	-	70	8
AK4	1:1:1	29	0,238	155	76	10
AK5	1,6:0,4:1	29	0,233	162	78	11
AK6	0,4:1,6:1	7	0,058	36	76	8
PS _{nativă}	-	16	0,630	-	86	16

PS4	1:1:1	24	0,220	1104	86	18
PS5	1,6:0,4:1	33	0,256	1331	86	19
PS6	0,4:1,6:1	14	0,128	533	88	18
CALB _{nativă}	-	7	1,247	-	98	106
CALB4	1:1:1	41	1,241	878	98	183
CALB5	1,6:0,4:1	38	1,279	915	98	178
CALB6	0,4:1,6:1	51	1,534	720	96	134

Tabelul 10. Acilarea 2-octanolului folosind lipază imobilizată prin metoda combinată

Cod preparat enzimatic	Silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS (raport molar)	C (%)	A _{tr} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	45	1,853	-	50	4
AK4	1:1:1	43	0,353	176	56	5
AK5	1,6:0,4:1	36	0,304	162	54	4
AK6	0,4:1,6:1	11	0,094	44	42	3
PS _{nativă}	-	19	0,798	-	74	8
PS4	1:1:1	37	0,327	1641	74	10
PS5	1,6:0,4:1	40	0,359	1888	72	10
PS6	0,4:1,6:1	25	0,242	1008	74	9
CALB _{nativă}	-	20	0,842	-	89	21
CALB4	1:1:1	37	1,216	780	95	68
CALB5	1,6:0,4:1	33	1,098	712	95	62
CALB6	0,4:1,6:1	33	1,116	475	95	62

- **Acilarea alcoolilor secundari catalizată de lipaze immobilizate prin legare covalentă**

Tabelul 11. Acilarea 2-hexanolului folosind lipază immobilizată prin legare covalentă pe particule magnetice

Cod preparat enzimatic	C (%)	A_{tr} (μmol·h⁻¹·mg⁻¹)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	32	1,334	-	74	9
AK7	17	0,149	8	84	12
PS _{nativă}	31	1,227	-	80	13
PS7	4	0,034	1	74	7
CALB _{nativă}	23	0,900	-	93	36
CALB7	23	0,189	12	98	99
CALB8	17	0,136	8	98	99

Tabelul 12. Acilarea 2-heptanolului folosind lipază immobilizată prin legare covalentă pe particule magnetice

Cod preparat enzimatic	C (%)	A_{tr} (μmol·h⁻¹·mg⁻¹)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	34	1,416	-	70	80
AK7	8	0,064	3	82	10
PS _{nativă}	16	0,630	-	86	16
PS7	5	0,046	4	78	8
CALB _{nativă}	7	1,247	-	98	106
CALB7	8	0,067	3	96	49
CALB8	9	0,076	3	96	49

Tabelul 13. Acilarea 2-octanolului folosind lipază imobilizată prin legare covalentă pe particule magnetice

Cod preparat enzimatic	C (%)	A_{tr} (μmol·h⁻¹·mg⁻¹)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
AK_{nativă}	45	1,853	-	50	4
AK7	11	0,088	3	66	5
PS_{nativă}	19	0,798	-	74	8
PS7	4	0,033	2	78	8
CALB_{nativă}	20	0,842	-	89	21
CALB7	5	0,040	3	98	99
CALB8	5	0,042	3	98	99

Există diferențe evidente între activitatea și selectivitatea enzimelor imobilizate în funcție de proveniența lor, metoda și condițiile de imobilizare, structura substratului, ceea ce confirmă faptul că s-a elaborat o metodologie flexibilă care va permite obținerea unor preparate particularizate în funcție de substratul investigat.

Activitatea 1.4. Diseminarea rezultatelor prin participare la o conferință națională

În conformitate cu planul de activități al proiectului, s-a realizat diseminarea prin participare cu două lucrări la cea de-a XXXIII-a Conferință Națională de Chimie, cea mai importantă manifestare de acest gen din România, organizată de Societatea de Chimie din România în perioada 1-3 octombrie 2014 la Călimănești-Căciulata. Rezumatele lucrărilor au fost publicate în volumul de rezumate al conferinței:

1. Francisc Peter, Cristina Paul, Emese Biró, Anamaria Todea, Enzyme immobilization, a possible way towards industrial biocatalysts, *The XXXIII-rd Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata 1-3 October 2014* (conferință în secțiunea I) .
2. Cristina Paul, Paula Borza, Francisc Peter, Kinetic resolution of secondary alcohols by a nanoscale biocatalyst system using *Pseudomonas fluorescens* lipase, *The XXXIII-rd Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata 1-3 October 2014* (poster).

În afară de această manifestare din țară, s-a participat cu două lucrări sub formă de poster la cea mai importantă conferință de biocataliză organizată în anul 2014, Biocat 2014 din Hamburg, aflată la cea de-a 7-a ediție. Rezumatele lucrărilor au fost publicate în volumul de rezumate al conferinței.

1. Cristina Paul, Paula Borza, Francisc Peter, Vinyl silane precursors system for combined sol-gel entrapment and adsorption of *Candida antarctica* B lipase, *7th International Congress on Biocatalysis*, Hamburg 31 August - 4 September 2014.

2. Adinela Cimporescu, Anamaria Todea, Francisc Peter, Stereoselective acylation of metoprolol catalyzed by lipases, *7th International Congress on Biocatalysis*, Hamburg 31 August - 4 September 2014.

Referințe bibliografice

ⁱ Hapau D., Brem J., Moisa M., Tosa M.-I., Irimie F.D., Zaharia V., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2013, 94, 88–94

ⁱⁱ Naghi M.A., Bencze L.Cs., Brem J., Paizs Cs., Irimie F.D., Tosa M.I., *Tetrahedron: Asymmetry* 2012, 23, 181-187

ⁱⁱⁱ Bencze, L. C.; Paizs, C.; Tosa, M. I.; Vass, E.; Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry* 2010, 21, 443-450.

^{iv} Biró E., Németh Á. Sz., Sisak C., Feczko T., Gyenis J., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2008, 70, 1240-1246.

^v Hasan F., Shah A.A., Hameed A., *Enzyme Microb Tech*, 2006, 39 (2), 235-251.

^{vi} Haring D., Schreier P., *Curr. Opin. Chem. Biol*, 1999, 3, 35-38l.