

# **UTILIZAREA LIPAZELOR IMOBILIZATE PENTRU SINTEZA ESTERILOR DE OLIGO- ȘI POLIZAHARIDE**

Teză destinată obținerii  
titlului științific de doctor inginer  
la  
Universitatea "Politehnica" din Timișoara  
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ  
de către

**Ing. Alina Ramona Croitoru**

Conducător științific: prof. univ. dr. ing. Corneliu Davidescu  
Referenți științifici: prof. univ. dr. ing. Carmen Boeriu  
prof. univ. dr. ing. Eugen Șișu  
prof. univ. dr. ing. Francisc Peter

Data susținerii tezei: 27.02.2012

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- |                        |   |
|------------------------|---|
| 1. Automatică          | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie              | 8. Inginerie Industrială                    |
| 3. Energetică          | 9. Inginerie Mecanică                       |
| 4. Ingineria Chimică   | 10. Știința Calculatoarelor                 |
| 5. Inginerie Civilă    | 11. Știința și Ingineria Materialelor       |
| 6. Inginerie Electrică |   |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2006

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,  
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221  
e-mail: editura@edipol.upt.ro

## Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe baza cercetărilor efectuate în laboratorul de biocataliză din cadrul departamentului de Chimie Aplicată și Ingineria Compușilor Organici și Naturali, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității "Politehnica" din Timișoara și pe baza cercetărilor efectuate la Wageningen University and Research Center, departamentul Food and Biobased Products.

Doresc să adresez mulțumiri conducătorului științific, domnului Prof. dr. ing. Corneliu Mircea Davidescu, pentru tot sprijinul acordat pe parcursul întregii perioade de cercetare și elaborare a tezei de doctorat.

Aș dori să multumesc și să-mi exprim întreaga recunoștință doamnei Prof. dr. ing. Carmen Boeriu, pentru îndrumarea științifică și sprijinul moral oferite pe toată perioada stagiului de doctorat, de la care am învățat că încrederea în forțele proprii este esențială pentru formarea mea ca cercetător, care mi-a arătat cum să mă confrunt cu diferitele rezultate obținute pe parcursul cercetărilor experimentale și care mi-a transmis optimismul și pasiunea pentru cercetare.

Sincere mulțumiri domnului Prof. dr. ing. Francisc Peter pentru generozitatea, răbdarea și amabilitatea cu care m-a inițiat în munca de cercetare, pentru sprijinul neconținut, sugestiile și îndrumarea în organizarea și dezvoltarea experimentelor precum și în structurarea acestei teze de doctorat.

Îmi exprim întreaga considerație față de distinșii membri ai comisiei de doctorat, domnului președinte al comisiei Prof. dr. ing. Lucian Mircea Rusnac, decan al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, doamnei Prof. dr. ing. Carmen Boeriu de la Universitatea din Wageningen, domnului Prof. dr. ing. Eugen Șișu de la Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" din Timișoara și domnului Prof. dr. ing. Francisc Peter de la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara și le mulțumesc pentru că au acceptat propunerea de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru răbdarea cu care au analizat lucrarea de față și pentru sugestiile formulate.

*I would like to express my thanks to the research group from Wageningen University and Research Center, especially to Guus Frissen for all his support with the NMR analysis, to Ben van den Broek who helped me with the MALDI TOF MS experiments, and to Marinella van Leeuwen for her advice and assistance whenever I needed it.*

Doresc să multumesc de asemenea doamnei Asist. dr. ing. Cristina Paul pentru tot sprijinul acordat de-a lungul elaborării tezei de doctorat. Mulțumesc domnului Ing. Beniamin Pinte pentru sfaturile utile și competente pe care nu a ezitat niciodată să mi le ofere. Mulțumesc colegelor mele din catedra de biocataliză, Firuța, Miha, Anca, Ana și Andrada, pentru sprijinul moral și înțelegerea de care au dat dovadă în acești ani. Mulțumesc Laurei pentru toate zilele frumoase petrecute la Wageningen pe perioada stagiului de doctorat. Mulțumesc Liviei, care mi-a fost alături încă din anul I de facultate, colegă și prietenă deopotrivă.

Finalizarea tezei de doctorat nu ar fi fost posibilă fără sprijinul, înțelegerea, încrederea, încurajările permanente și mai ales dragostea mamei mele și prietenului meu cel mai bun, Doru, cărora le dedic această lucrare și le mulțumesc.

Timișoara, februarie 2012

Alina Ramona Croitoru

Croitoru, Alina Ramona

**Utilizarea lipazelor imobilizate pentru sinteza esterilor de oligo- și polizaharide**

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 59, Editura Politehnica, 2012, 196 pagini, 158 figuri, 20 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-454-3

Cuvinte cheie: carbohidrați, lipaze, entrapare în sol-gel, acilare, acetalizare

Rezumat:

Esterii zaharurilor și derivaților acestora sunt tot mai mult utilizați ca biosurfactanți în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. De asemenea, anumiți esteri aromatici ai zaharurilor au demonstrat activitate biologică ceea ce a devenit un subiect foarte interesant pentru diferite procese biologice. Obținerea esterilor de zaharuri reprezintă un obiectiv științific major în domeniul biocatalizei, deoarece regioselectivitatea enzimelor permite obținerea unor compuși greu de sintetizat pe căile chimice obișnuite. Utilizarea lipazelor ca și biocatalizatori pentru producerea la scară industrială a esterilor de zaharuri și derivaților acestora, este de mare interes, datorită specificității de substrat, regioselectivității, eficienței catalitice în condiții blânde de reacție, cantității reduse de deșeuri și consumului redus de energie.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit studiul specificității enzimei, selecția biocatalizatorului pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor, imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol – gel și utilizarea acestora pentru sinteza esterilor de zaharuri și derivaților de zaharuri, optimizarea parametrilor de reacție și determinarea parametrilor cinetici pentru sinteza esterilor aromatici ai alditolilor, sinteza chemo-enzimatică a esterilor aromatici ai zaharurilor și caracterizarea intermediarilor și produșilor finali prin spectrometrie de masă, spectroscopie FT – IR și spectroscopie RMN.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU/6/1.5/S/13, ID6998, cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013.

Mulțumiri deosebite Universității din Wageningen (Wageningen UR Food & Biobased Research), pentru acordarea dreptului de utilizare a echipamentelor și materialelor necesare realizării experimentelor care au dus la finalizarea tezei de doctorat.



# CUPRINS

	Introducere	
	Abrevieri	
<b>1.</b>	<b>STUDIU DE LITERATURĂ</b>	<b>11</b>
1.1.	Introducere. Importanța temei	11
1.2.	Transformări chimice și enzimatică ale unor carbohidrați	13
1.2.1.	Glucoza	13
1.2.2.	Zaharoza	14
1.2.3.	Lactoza	19
1.2.4.	Inulina	22
1.2.5.	Maltodextrinele	24
1.3.	Derivați ai zaharurilor și modificarea lor prin biocataliză	26
1.3.1.	Alcooli derivați de la zaharuri (alditoli)	27
1.3.1.1.	Xilitolul	29
1.3.1.2.	Sorbitolul	30
1.3.1.3.	Manitolul	32
1.3.1.4.	Lactitolul	33
1.3.1.5.	Maltitolul	35
1.3.2.	Alchilglucozidele	36
1.4.	Utilizarea lipazelor în chimia carbohidraților	38
1.5.	Esterii aromatici ai zaharurilor și derivaților acestora	43
1.6.	Imobilizarea enzimelor prin metoda de entrapare în sol – gel	46
1.7.	Surfactanți pe bază de zaharuri	55
1.7.1.	Surfactanți pe bază de sorbitan	56
1.7.2.	Surfactanți pe bază de zaharoză	57
1.7.3.	Surfactanți pe bază de glucoză	59
1.7.4.	Surfactanți pe bază de inulină	61
1.8.	Concluzii	61
<b>2.</b>	<b>CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	<b>63</b>
2.1.	Introducere	63
2.2.	Selecția biocatalizatorului	64
2.2.1.	Activitatea de transesterificare a lipazelor native	64
2.2.2.	Specificitatea lipazelor native pentru compușii aromatici	67
2.2.3.	Specificitatea lipazelor native pentru hidrații de carbon	71
2.2.3.1.	Studiul acilării carbohidraților cu laurat de vinil	72
2.2.3.2.	Studiul acilării carbohidraților cu compuși aromatici	74
2.2.4.	Concluzii	77
2.3.	Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel și testarea preparatelor imobilizate ca biocatalizatori pentru reacții de acilare	78
2.3.1.	Studiul eficienței biocatalitice a lipazei imobilizate prin	78

2.3.2.	entrapare în sol-gel în reacții de esterificare Studiul eficienței biocatalitice a lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel în reacții de transesterificare	80
2.3.3.	Concluzii	84
2.4.	Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor	84
2.4.1.	Studiul acilării alditolilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil	85
2.4.2.	Studiul acilării alditolilor cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	88
2.4.2.1.	Influența mediului de reacție	89
2.4.2.2.	Influența temperaturii	91
2.4.2.3.	Influența raportului molar alditol/acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	93
2.4.2.4.	Influența raportului enzimă/substrat	94
2.4.2.5.	Influența cantității de site moleculare	95
2.4.2.6.	Studii cinetice	96
2.4.3.	Caracterizarea esterilor aromatici ai alditolilor	101
2.4.4.	Concluzii	110
2.5.	Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri	111
2.5.1.	Sinteza esterilor aromatici ai alchilglucozidelor	111
2.5.2.	Caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor	112
2.5.3.	Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai acetalilor de zaharuri	119
2.5.3.1.	Sinteza și caracterizarea 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză	119
2.5.3.2.	Sinteza și caracterizarea 3-(4-hidroxifenil)-propionatului de mono-O-izopropiliden zaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 2,1',4,6-di-O-izopropilidenzaharoză	123
2.5.3.3.	Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai inulinei	127
2.5.3.4.	Sinteza și caracterizarea 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei și 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei	130
2.5.4.	Concluzii	134
<b>3.</b>	<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	<b>135</b>
3.1.	Materiale	135
3.2.	Aparatură	136
3.3.	Rețete de lucru	136
3.3.1.	Reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil	136
3.3.2.	Reacția de acilare a 1-octanolului cu compuși aromatici	137
3.3.3.	Reacția de acilare a zaharurilor cu lauratul de vinil	138
3.3.4.	Reacția de acilare a zaharurilor cu compuși aromatici	138
3.3.5.	Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel	139
3.3.6.	Reacția de transesterificare a alditolilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil	139
3.3.7.	Reacția de esterificare a alditolilor cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	140
3.3.8.	Reacția de acetalizare a glucozei	140

3.3.9.	Reacția de acetalizare a zaharozei	141
3.3.10.	Reacția de acetalizare a lactozei	141
3.3.11.	Reacția de acetalizare a inulinei	141
3.3.12.	Reacția de esterificare a alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	142
3.4.	Metode de analiză	142
3.4.1.	Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze	142
3.4.2.	Analiza cantitativă prin cromatografie de lichide	143
3.4.3.	Determinarea proteinelor prin metoda Bradford	145
3.4.4.	Cromatografia în strat subțire	148
3.4.5.	Cromatografia pe coloană cu silica gel	148
3.4.6.	Analiza FTIR (spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier)	148
3.4.7.	Spectrometria de masă	148
3.4.8.	Analiza RMN (spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară)	149
<b>4.</b>	<b>CONCLUZII FINALE</b>	<b>150</b>
	<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>153</b>
	<b>ANEXE</b>	<b>162</b>
	<b>LISTA DE LUCRĂRI</b>	<b>194</b>

## INTRODUCERE

Esterii zaharurilor și derivaților acestora sunt tot mai mult utilizați ca biosurfactanți în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. De asemenea, anumiți esteri aromatici ai zaharurilor au demonstrat activitate biologică ceea ce a devenit un subiect foarte interesant pentru diferite procese biologice. Totuși, potențialul acestor compuși nu a fost pe deplin explorat deoarece utilizarea esterilor naturali ai acizilor aromatici cu polioli este restricționată de disponibilitatea lor redusă, drept consecință a dificultății de izolare a acestora din plante și complexității sintezei lor cât și a formării produșilor secundari.

Sinteza esterilor de zaharuri poate fi realizată în principal pe cale chimică și pe cale enzimatică. Sinteza chimică tradițională a esterilor de zaharuri presupune utilizarea unor procese care au loc la temperaturi și presiuni ridicate, care utilizează catalizatori chimici corozivi, solvenți organici toxici care nu pot fi îndepărtați complet rezultând necesitatea unor etape suplimentare de purificare și care au ca rezultat amestecuri complexe de produși și cantități mari de deșeuri. Biocataliza a devenit o metodă tot mai utilă pentru producerea unor compuși cu valoare ridicată. Principalele avantaje ale metodelor enzimatică în comparație cu sinteza chimică includ transformări regio-, chemo- și stereoselective, în condiții blânde de reacție, utilizarea de catalizatori și solvenți netoxici și consum de energie redus.

S-a arătat că lipazele sunt biocatalizatori foarte utili și importanți pentru chimia organică de sinteză, în sisteme neapoase. Potențialul sintetic al lipazelor este foarte vast deoarece acestea, în comparație cu majoritatea enzimelor, pot să accepte o gamă largă de substraturi, sunt stabile în solvenți organici neapoși și pot fi aplicate în reacții de hidroliză sau în sinteza esterilor, prin alegerea unui solvent adecvat. În plus, lipazele pot transforma o serie largă de substraturi diferite de trigliceride, cum ar fi esteri alifatici, aliciclici, biciclici și aromatici chiar și cu esteri pe bază de amestecuri de compuși organometalici. Utilizarea eficientă a diferitelor lipaze pentru sinteza esterilor alifatici de zaharuri și a derivaților acestora este descrisă extensiv în literatură. Oricum, costul produsului final sintetizat pe cale enzimatică este mai ridicat comparativ cu metodele care utilizează catalizatori chimici obișnuiți.

O alternativă o reprezintă imobilizarea enzimelor în scopul creșterii stabilității operaționale, reutilizării biocatalizatorului pe termen lung, ceea ce face ca procesul biocatalitic să devină eficient din punct de vedere economic și competitiv cu procesele convenționale. Imobilizarea prin metoda de entrapare în sol-gel s-a dovedit a fi o tehnică ideală pentru o varietate largă de biomolecule. Principalul avantaj al utilizării silicagelurilor pentru imobilizarea enzimelor constă în faptul că pot fi ușor adaptate la o mare varietate de texturi poroase, rețele, funcțiuni de suprafață și condiții de reacție. Mai mult, pH-ul, timpul de gelificare sau hidrofobicitatea matricei pot fi particularizate pentru o anumită enzimă sau aplicație.

Randamentul de obținere a esterilor de zaharuri depinde mult de tipul de enzimă și de condițiile de reacție, ceea ce face ca optimizarea parametrilor, în special a biocatalizatorului și solventului, să fie esențială pentru eficiența procesului. De asemenea, solubilitatea redusă a zaharurilor în solvenții organici nepolari, în care lipazele își mențin activitatea catalitică, face dificilă sinteza esterilor de di- și oligozaharide. O alternativă atractivă în acest sens o reprezintă metodele chemo-enzimatică, care implică etape de protejare a grupărilor hidroxil secundare cu

grupări hidrofobe, ceea ce duce la creșterea solubilității zaharurilor, urmate de esterificarea enzimatică a grupărilor hidroxil primare, iar apoi deprotejarea prin hidroliză în mediu acid.

**Obiectivele** tezei de doctorat au fost:

- Selecția biocatalizatorului pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri
- Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel
- Testarea preparatelor imobilizate în reacții de esterificare și transesterificare
- Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai zaharurilor
- Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai derivaților de zaharuri (alditoli, alchilglucozide, acetali de zaharuri)
- Optimizarea parametrilor de reacție, studii cinetice
- Caracterizarea intermediarilor și produșilor finali prin spectrometrie de masă, spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

- **Studiu de literatură**, în care este detaliat stadiul actual al cunoașterii în domeniul modificării chimice și enzimatică a carbohidraților și derivaților acestora, importanța temei, noțiuni generale despre chimia carbohidraților și derivaților acestora, aplicațiile lipazelor în chimia carbohidraților precum și aplicațiile industriale ale surfactanților pe bază de zaharuri.
- **Contribuții originale**, în care sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale cuprinzând selecția biocatalizatorului, imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel și testarea preparatelor imobilizate în reacții de acilare, sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor, derivaților alchilați și acetalilor de zaharuri și caracterizarea intermediarilor și produșilor finali de reacție prin metodele fizico-chimice specifice substanțelor organice.
- **Partea experimentală**, în care sunt descrise procedurile experimentale utilizate în reacțiile de acilare și derivatizare ale zaharurilor studiate, la imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel precum și metodele de analiză folosite.
- **Concluzii finale** rezultate în urma studiilor experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU/6/1.5/S/13, ID6998, cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013.

Mulțumiri deosebite Universității din Wageningen (Wageningen UR Food & Biobased Research), pentru acordarea dreptului de utilizare a echipamentelor și materialelor necesare realizării experimentelor care au dus la finalizarea tezei de doctorat.

## ABREVIERI

3-NH <sub>2</sub> PrTMOS	3-aminopropil-trimetoxisilan
BmimBF <sub>4</sub>	tetrafluoroborat de butil-metil-imidazoliu
BmimNTf <sub>2</sub>	bis(trifluorometil-sulfonil)imida de butil-metil-imidazoliu
BmimPF <sub>6</sub>	hexafluorofosfat de butil-metil-imidazoliu
CalB	lipaza din <i>Candida antarctica</i> B
DMeDMOS	dimetildimetoxisilan
DMSO	dimetilsufoxid
EmimBF <sub>4</sub>	tetrafluoroborat de etil-metil-imidazoliu
EmimCOOCF <sub>3</sub>	trifluoracetat de etil-metil-imidazoliu
EmimCOOCH <sub>3</sub>	acetat de etil-metil-imidazoliu
HmimBF <sub>4</sub>	tetrafluoroborat de hexil-metil-imidazoliu
HPPA	acid 3,4-hidroxifenil propionic
HPPME	3,4-hidroxifenil propionatul de metil
iBuTMOS	<i>i</i> -butiltrimetoxisilan
$k_{cat}$	constanta catalitică
$k_{cat}/K_M$	eficiența catalitică a biocatalizatorului
$K_M$	constanta Michaelis-Menten
Lipozyme TL IM	lipaza din <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizată comercial
MeTMOS	metiltrimetoxisilan
Novozyme 435	lipaza din <i>Candida antarctica</i> B imobilizată comercial
OctTMOS	octiltrimetoxisilan
OmimBF <sub>4</sub>	tetrafluoroborat de octil-metil-imidazoliu
OmimPF <sub>6</sub>	hexafluorofosfat de octil-metil-imidazoliu
PEG	polietilenglicol
PhMeDMOS	fenil-metil-dimetoxisilan
PhTMOS	feniltrimetoxisilan
PmimBF <sub>4</sub>	tetrafluoroborat de propil-metil-imidazoliu
PrTMOS	propiltrimetoxisilan
TMOS	tetrametoxisilan
$V_{max}$	viteza maximă a reacției enzimaticе
VMOS	viniltrimetoxisilan

# 1. STUDIU DE LITERATURĂ

## 1.1. Introducere. Importanța temei

Esterii de oligo- și polizaharide (esteri de polizaharide cu grupări alchil sau alchil-aril) formează o clasă de polimeri cu proprietăți excepționale. Aceștia funcționează ca surfactanți polimerici păstrând majoritatea proprietăților materialelor polimerice inițiale și anume proprietatea de a forma emulsii, geluri, filme, combinată cu solubilitatea parțială în apă sau permeabilitatea. Proprietățile lor funcționale pot fi modificate prin ajustarea raportului dintre partea hidrofilă (carbohidratul polimeric sau oligomeric) și partea hidrofobă (cantitatea și lungimea catenei restului alchil). Datorită proprietăților unice, esterii amfilici de oligo- și polizaharide pot avea aplicații multiple:

- ca surfactanți neionici, atât în industria alimentară cât și în alte industrii.
- ca și componente structurale în produsele alimentare datorită influenței lor asupra texturii alimentelor și caracteristicilor bioactive și de aromatizare.
- pentru creșterea solubilității medicamentelor insolubile sau greu solubile și ca purtători biocompatibili pentru preparate de proteine și peptide.
- pentru transportul și eliberarea controlată a agrochimicelor (fungicide și insecticide), deoarece datorită caracterului lipofil îmbunătățesc aderența acestora pe suprafața hidrofobă a frunzelor plantei și scad lavabilitatea.

Modificarea regioselectivă a carbohidraților s-a dovedit a fi o mare provocare datorită prezenței multiplelor grupări hidroxil din unitățile de zahăr. Sinteza esterilor de zaharuri poate fi realizată în principal pe cale chimică și pe cale enzimatică.

În prezent, aceste materiale se obțin în principal prin metode chimice utilizând solvenți toxici și catalizatori organici și anorganici care lasă urme reziduale în produsul final. Mai mult, metodele sintetice chimice nu sunt selective și au ca rezultat amestecuri de produși de compoziție variabilă, structuri și proprietăți necontrolabile. În cele mai multe cazuri, metodele chimice convenționale necesită etape dificile și costisitoare de purificare pentru eliminarea produșilor secundari și reziduurilor toxice și de asemenea produc cantități mari de deșeuri și săruri de la etapele de neutralizare și spălare. Datorită condițiilor drastice de reacție necesare (temperatură, catalizator bazic), degradarea parțială a catenei polimerice nu poate fi evitată [1 – 3].

Procesele enzimatice oferă o metodă alternativă atractivă pentru sinteza esterilor de zaharuri [4]. În comparație cu sinteza chimică clasică, sinteza enzimatică prezintă avantajele sintezei într-o singură etapă, fără a recurge la etape suplimentare de protecție și deprotecție a polioliilor și condițiile de reacție moderate. Procesele selective catalizate de enzime pot fi realizate în condiții blânde de temperatură și presiune, evitând astfel degradarea polimerului. Utilizarea enzimelor pentru modificarea polizaharidelor are avantajul specificității și regioselectivității de reacție ridicată, care va genera produși cu structură și funcționalitate controlată. Deoarece formarea legăturii esterice este favorizată termodinamic într-un mediu cu conținut scăzut de apă, metodele enzimatice alternative trebuie să implice solvenți organici ca mediu de reacție [1, 5]. Diversitatea și complexitatea moleculelor organice în natură reflectă puterea remarcabilă a catalizei enzimatice. Accelerarea

fenomenală a vitezei de reacție, împreună cu selectivitatea unică și condițiile blânde de reacție oferite de enzime, face ca acestea să fie foarte atractive ca și catalizatori pentru sintezele organice. În plus, tehnicile de producție îmbunătățite reduc prețul enzimelor și astfel crește disponibilitatea lor la scară largă. Multe aplicații practice ale enzimelor au fost dezvoltate nu numai pentru cercetarea academică dar și pentru fabricarea la scară largă a produselor farmaceutice și produselor chimice. Chiar dacă proprietățile enzimelor sunt bine documentate, potențialul acestora este departe de a fi complet explorat. Un motiv pentru utilizarea limitată a enzimelor este opinia greșită a multor chimiști organicieni că dezvoltarea unei noi reacții biocatalitice necesită dezvoltarea laborioasă a unei noi enzime specifice, care să catalizeze doar reacția dată. S-a descoperit că multe enzime catalizează o multitudine de reacții, care pot fi foarte diferite de reacția cu care enzimele respective sunt asociate în natură. Mai mult, progrese recente au făcut posibilă chiar prezicerea specificității unei enzime pe baza structurii terțiare, permițând astfel utilizarea rațională a acestora.

Printre enzimele utilizate în sinteza organică, lipazele s-au dovedit a fi cele mai versatile. Deoarece aceste enzime sunt concepute în natură pentru a opera la interfața ulei-apă, ele sunt, în general, compatibile cu solvenții organici. Este bine cunoscut faptul că, deși lipazele, esterazele și unele proteaze catalizează în mod normal reacția de hidroliză a esterilor, în anumite condiții pot cataliza și reacțiile inverse hidrolizei. Marele avantaj al lipazelor față de celelalte două clase de enzime îl reprezintă o combinație între domeniul larg de substraturi pe care acestea le acceptă, regio- și enantioselectivitatea ridicată, stabilitatea în solvenți organici și specificitatea de substrat ridicată. Enzimele reprezintă cele mai promițătoare biomolecule cu potențiale aplicații la scară largă în sinteza organică chimică, dar prețul ridicat al biocatalizatorului și stabilitatea operațională nesatisfăcătoare limitează aplicațiile industriale la compuși cu valoare ridicată, cum sunt intermediarii farmaceutici sau produșii chirali [6].

Imobilizarea s-a dovedit a fi una dintre cele mai bune tehnici pentru menținerea activității biologice în condiții potențial adverse, pentru o perioadă de timp mai îndelungată. Principalul avantaj al imobilizării este facilitarea izolării biocatalizatorului din mediul de reacție și reutilizarea acestuia în mai multe cicluri de reacție, în scopul creșterii productivității sale. Diferite metode de imobilizare au fost dezvoltate de-a lungul timpului dar o serie de cerințe trebuie îndeplinite pentru a putea selecta metoda optimă pentru o aplicație specifică [7]:

- imobilizarea nu trebuie să implice resturile de aminoacizi din centrul catalitic al enzimei
- condițiile de imobilizare nu trebuie să inhibe enzima
- pierderea enzimei din suport în timpul operării trebuie să fie minimă
- procedura de imobilizare trebuie să fie ieftină și reproductibilă

Imobilizarea prin metoda de entrapare în sol-gel s-a dovedit a fi o tehnică ideală pentru o varietate largă de biomolecule [8]. Entraparea în sol-gel este o metodă de imobilizare care implică entraparea enzimei într-o matrice poroasă de polimer care permite difuzia substraturilor și produșilor. Procesele sol-gel sunt bine studiate în chimia materialelor. Principalul avantaj al utilizării silicagelurilor pentru imobilizarea enzimelor constă în faptul că pot fi ușor adaptate la o mare varietate de texturi poroase, rețele, funcțiuni de suprafață și condiții de reacție. Mai mult, pH-ul, timpul de gelifiere sau hidrofobicitatea matricei pot fi particularizate pentru o anumită enzimă sau aplicație [7].



## 1.2. Transformări chimice și enzimatiche ale unor carbohidrați

Carbohidrații sunt molecule organice chirale disponibile din resurse naturale și regenerabile și sunt relativ ieftine. Ei joacă un rol important în multe procese biologice cum sunt recunoașterea biologică și căile metabolice și sunt utilizați în industria farmaceutică și alimentară [9]. Recent, epuizarea treptată a rezervelor de resurse fosile a dus la încurajarea proiectelor direcționate către procese noi și eficiente de transformare a materiilor prime regenerabile, printre care se numără și o serie de zaharuri și polizaharide, în produși utili [10].

### 1.2.1. Glucoza

D-glucoza este cel mai important dintre zaharuri, în special pentru fiziologia vegetală și animală. D-glucoza se obține industrial din amidon, prin hidroliză cu acid clorhidric diluat, în autoclave la 2 at. [11]. Cea mai frecventă utilizare a D-glucozei în scop nealimentar este pentru obținerea etanolului prin fermentație.

Există o serie de metode de transformare a D-glucozei în intermediari importanți: mercaptalizarea la ditioacetali aciclici, izopropilidenarea la sisteme furanozice, sau generarea unor structuri piranozice cum sunt glucozidele, glucalii și hidroxiglucalsterii.

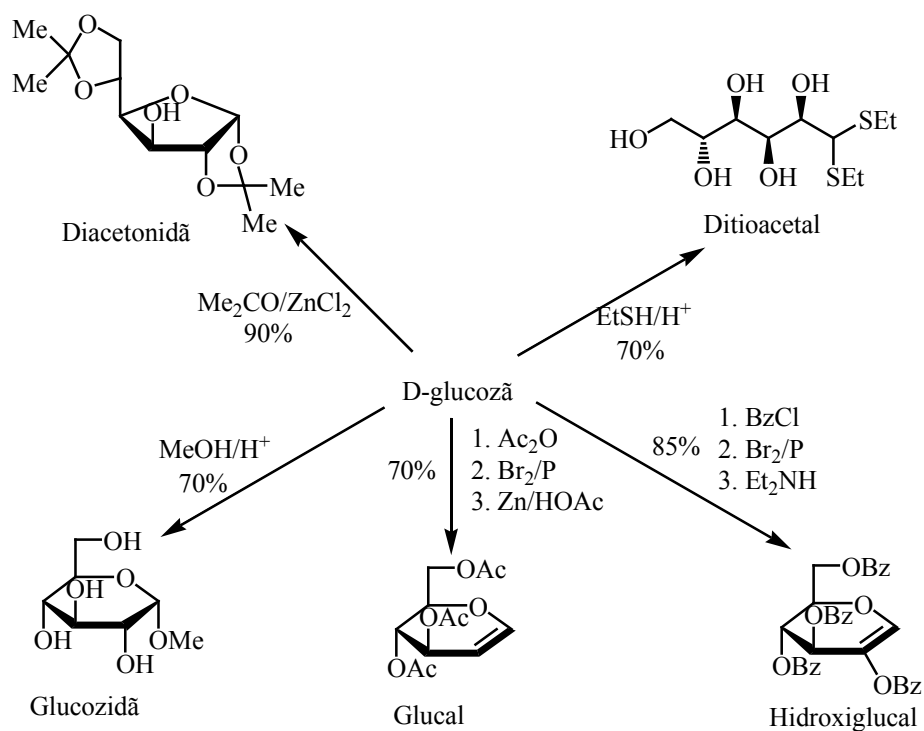


Figura 1.1. Valorificarea D-glucozei [12].

Deși acești produși sunt accesibili iar chimia producerii lor este binecunoscută, exploatarea lor pentru obținerea intermediarilor industriali este încă scăzută. O excepție remarcabilă reprezintă alchil-poliglucozidele, care prezintă performanțe ridicate ca și surfactanți neionici inofensivi, neiritanți pentru piele și biodegradabilitate. Alte aplicații nealimentare ale D-glucozei cuprind oxidarea acesteia (acid D-glucuronic și agenți de chelatare, aditivi textili) și reducerea la sorbitol și vitamina C. De asemenea, utilizarea diaceton glucozei (disponibilă la scară mare) pentru prepararea amiprilozei, un medicament non-steroid și antiinflamator, este o aplicație de mare valoare. Eforturi substanțiale au fost depuse de câteva grupuri de cercetători în vederea generării unor analogi poliamidici de nylon-6,6 și perlon pornind de la glucoză, bazate pe conceptul de a înlocui acidul adipic, hexametilen diamina și  $\epsilon$ -amino-caprolactama cu acid glucaric, 2,5-diaminodihidrosorbitol și respectiv 6-amino-glucono-lactamă.

Utilizarea enzimelor în reacțiile de transformare a D-glucozei a fost mult studiată în literatura de specialitate, astfel că mai multe tipuri de lipaze au fost investigate pentru sinteza esterilor acizilor grași ai glucozei în mediu de terț-butanol și lichide ionice, utilizând atât esteri vinilici de acizi grași activați cât și acizi grași liberi. Lipaza din *Candida antarctica* B s-a dovedit a fi cel mai eficient biocatalizator pentru aceste reacții [13]. De asemenea, a fost descrisă esterificarea glucozei cu diviniladipat pentru obținerea 6-O-vinil-adipoil-glucozei, catalizată de o protează alcalină din specia *Streptomyces*, în mediu de solvent organic și dimetilsulfoxid [14]. 6-O-palmitoil-glucoza a fost sintetizată enzimatic pornind de la glucoză și acid palmitic, cu lipază modificată cu detergenți sintetici, în mediu de solvent organic. Rezultate foarte bune au fost obținute și la esterificarea 1,2-O-izopropiliden glucofuranozei, care este un acetal de zahar și este mai hidrofob decât glucoza nemodificată, cu acidul palmitic utilizând lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată, în amestecuri de acetonă/terț-butanol [15, 16].

La reacția de esterificare a D-glucozei cu acid octanoic, optimizarea concentrației de acid a dus la obținerea exclusivă a mono-octanoilglucozei la gruparea hidroxil primară, prin cataliză enzimatică cu lipaza din *Candida antarctica* B, în mediu de acetonitril [5]. Esteri ai glucozei cu diferiți acizi grași au fost sintetizați în mediu de solvent organic utilizând ca și catalizator lipaza din *Candida antarctica* B. Gradul de polimerizare a fost extins într-o a doua etapă, de transglicozilare, catalizată de o ciclodextrin glicoziltransferază provenind din *Paenibacillus* F8 sau *Bacillus* 169 utilizând ca substraturi ciclodextrine, maltooligozaharide sau amidon [17].

### 1.2.2. Zaharoza

Zaharoza ( $\beta$ -D-fructofuranozil- $\alpha$ -D-glucopiranozida) este un dizaharid natural și este cel mai disponibil dintre toți carbohidrații cu masă moleculară scăzută.

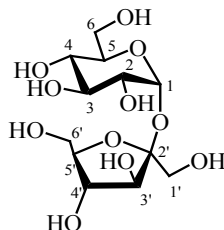


Figura 1.2. Structura chimică a zaharozei și numerotarea atomilor.

Este fabricată din sfeclă de zahăr sau din trestie de zahăr la nivel industrial, iar chimia zaharozei a devenit de un interes considerabil. Poate fi utilizată ca materie primă organică deoarece este ieftină, pură, stabilă și reactivă chimic. Din punctul de vedere al chimiei organice, eficientizarea sintezei derivaților de zaharoză reprezintă o provocare importantă, datorită complexității structurale și funcționale a moleculei de zaharoză. Zaharoza este o moleculă complexă, polifuncțională, foarte oxigenată și sensibilă chimic. Având opt grupări hidroxil reactive și doi atomi de carbon anomeric, cele mai multe transformări duc la amestecuri complexe. Un obiectiv principal al chimiei zaharozei este acela de a înțelege reactivitatea relativă a diferitelor grupe funcționale ale zaharozei și de a controla transformările lor. În sinteza derivaților de zaharoză funcționalizați, controlul selectivității permite stabilirea unor relații structură-proprietăți și în consecință designul unor noi derivați de zaharoză [18].

Selecția corespunzătoare a mediului de reacție trebuie să țină cont de solubilitatea substratului și de potențialele dificultăți de îndepărtare a urmelor de solvent. Zaharoza este suficient de solubilă doar într-un număr limitat de solvenți cum sunt apa, N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfoxidul (DMSO) și piridina. Ca atare, medii de reacție neconvenționale cum sunt dioxidul de carbon supercritic și lichidele ionice sunt de mare interes, la fel ca și procesele fără adaos de solvent. Posibilele alternative pentru agitare sau încălzirea clasică sunt utilizarea ultrasunetelor, care îmbunătățește amestecarea fazelor în sistemele heterogene (datorită polarității foarte ridicate a zaharozei și soluțiilor de zaharoză), precum și utilizarea microundelor, care determină încălzirea uniformă și rapidă a amestecului de reacție. De asemenea, biotransformările sunt atractive deoarece sunt procese foarte selective și au loc în general în mediu apos [19 – 21].

Printre derivații care au fost produși țintă încă de la începuturile chimiei zaharozei, cei mai studiați au fost surfactanții (obținuți prin atașarea la zaharoză a lanțurilor alifatiche hidrofobe prin diferite legături) și compuși polimerizabili. Este importantă luarea în considerare a unor produși țintă noi, exploatând potențialul derivaților de zaharoză ca și compuși cu valoare adăugată ridicată, biocompatibili, biodegradabili și netoxici, în domeniile de aplicare consacrate sau ca și compuși chirali sofisticați, atunci când sunt protejați corespunzător și selectiv pentru sintezele organice. Esterii de zaharoză prezintă interes în diverse aplicații ca substituenți de grăsimi, decoloranți sau emulgatori în industria alimentară și cosmetică. Proprietățile lor depind foarte mult de compoziție, în termeni de grad de substituție și regiochimie. Controlul selectivității este deci de mare interes pentru scopuri preparative, iar studiul relației structură-proprietăți este foarte important pentru aplicații [22].

Zaharoza poate fi transformată într-o varietate de precursori utili, care pot fi preparați fie plecând de la zaharoza liberă, fie de la zaharoza protejată. Cea din urmă este mai convenabilă deoarece modificarea unor asemenea derivați poate fi realizată cu un grad mare de regioselectivitate [23]. În condiții puternic bazice, esterificarea sau transesterificarea duce la amestecuri de esteri în pozițiile primare ca produși principali. Peracetilarea, folosită frecvent ca metodă de izolare și identificare în chimia carbohidraților, se aplică prin tratarea zaharozei cu anhidridă acetică în piridină sau în lichide ionice cu vâscozitate redusă [22].

O alternativă majoră la cataliza bazică este utilizarea enzimelor pentru esterificare, în principal a proteazelor și lipazelor. Pentru ca aceste enzime, care în mod normal hidrolizează legăturile amidice sau esterice, să catalizeze reacțiile inverse de sinteză, este necesar ca ele să fie conduse în mediu organic, cu un conținut mic de apă, doar atât cât să păstreze conformația activă a enzimelor. În

asemenea reacții, dificultatea constă în a găsi condițiile de solvent și temperatură compatibile atât cu solubilitatea substraturilor, cât și cu stabilitatea și activitatea enzimelor. În cazul zaharozei, majoritatea proteazelor conduc selectiv la monoestere în poziția 1'.

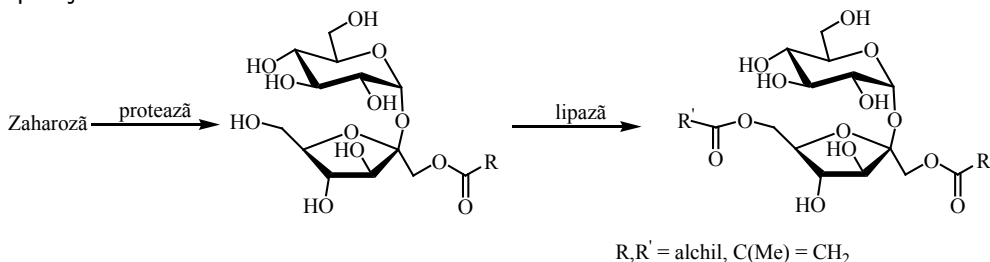


Figura 1.3. Esterificarea enzimatică a zaharozei.

Aceste reacții sunt realizate frecvent în DMF, dar au fost raportate de asemenea reacții în DMSO, un solvent care este mult mai puțin toxic, însă are abilitatea de a denatura proteinele. Uneori pot fi observate variații în selectivitate, cum este cazul reacției zaharozei cu vinil dodecanoat, catalizată de proteaza AL-89, care permite obținerea derivaților 6-O-substituiți, în timp ce subtilizina A catalizează formarea monoesterului la poziția 1' [24]. Au fost descrise de asemenea exemple de selectivitate la gruparea hidroxil din poziția 2. Odată cu înglobarea unor substituenți, descreșterea polarității derivaților zaharozei face ca aceștia să fie solubili în solvenți mai puțin polari, cum sunt acetona sau terț-butanolul, în care unele lipaze pot cataliza reacțiile de esterificare [25]. Spre deosebire de proteaze, care necesită frecvent utilizarea unor donori de acili activați (cum sunt esterii vinilici sau trifluoroetilici), lipazele sunt active cu esteri simpli și chiar cu acizii carboxilici corespunzători în prezența unui compus care reține apa. Pentru anumite lipaze s-a observat o dependență între lungimea lanțului și regioselectivitate. Monoestere substituiți selectiv au fost preparați astfel și studiați [26].

Combi-națiile esterificărilor chimice și mediate de enzime au condus la o serie de diestere ai zaharozei cu acizii grași substituiți specific cu variații în lungimea lanțului alchil, nivelului de saturare, precum și a poziției scheletului de zahăr. Aceasta a permis demonstrarea impactului variațiilor structurale asupra proprietăților termotropice [27]. Esterificarea mono- sau diesterilor substituiți selectiv cu reziduuri galoil a condus la o serie de poliestere care au fost preparați și studiați pentru proprietățile lor antioxidante [28, 29]. Derivați similari conținând o unitate galat (la poziția 6'-O, 4'-O, 6-O, 1'-O respectiv 2-O) au fost izolați din surse naturale [30]. O altă metodă pentru obținerea derivaților de zaharoză galoilați la pozițiile terminale a fost propusă de Barros și alții. Desililarea selectivă la poziția 1' a penta-O-acetilzaharozei sililată la pozițiile 1', 6, 6' constituie o etapă cheie în prepararea analogilor 1'-O-galoilați [29].

O altă metodă pentru sinteza zaharozei parțial esterificate implică deacetilarea selectivă a octaacetatului de zaharoză. Hexa- și hepta-O-acetil zaharoza au fost astfel preparate în cataliză bazică sau cu  $\text{Al}_2\text{O}_3 - \text{K}_2\text{CO}_3$ , amine primare sau enzime [31, 32]. O metodă în mai multe etape, bazată pe desililarea selectivă a derivaților de zaharoză trisililați, a condus la obținerea de heptaestere cu poziția 1' neprotejată [33]. De asemenea 4,6-ortoestereii, obținuți prin reacția zaharozei cu etil ortoacrilat, pot fi deschiși cu formarea 6- sau 4-esterilor, furnizând materii prime convenabile pentru prepararea polimerilor biodegradabili (Figura 1.4).

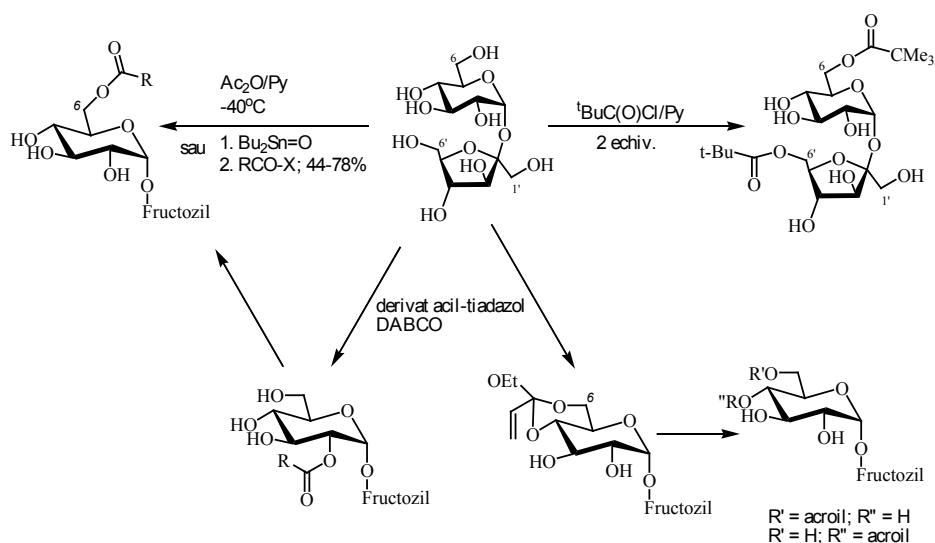


Figura 1.4. Esterificarea parțială a zaharozei [34].

Sinteza regioselectivă a monoesterilor 6'-O-acil zaharozei a fost realizată prin esterificarea acetalilor de zaharoză cu acizi grași, catalizată de lipaze în solvenți organici, cât și fără solvent, urmată de hidroliza grupării izopropilidenice cu soluții apoase de acizi (Figura 1.5).

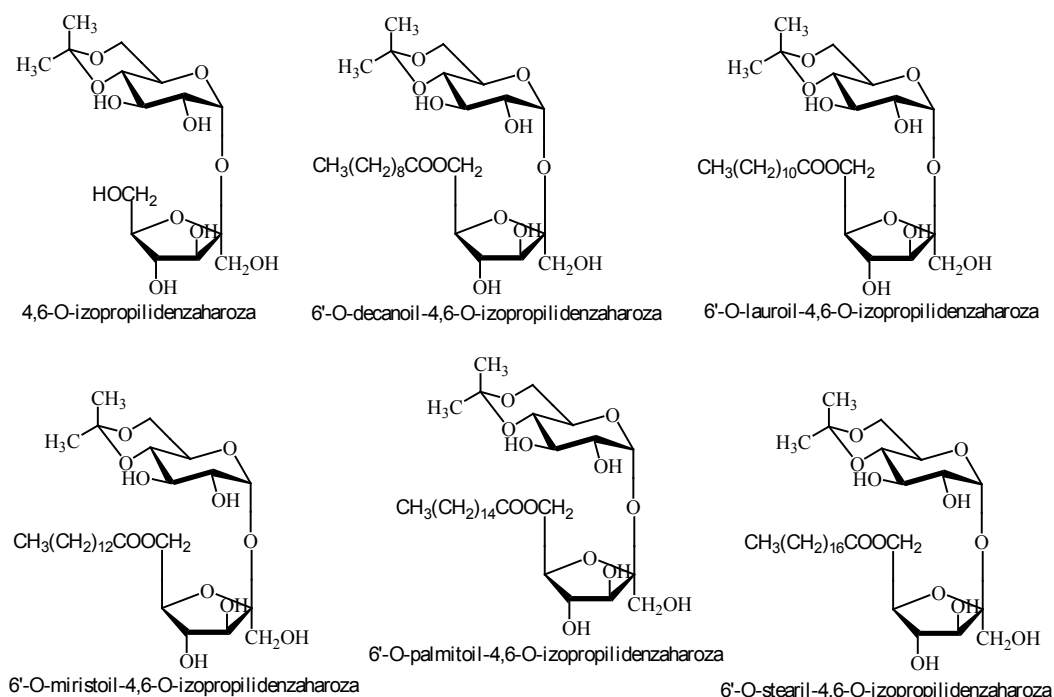


Figura 1.5. Structurile 6'-O-monoacil-4,6-O-izopropilidenzaharozei [35].

Sinteza enzimatică regioselectivă a esterilor acilați pornind de la zaharoză și acrilat de vinil utilizând Optimase M-440, o protează alcalină din *Bacillus licheniformis*, a fost realizată în piridină anhidră. Monoacrilatul de zaharoză poate fi polimerizat utilizând un catalizator chimic neselectiv, în prezența unei cantități mici de diacrilat de zaharoză ca agent de înrețelare pentru sinteza unor hidrogeluri noi, care pot avea importanță în aplicațiile clinice [36]. O serie de enzime au demonstrat activitate catalitică pentru acilarea zaharozei în piridină anhidră. Reacția enzimatică a fost foarte selectivă, cu trifluoroetilbutirat ca ester donor, reacția de transesterificare enzimatică a zaharozei a avut ca rezultat 1'-butirat de zaharoză și 6, 1'-dibutirat de zaharoză. Nu s-a observat formarea tributiratului de zaharoză. Utilizând o tehnică similară a fost obținut un poliester de zaharoză liniar cu catenă lungă, folosind Proleather, o protează alcalină din specia *Bacillus* [37]. Noi tipuri de esteri de zaharoză au fost sintetizați și au demonstrat proprietăți insecticide. Pe baza structurii esterilor naturali de zaharoză izolați din diferite specii *Nicotiana* care au arătat proprietăți insecticide s-a încercat sintetizarea unor esteri similari. Metoda poate fi adaptată pentru producerea comercială a insecticidelor cu acțiune asupra dăunătorilor, dar inofensive pentru mediul înconjurător [38, 39].

Reactivitatea nucleofilă a zaharozei urmează reguli specifice și grupările hidroxil din moleculă pot reacționa în funcție de agentul electrophil sau de condițiile de reacție, uneori cu un control foarte bun al selectivității. În afară de funcționalizarea clasică a diolului din pozițiile 4 și 6 prin acetalizare, alte trei procese sunt tipice pentru reactivitatea zaharozei: reactivitatea grupării hidroxil din poziția 2 favorizată electronic, reactivitatea grupărilor hidroxil din pozițiile 6 și 6' favorizate steric și reactivitatea caracteristică a grupărilor hidroxil din poziția 1' sau 6' în esterificările mediate de enzime cum sunt proteazele sau lipazele. Această chemoselectivitate permite limitarea nivelului de substituție la derivați mono- sau disubstituiți, demonstrând că regioselectivitatea furnizează de asemenea un control al gradului de substituție. Procesele selective permit funcționalizarea directă a moleculei de zaharoză și utilizarea sa ca materie primă pentru produși cu relevanță industrială.

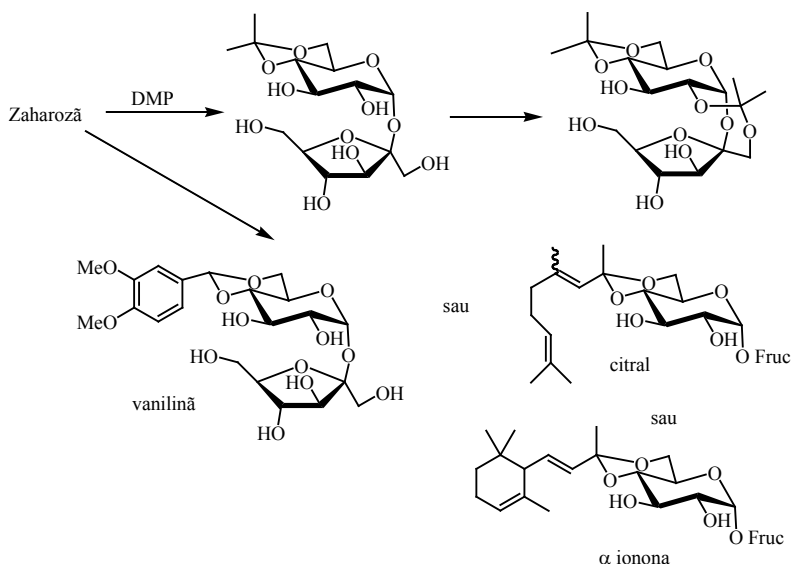


Figura 1.6. Acetali de zaharoză [40].

De asemenea reacția zaharozei neprotejate cu 1-cloro-3,3-dimetil-2-butanonă în dimetilformamidă, în condiții bazice, a dus la formarea unui acetal hidroximetil alchilat ciclic ca produs principal, cu implicarea grupărilor hidroxil din pozițiile 2 și 3. Etapa favorizată cinetic implică atacul asupra grupării carbonil de către  $\alpha$ -halo-cetonă, ceea ce duce în final la formarea acetalului ciclic. Această reacție furnizează accesul direct la grupările hidroxil din pozițiile 2 și 3 ale zaharozei într-o etapă unică [41].

A fost raportată o evoluție semnificativă în domeniul acetalilor ciclici ai zaharozei pornind de la reacția zaharozei cu 2,2-dimetoxipropanul în dimetilformamidă în prezența acidului p-toluensulfonic, urmată de acetilare, cu formarea unui amestec de tetraacetat de 1',2:4,6-di-O-izopropiliden zaharoză și hexaacetat de 4,6-O-izopropiliden zaharoză, respectiv urmată de benzoilare, cu formarea hexabenzooatului de 4,6-O-izopropiliden zaharoză. În continuare, tratarea acestor compuși cu soluție apoasă de acid acetic a dus la formarea 4,6-diolilor corespunzători care au fost transformați apoi în 2,3,1',3',4',6'-hexa-O-acetil-6-O-tritil zaharoză și respectiv hexabenzooatului de zaharoză [42].

Combinarea diferitelor reacții cum sunt acetalizarea, eterificarea și esterificarea poate conduce la derivați de zaharoză specific protejați, care pot fi integrați mai departe în scheme sintetice pentru obținerea unor compuși cu grad de complexitate mai mare [40].

### 1.2.3. Lactoza

Lactoza (4-O- $\beta$ -D-galactopiranozil-D-glucopiranoza) este un dizaharid format din D-galactoză și D-glucoză și este principalul carbohidrat din lapte.

Derivații de lactoză se obțin prin modificarea chimică, enzimatică sau microbiană a lactozei. Figura 1.7 redă o imagine de ansamblu a proceselor chimice sau enzimatică utilizate pentru conversia lactozei. Acidul lactobionic, lactitolul, lactuloza și lactozaharoza sunt produse comerciale pentru o varietate de aplicații alimentare și farmaceutice. Aplicațiile alimentare predominante ale derivaților de lactoză includ utilizarea lor ca laxativi și carbohidrați probiotici. Producția galactooligozaharidelor probiotice prin conversia lactozei catalizată de  $\beta$ -galactozidază a devenit de importanță comercială. Carbohidrații probiotici nu sunt digerați în intestinul subțire și sunt convertiți la acizi grași cu lanț scurt, dioxid de carbon și apă de către microflora din colon. Carbohidrații probiotici permit stimularea selectivă a creșterii și/sau activitatea bifidobacteriilor [43 - 45].

Esterii de lactoză au fost descriși în literatură ca având un domeniu variat de proprietăți și potențiale aplicații. Gradul de substituție, poziția și tipul de ester determină proprietățile funcționale ale derivaților lactozei. Lactoza poate fi esterificată atât prin metode chimice cât și prin metode enzimatică. Astfel a fost obținut oleatul de lactoză prin tratarea unei soluții tampon de lactoză cu acid oleic și lipază provenită din *Aspergillus niger* [43]. Au fost sintetizați de asemenea monoesterii cu grupări octil, dodecil și hexadecil ai lactozei și lactitolului. Derivații de lactoză au fost un amestec al ambilor anomeri a doi monoesteri în timp ce derivații de lactitol au fost un amestec al ambilor anomeri a trei monoesteri. În general, surfactanții de lactoză și lactitol cu aceeași lungime a catenei au demonstrat proprietăți fizico-chimice asemănătoare [46].

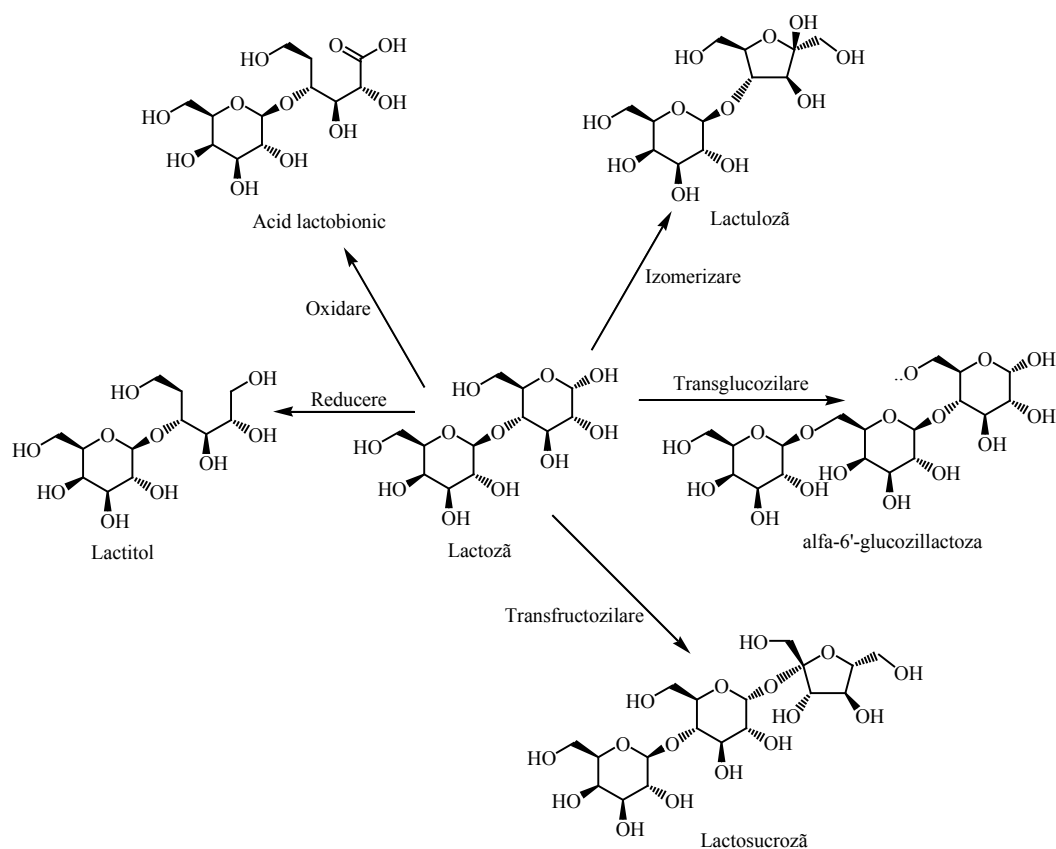


Figura 1.7. Căi de transformare a lactozei.

O metodă binecunoscută de protejare a grupărilor hidroxil din carbohidrați este prin formarea acetalilor ciclici. Gruparea izopropilidenică este utilizată foarte des ca grupare protectoare pentru modificarea lactozei și a altor carbohidrați datorită ușurinței cu care aceasta este atașată de molecula de carbohidrat, dar și îndepărtată ulterior în condiții blânde, precum și a stabilității în condiții de reacție neutre și bazice. Mai mult, formarea acestora nu este însoțită de introducerea unor noi centri chirali în moleculă, și deci posibilitatea creării unor diastereoizomeri este eliminată. S-a raportat că prin reacția lactozei cu 2-metoxipropenă s-a obținut 6,2':4',6'-di-O-izopropiliden lactoza, în care una din grupările acetal a unit cele două cicluri ale zaharului la poziția C-6 din glucoză și C-2' din galactoză. Apoi a fost raportată obținerea derivatului 4',6'-O-izopropiliden-lactoza și a 3,2':4',6'-di-O-izopropiliden-lactozei. Acetonarea benzil- $\beta$ -lactozidei sub control cinetic, utilizând 2-metoxipropenă și para-toluensulfonat de piridină ca și catalizator, a dus la obținerea unui amestec de acetali format din 6,6'-di-O-(2-metoxi) izopropil benzil  $\beta$ -lactozidă, 6'-O-(2-metoxi) izopropil-6-O-(2-metoxi) izopropil benzil  $\beta$ -lactozidă. S-au format de asemenea acetalul ciclic benzil 4,6'-di-O-izopropiliden- $\beta$ -lactozida și un diacetal care după acetilare a fost identificat ca fiind benzil 2,3,6'-tri-O-acetil-3,2':4',6'-di-O-izopropiliden- $\beta$ -lactozidă. Favorizarea formării acetalilor 3,2'-ciclici cu opt atomi în comparație cu acetalii 6,2'-ciclici cu nouă atomi a fost demonstrată prin acetonarea



derivaților parțial benzilați în care grupările hidroxil 3,6,2',4' și 6' au fost disponibile pentru acetalizare. Ca o demonstrație a potențialului sintetic pe care acești produși îl posedă, polihidroxieterul chiral macrociclic, benzil 2,3,2'-tri-O-benzil-3',4'-O-izopropiliden-6,6'-O-(3,6,9-trioxaundecan, 1,11-dil)- $\beta$ -lactozida a fost ușor preparată pornind de la 3',4'-O-izopropiliden- $\beta$ -lactozidă. Reacția acestui monoacetal cu 2-metoxipropena urmată de benzilarea selectivă a dus la benzil 2,3,2'-tri-O-benzil-3',4'-O-izopropiliden- $\beta$ -lactozida. Condensarea acestui derivat cu tetraetilen glicol ditosilat în prezența NaOH a dus la obținerea produsului macrociclic. A fost descrisă și sinteza derivaților lactozei substituiți în pozițiile 2' și respectiv 2',6'. Tri-O-izopropiliden dimetil acetalul și derivatul 6'-O-(2-metoxi)izopropilidenil au fost preparați ca precursori prin reacția lactozei cu 2,2-dimetoxipropan în prezența acidului p-toluensulfonic ca și catalizator. Mai departe, din acești derivați au fost preparați 2'-O-metilactoză, 2',6'-di-O-metilactoză și 2'-O-benzilactoză (Figura 1.8) [47 – 49].

2'-O- $\alpha$ -L-fucopiranozilactoză, o componentă a laptelui uman, s-a demonstrat a fi inhibitoare a hemaglutinării celulelor din sângele uman și inhibitoare pentru precipitarea substanțelor H umane de către unele lectine. Astfel, a fost inițiată sinteza fucozilactozelor izomere pentru a determina dacă acești produși pot fi utili în studii ale specificității combinării situsurilor pe anticorpi și lectine [50, 51]. A fost utilizat derivatul tri-O-izopropilidenic (sub forma 6'-acetatului) ca acceptor în sinteza 2'-O- $\alpha$ -L-fucopiranozilactozei. Reacția a avut loc între acetal și pentenil glicozidă în prezența di-(2,4,6-trimetilpiridin) percloratului de iodoniu, urmată de îndepărtarea grupărilor protectoare. Acest compus poate fi de asemenea obținut prin utilizarea ca donor glicozil a metil 3,4-O-izopropiliden-2-O-(4-metoxibenil)-1-tio- $\beta$ -l-fucopiranozidei. Oligozaharidul format, cu o grupare fucozil la poziția C-3 din molecula de glucoză a lactozei, a arătat de asemenea un efect semnificativ de inhibiție asupra legării L selectinului la glicolipida 2,3-sialil Lewis X [52].

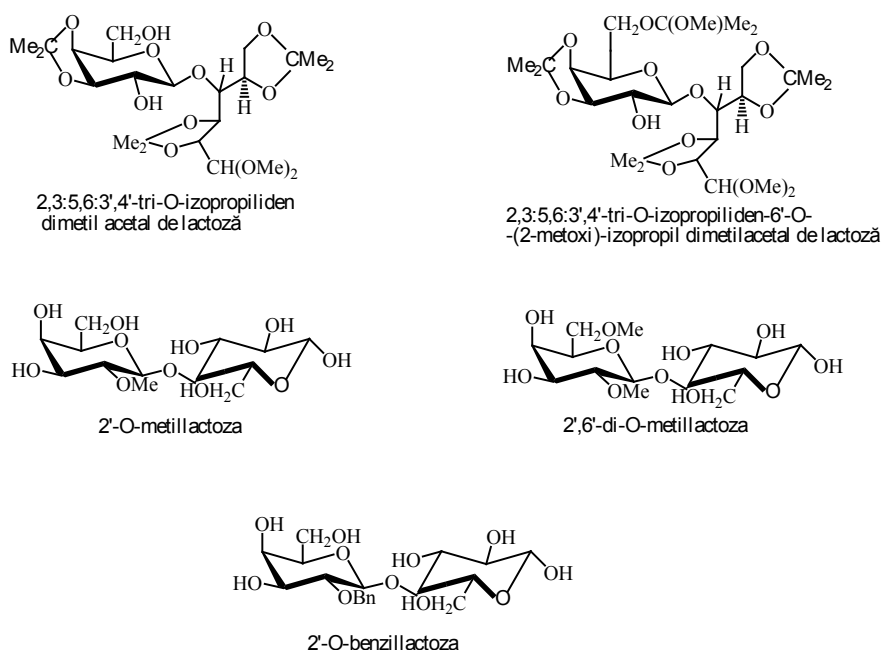


Figura 1.8. Structura derivaților 2'-mono și 2',6'-disubstituiți ai lactozei.

### 1.2.4. Inulina

Inulina, polizaharidul de rezervă a multor plante, este un carbohidrat polidispers format în principal din legături  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructozil-fructoză. O moleculă de glucoză la un capăt poate fi prezentă, dar nu este obligatoriu. Gradul de polimerizare al inulinei depinde de tipul plantei din care este extrasă, de condițiile de mediu în timpul creșterii și de vârsta fiziologică a plantei. Cele mai importante surse de inulină sunt *Cichorium intybus* (cicoarea), *Dahlia pinuata* (dalia) și *Helianthus tuberosus* (anghinarea), cicoarea fiind preferată. Inulina extrasă din această plantă are un grad de polimerizare variind între 2 și 70 unități de fructoză. Structura moleculară a inulinei este prezentată în Figura 1.9.

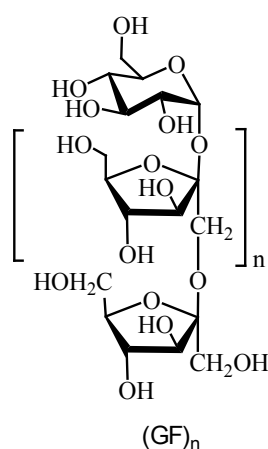


Figura 1.9. Structura moleculară a inulinei.

În general, trei tipuri de inulină pot fi distinse și sunt disponibile comercial sub forma unei pudre albe. Prima este inulina nativă, cu un grad de polimerizare mediu de 10-12, conținând glucoză, fructoză, zaharoză și oligozaharide mici, precum și polimeri ai fructozei cu grad de polimerizare ridicat. A doua este inulina cu catenă lungă cu grad de polimerizare mai mare de 23 și în care lipsesc catenele mai mici de 10 unități, obținută prin fracționarea fizică a inulinei native, cu eliminarea oligozaharidelor mai mici și monomerii care sunt prezenți în mod natural [53]. Cea de-a treia este produsul complementar al celei din urmă, care nu conține molecule cu grad de polimerizare mai mare de 10 și poate fi obținut printr-un proces de hidroliză enzimatică controlat. Tipurile de inulină menționate mai sus pot fi utilizate pentru obținerea surfactanților pe bază de inulină.

În producția industrială a inulinei se disting două etape. Prima etapă, care este similară cu procesul pentru sfecla de zahăr, include extracția și o etapă primară de purificare ce are ca rezultat un sirop brut impur. Cea de-a doua etapă este faza de rafinare care are ca rezultat un produs final comercial cu o puritate mai mare de 99,5%. Aceasta este realizată prin utilizarea rășinilor schimbătoare de ioni pentru demineralizare și cărbune activ pentru decolorare finalizându-se cu un proces de uscare prin pulverizare pentru a obține un produs final comercial, stabil microbiologic și la depozitare.

Inulina este utilizată pe scară largă în produse alimentare. Poate fi folosită fie pentru calitățile nutritive, fie pentru proprietățile tehnologice, deși este adesea aplicată pentru a oferi un beneficiu dublu: o calitate organoleptică îmbunătățită și o

compoziție nutrițională mai echilibrată. Ca un răspuns la cererea tot mai mare pentru produse obținute din resurse regenerabile, multe cercetări au fost dedicate modificării chimice a inulinei. Hidrofobicizarea inulinei, de exemplu prin grefarea lanțurilor alchil pe scheletul inulinei obținându-se astfel un derivat de inulină cu caracterul amfifil dorit, poate fi realizată în diferite moduri: prin esterificare, eterificare sau prin carbamoilare. Aceste reacții sunt realizate, de obicei, în solvenți cum sunt piridina, dimetilformamida și dimetilsulfoxidul, utilizând catalizatori cum sunt, de exemplu, acetatul de sodiu, carbonatul de potasiu sau trietilamina. Esterificarea poate fi realizată folosind reacții convenționale cu acid clorhidric sau cu anhidride. Eterificarea inulinei poate fi realizată folosind alchilepoxizi ca reactanți. Reacția de carbamoilare folosește alchil izocianați, cu obținerea carbamatului de inulină [54].

Metodele enzimatiche de obținere a derivaților de inulină au fost de asemenea descrise în literatura de specialitate. Astfel, esterii laurici ai oligomerilor de fructoză au fost produși prin reacția catalizată de lipaza din *Candida antarctica* B. Oligozaharidele de fructoză utilizate în aceste cercetări au fost obținute prin hidroliza parțială a inulinei. Conjugații obținuți după acilarea acestor oligomeri au demonstrat proprietăți funcționale comparabile cu cele ale blocurilor copolimerice sintetice. În medie, o moleculă de acid lauric a fost grefată pe un oligomer de fructoză cu grad de polimerizare egal cu 10. O ilustrare schematică a structurilor propuse pentru acești produși este redată în Figura 1.10 [55]:

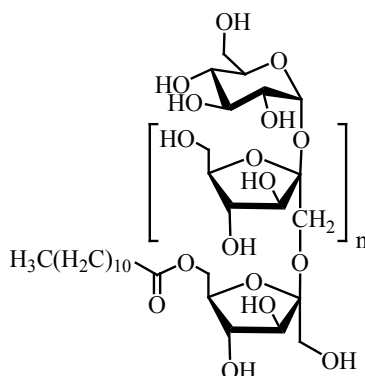


Figura 1.10. Structura monolauril inulinei.

A fost descrisă de asemenea sinteza  $\beta$ -hidroxialchil eterilor de inulină cu catenă lungă. La eterificarea inulinei în mediu apos cu 1,2-dodecilepoxid sau cu epoxizi cu catenă mai lungă, surfactanții utilizați au avut o importanță deosebită [56].

Surfactanți cu hidrofobicitate diferită derivați de la inulină pot fi obținuți prin modificarea a trei parametri: gradul de polimerizare al inulinei, lungimea lanțului alchil și gradul de substituție. De exemplu, INUTEK SP1, disponibil comercial de la BENEIO Bio Based Chemicals, este format din schelet de inulină cu grad de polimerizare mai mare de 23 pe care mai multe lanțuri alchil  $\text{C}_{12}$  sunt grefate aleator. Acest surfactant pe bază de biopolimer posedă o combinație de proprietăți funcționale interesante. Datorită segmentului mare de carbohidrat în moleculă, biodegradabilitatea sa este ridicată iar toxicitatea este scăzută. Produsul este

complet biocompatibil, inofensiv și nu duce la iritații ale pielii, toxicitate orală, sensibilizare, mutagenză sau toxicitate în apă [54].

A fost investigată obținerea unor conjugați pe bază de polizaharide, cu proprietăți surfactante, conținând un schelet hidrofil de polizaharid și o catenă laterală hidrofobă de acid gras. Ca bloc hidrofob a fost utilizat acidul lauric iar ca bloc hidrofil, inulina. Esterii acidului lauric cu inulina au fost sintetizați folosind ca și catalizator o lipază într-un amestec de solvenți format din 20% DMSO/*tert*-butanol la 80°C, având ca rezultat inulina acilată cu proprietăți funcționale comparabile cu cele ale blocurilor de copolimeri sintetici [57].

### 1.2.5. Maltodextrinele

Maltodextrinele sunt produși de hidroliză parțială ai amidonului, fiind formați din oligomeri sau polimeri de D-glucoză legați  $\alpha$ -(1,4) (Figura 1.11). Aceștia pot fi hidrolizați de către acizi, enzime sau combinații enzimă/acid. Au masă moleculară diferită și se clasifică în funcție de echivalentul de dextroză (DE). Echivalentul de dextroză este o măsură a capacității de reducere a polizaharidelor/oligozaharidelor derivate din amidon, în comparație cu D-glucoza. În mod normal, maltodextrinele au o valoare DE mai mică de 20. Maltodextrinele cu valori DE diferite au proprietăți fizico-chimice diferite, proprietăți cum sunt solubilitatea, punctul de îngheț, temperatura, vâscozitatea, etc. Oricum, maltodextrinele cu aceeași valoare DE pot de asemenea să aibă proprietăți diferite în funcție de procedura de hidroliză, sursa de amidon (porumb, cartofi, orez) și raportul amiloză/amilopectină. Maltodextrinele sunt mult utilizate în emulsiile alimentare ca și stabilizatori [58].

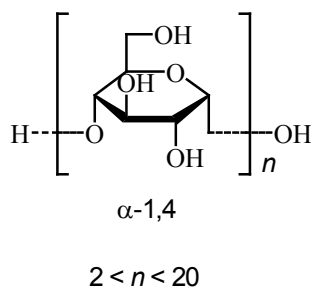


Figura 1.11. Structura chimică a maltodextrinelor.

Amidonul a fost modificat cu scopul de a extinde utilitatea sa pentru o varietate de aplicații industriale. Proprietățile amidonului modificat pot fi alterate extensiv prin variații în natura chimică a derivaților și gradului de substituție. De exemplu, esterificarea grupării hidroxil poate imprima amidonului termoplasticitate și rezistență la umiditate, în comparație cu amidonul nemodificat. Derivatizarea cu grupări hidrofobe a amidonului și altor polizaharide conferă proprietăți importante cum sunt activitatea de suprafață, rezistența la umiditate, conducând la soluții cu vâscozitate mai mare și organizarea în nanoparticule. Acești derivați au aplicații ca emulgatori, pelicule rezistente la umiditate, modificatori reologici și eliberarea substanțelor biologice active în organism. Alchensuccinații de amidon au fost mult studiați iar cei cu grad scăzut de substituție au fost preponderent utilizați ca emulgatori în industria alimentară. Stearații prezintă, de asemenea, potențial în aplicațiile descrise mai sus dar metodele utilizate în mod obișnuit implică reactivi și

catalizatori costisitori. De exemplu, stearații de amidon au fost preparați utilizând cloruri acide și anhidride, reactivi care sunt costisitori și toxici. A fost raportată pentru acest scop utilizarea lipazelor ca și catalizatori la transesterificarea amidonului cu stearat de vinil. O altă metodă descrisă a fost implicarea unui solvent inert și anume un lichid ionic (1-butil-3-metilimidazolil dicianamida) pentru maltodextrine care a avut și rol de catalizator la esterificarea cu stearatul de vinil sau acidul stearic. După terminarea reacției, lichidul ionic a fost extras cu etanol și a putut fi recuperat și reutilizat. A fost posibilă solubilizarea unor concentrații mari de maltodextrine în acest lichid ionic [59].

Reacțiile anhidridei octenil-succinice cu trei forme fizice de amidon: amidon granular insolubil provenit din porumb, amidon granular microporos și maltodextrine solubile au fost investigate și comparate. De asemenea, a fost examinat efectul concentrației de anhidridă octenil-succinică asupra eficienței reacției. La creșterea concentrației de anhidridă octenil-succinică, gradul de substituție a crescut dar eficiența reacției a scăzut. În cazul octenil-succinil maltodextrinelor gradul de substituție și eficiența reacției au fost mai mari decât în cazul produșilor cu amidonul granular, în aceleași condiții de reacție, ceea ce indică faptul că maltodextrinele au o reactivitate mai mare [60].

Esterii de polizaharide au fost mult studiați în ultimele două decenii și multe metode au fost dezvoltate cu scopul de a îndeplini anumite cerințe. De exemplu, acetatții de amidon pe bază de polimer nativ sustenabil pot fi utilizați ca materiale termoplastice. Reacțiile de esterificare ale amidonului hidrolizat sunt foarte bine documentate. Primii acetatți au fost descriși în literatura de specialitate încă din anul 1865. Reacția amidonului cu anhidrida acetică a avut ca rezultat acetatul de amidon, cu grad redus de substituție. Un activator este esențial pentru obținerea derivaților înalt substituți, piridina fiind adesea utilizată în acest sens. Alți autori (Mark și Mehlretter 1972) au descris utilizarea anhidridei acetice ca solvent reactiv și au indus acetilarea amidonului netratat utilizând o soluție apoasă de hidroxid de sodiu [61].

S-a presupus că modificarea chimică a proteinelor prin conjugarea cu polizaharide poate duce la îmbunătățirea proprietăților de emulsifiere, în special în condiții de pH scăzut, punctul izoelectric și solubilitatea fiind modificate, iar integritatea moleculară conservată. Astfel, au fost preparați glicoconjugați de cazeină-maltodextrine utilizând un proces bazat pe rearanjarea Amadori a reacției Maillard [62].

De asemenea, proprietățile de emulsifiere ale complexilor covalenți ai maltodextrinelor cu proteine izolate din zer au fost investigate în condiții acide și în condițiile unor concentrații ridicate de electroliți, în sisteme conținând uleiuri formate din trigliceride de mărime medie. Legarea covalentă a proteinelor la maltodextrine a fost realizată prin tratamentul termic uscat al amestecului celor două componente. Legarea directă a proteinei din zer la maltodextrină a fost confirmată prin electroforeza cu gel de poli(acrilamidă). Analiza distribuției dimensiunii particulelor a arătat că această legătură covalentă dintre maltodextrine și proteinele din zer duce la o îmbunătățire substanțială a proprietății de emulsifiere, atât în condiții acide cât și neutre [63].

### **1.3. Derivați ai zaharurilor și modificarea lor prin biocataliză**

Carbohidrații reprezintă 95% din biomasa regenerabilă anuală. Cu toate acestea, potențialul lor ca materii prime organice pentru industria chimică este în mare parte neexploatat. Necesitatea de a înlocui tot mai mult materiile prime fosile cu cele care se regenerează anual este evidentă. Cercetarea se bazează pe deschiderea a noi domenii nealimentare pentru carbohidrați în general și pentru mono- și dizaharide în special, acestea fiind mai convenabile pentru transformările chimice directe.

Polizaharidele reprezintă de departe cele mai mari cantități de biomasă regenerabile anual, dar utilizarea lor în scopuri nealimentare se limitează la industria textilă, a hârtiei și peliculelor, fie în forma nativă fie ca esteri simpli. Ca materii prime organice de bază pentru industria chimică, monozaharidele componente ale acestor polizaharide: glucoza, fructoza, xiloza, etc., respectiv dizaharidele, sunt mult mai convenabile pentru modificările chimice directe și obținerea unor produși cu aplicații industriale specifice [12].

Esterificarea chimică sau alchilarea zaharurilor neprotejate este însoțită adesea de formarea amestecurilor de zaharuri mono- și poliacilate sau alchilate, rezultând astfel necesitatea introducerii și a îndepărtării ulterioare a unor grupări protectoare. Esterificarea unor compuși cum sunt alchil glucozidele nu este împiedicată de solubilitatea și miscibilitatea scăzută a zaharurilor în solvenții organici, deoarece alchil glucozidele au o solubilitate ridicată în acești solvenți [64]. Esterii alchil glucozidelor cu acizii grași sunt surfactanți cu proprietăți de emulsifiere excelente și sunt de asemenea ușor digestibili [65].

Esterii alcoolilor derivați de la zaharuri au demonstrat de asemenea proprietăți surfactante, în special abilitatea de a reduce tensiunile de suprafață și la interfață, precum și de stabilizare a emulsiilor [66].

### 1.3.1. Alcooli derivați de la zaharuri (alditoli)

Aldozele și cetozele pot fi ușor dehidrogenate la alditoli, cu generarea unei grupări noi alcoolice din funcțiunea carbonilică, numele lor derivând din aldoza respectivă prin înlocuirea sufixului "oză" cu "itol". Astfel, prin reducerea D-glucozei se obține D-glucitolul (numit și sorbitol). Inițial, amalgamul de sodiu a fost cel mai utilizat agent de reducere pentru aceste reacții, dar în prezent se mai folosesc și alți agenți cum sunt soluția apoasă de borohidruură de sodiu, sau pentru zaharurile sensibile la mediul alcalin,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  în acid acetic. Pentru prepararea comercială a alditolilor se realizează hidrogenarea la presiuni înalte a aldozelor și cetozele cu metale rare, în special nichel (Figura 1.12).

Alditolii diferă considerabil, din punct de vedere chimic, de carbohidrații din care provin datorită lipsei grupării carbonil. Astfel, reacția Maillard și degradarea Strecker sunt inhibitate. În plus, alditolii proveniți din mono- și dizaharide sunt mult mai rezistenți la sistemele enzimatică, acizi, alcalii și la acțiunea căldurii, în comparație cu zaharurile și siropurile de glucoză [67]. Prin hidrogenare se îmbunătățește stabilitatea chimică a alditolilor în comparație cu cea a zaharurilor, de exemplu, alditolii nu se degradează la 150°C. De asemenea se modifică efectele fiziologice, de exemplu, alditolii au puține calorii, nu sunt carcinogenici și au efecte neglijabile asupra nivelului de zahăr în sânge [68].

Alditolii au structură similară cu glicerina, dar posedă grupări hidroxil cu orientare diferită. Prin combinarea acestora cu acizii grași, care au la rândul lor lanțuri acil de diferite lungimi și diferite grade de nesaturare, rezultă esteri cu o varietate de proprietăți surfactante și cu aplicații ca aditivi alimentari. Utilizarea lipazelor permite obținerea monoesterilor alditolilor în care restul de acid gras este legat regiospecific de una din grupările hidroxil din molecula alditolului printr-o legătură esterică. Astfel, alditolii cum sunt arabitoolul, eritritoolul, ribitolul, xilitoolul, sorbitoolul au fost condensați cu acizi grași saturați ca acidul octanoic, decanoic, lauric, miristic, în cataliză enzimatică utilizând lipaza din *Candida antarctica* B, în acetonă. A fost măsurată tensiunea superficială a soluțiilor apoase a monoesterilor, la concentrații diferite, pentru estimarea concentrației critice micelare (CMC), pentru a stabili modul în care numărul și orientarea grupărilor hidroxil din alditol precum și lungimea lanțului acil din acidul gras afectează proprietățile surfactante [69].

Au fost examinate capacitățile de emulsifiere și de stabilizare a emulsiilor ale monolaurilului, monomiristoilului, monodecanoilului și monopalmitoilului de glicerol, eritritol, arabitol, ribitol și sorbitol. Toți esterii obținuți au demonstrat capacități de emulsifiere pentru prepararea emulsiilor ulei/apă, faza uleioasă fiind uleiul de soia, printr-o metodă de emulsifiere în două etape utilizând un omogenizator de înaltă presiune. Pe baza acestor experimente, monoesterii alditolilor s-au dovedit a fi emulgatori foarte promițători [70].

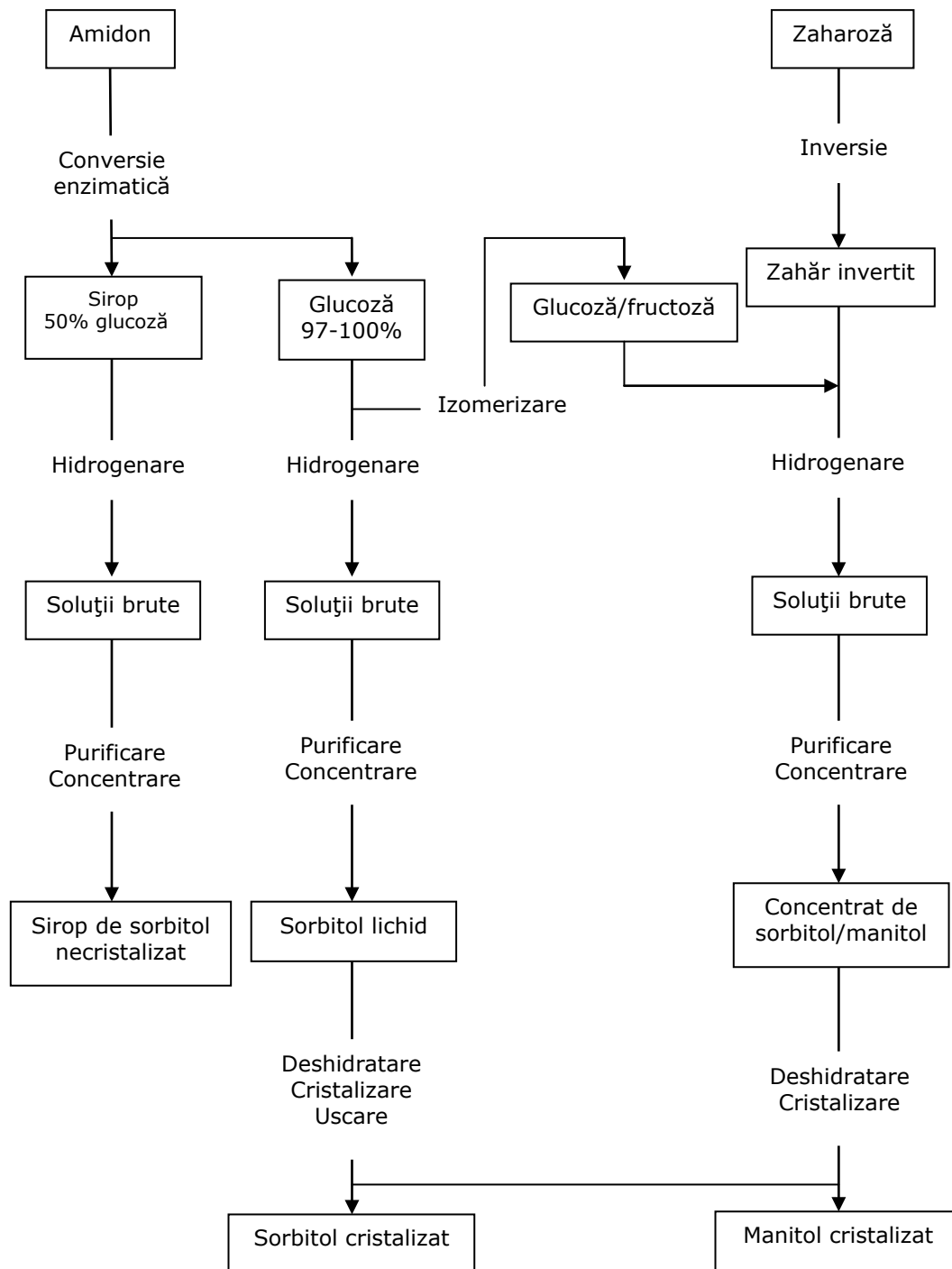


Figura 1.12. Schema procesului tehnologic de obținere a sorbitolului și manitolului.



### 1.3.1.1. Xilitolul

Xilitolul este un alditol cu cinci atomi de carbon (pentitol) și este produs industrial prin hidrogenarea catalitică a D-xilozei [71]. Xilitolul se găsește în natură, în cantități mici în drojdii, licheni, ciuperci, precum și în unele fructe și vegetale. În organismul uman, xilitolul se formează ca intermediar al metabolismului glucozei.

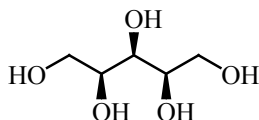


Figura 1.13. Structura moleculară a xilitolului.

Xilitolul a fost obținut pentru prima dată de Emil Fischer în 1891, sub forma unui sirop, prin reducerea D-xilozei cu amalgam de sodiu. Începând cu anii 1970, xilitolul a fost produs la scară comercială prin reducerea catalitică a D-xilozei cu hidrogen în prezența Ni Raney. Întrucât materiile prime conțin și alte zaharuri, xilitolul este separat de ceilalți polioli prin tehnici cromatografice. Sinteza xilitolului prin metode fermentative sau procese enzimatică este de asemenea posibilă [67].

Esterii acizilor grași cu xilitolul sunt surfactanți neionici cu proprietăți de emulsifiere, de stabilizare și detergente. Datorită proprietăților surfactante și biodegradabilității ridicate în condiții aerobe și anaerobe, acești compuși sunt utilizați în industria alimentară, a detergenților, cosmetică, farmaceutică și în produsele de îngrijire dentară. Nu prezintă toxicitate pentru organismul uman, nu irită pielea, sunt inodori și insipizi și au fost raportate proprietăți antibiotice, antimicrobiene, antitumorale și insecticide. Sunt folosiți pentru tratarea tumorilor maligne și premaligne. În plus, acești compuși se obțin din materii prime regenerabile și ieftine. În prezent, sunt sintetizați în principal pe cale chimică, cel mai adesea având ca rezultat reacții nespecifice care conduc la oligoacilări sau substituții la poziții nefavorabile, precum și reacții secundare nedorite care conduc la alterarea culorii produșilor [72].

A fost raportată de asemenea sinteza chimică a unor compuși amfifili pornind de la condensarea derivaților izopropilidenici ai xilitolului cu alcani  $\alpha,\omega$ -dibromați sau dimesilați în prezența hidroxidului de potasiu, urmată de deprotejarea selectivă sau totală a grupărilor acetal și chiar derivatizarea în continuare a acestor compuși deprotejați. Alegerea corespunzătoare a metodelor de deprotejare, de esterificare regioselectivă și respectiv de eterificare regiospecifică, a permis modificarea caracterului hidrofil sau lipofil al acestor compuși noi cu proprietăți surfactante [73].

Aplicarea sintezei chimice convenționale a esterilor xilitolului este restricționată deoarece necesită temperaturi, presiuni ridicate și catalizatori acizi corozivi [74]. Biocataliza oferă o alternativă pentru sinteza chimică convențională, deoarece enzimele hidrolitice pot fi utilizate ca și biocatalizatori pentru substituții specifice și transformări complexe ale carbohidraților la o activitate a apei scăzută, fără a fi nevoie de etape de protecție și deprotecție [72]. Astfel a fost raportată sinteza enzimatică a esterilor xilitolului cu acizii grași în mediu de hexan [71], într-un sistem binar format din tert-butanol și piridină [72], precum și fără solvent utilizând Novozyme 435 (lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată pe suport acrilic macroporos). Sistemele fără solvenți oferă unele avantaje, cum ar fi minimizarea efectului asupra mediului înconjurător, eliminarea etapelor de recuperare și

recirculare a solventului, stabilitatea ridicată a enzimei, precum și mai puține etape de purificare [74]. De asemenea, lipaze din diferite surse (*Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Penicillium camembertii* și lipaza din pancreas de porc) immobilizate în prealabil în matrici epoxidice  $\text{SiO}_2$ -alcool polivinilic, au fost testate pentru sinteza monoesterilor xilitolului utilizând ca acil donor acidul oleic. Ultrasonarea și iradierea cu microunde s-au dovedit a fi metode utile și au dus la randamente și viteze de reacție mai ridicate [75]. De asemenea, lauratul, miristatul și palmitatul de xilitol au fost sintetizate în acetonă în stare subcritică utilizând lipaza din *Candida antarctica* B. Miristatul de xilitol a prezentat efect bacteriostatic față de bacteriile termofile [76].

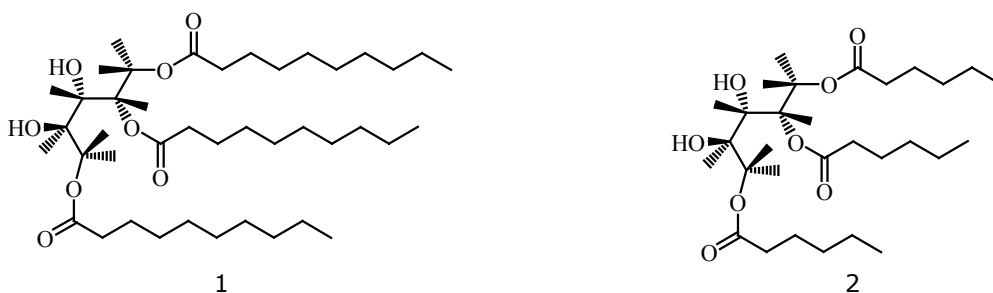


Figura 1.14. Structura 1,2,5-tri-O-capril-xilitolului (1) și a 1,2,5-tri-O-caproil-xilitolului (2).

### 1.3.1.2. Sorbitolul

Sorbitolul aparține grupei de hexitoli naturali. A fost descoperit pentru prima dată în anul 1868 în fructele de frasin și este larg distribuit în floră. Numele de sorbitol derivă din numele științific al frasinului, *Sorbus aucuparia*. Fructele anumitor rozacee cum sunt prunele, perele, piersicile și merele sunt bogate în sorbitol. În fructe și frunze, sorbitolul este format ca un intermediar biochimic în sinteza amidonului, celulozei, sorbozei sau vitaminei C. În organismul animal, sorbitolul poate fi detectat ca intermediar în absorbția glucozei sau formarea fructozei din glucoză.

În 1890, Emil Fischer a efectuat prima sinteză chimică a sorbitolului prin reducerea glucozei cu amalgam de sodiu. Începând cu 1950, sorbitolul a dobândit o importanță economică semnificativă pe plan mondial ca agent de îndulcire, ca stabilizator de umiditate și materie primă pentru alți produși. Sorbitolul formează complecși chelatici cu unii ioni de metale (Fe, Cu, Co și Ni) în soluție apoasă, complecși care sunt stabili în domeniu alcalin. Astfel, sorbitolul inhibă efectul prooxidativ exercitat de urmele de metale în procesele de autooxidare. Sorbitolul nu poate fi fermentat de către drojdii. În soluții apoase foarte concentrate sorbitolul previne creșterea bacteriilor prin osmoză. La concentrații mici, soluțiile de sorbitol servesc ca mediu nutrient pentru bacterii.

*Acetobacter xylinum* oxidează enzimatic sorbitolul cu formarea L-sorbozei (un intermediar în sinteza acidului ascorbic). În mediu acid, la temperaturi ridicate, sorbitolul pierde o moleculă de apă pentru a forma fie 1,4-sorbitan (85%) sau 3,6-sorbitan (15%). La temperatură ridicată, în prezența acidului clorhidric sau sulfuric concentrat, o a doua moleculă de apă este eliminată cu formarea 1,4:3,6-dianhidrosorbitolului (izosorbida) (Figura 1.15).

La păstrarea sorbitolului în soluție apoasă pentru o perioadă mare de timp la 170°C, în condiții de hidrogenare, în prezența unui catalizator ușor alcalin, are loc izomerizarea parțială cu formarea D-manitolului și L-iditolului. Grupările hidroxil ale sorbitolului, sorbitanului și sorbidului pot fi esterificate și eterificate cu acizi grași, reacțiile grupărilor hidroxil primare fiind predominante. Sorbitolul, sorbitanul și produșii parțial esterificați reacționează cu oxidul de etilenă, cu formarea derivaților polioxieterilenici [67].

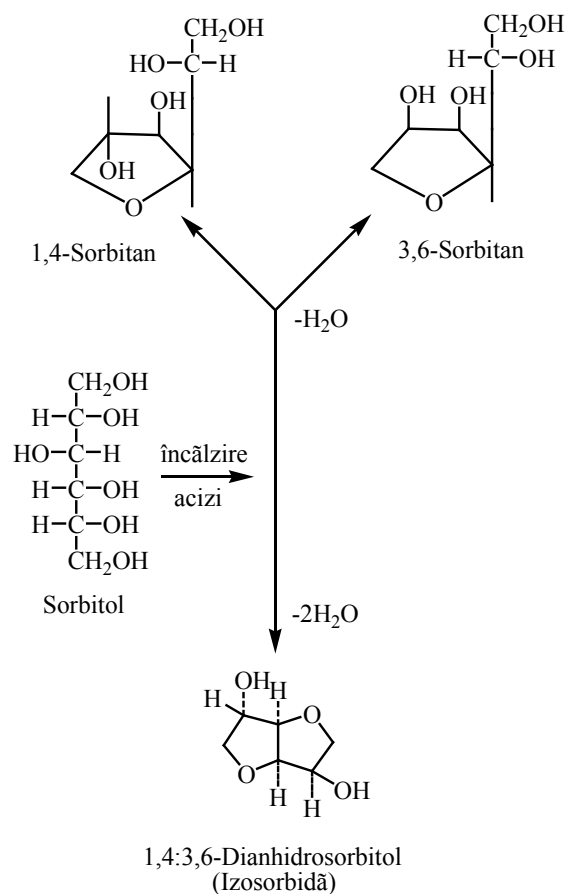


Figura 1.15. Reacția de formare a izosorbidei prin deshidratarea sorbitolului.

Sinteza enzimatică a esterilor sorbitolului cu acizi grași a fost de asemenea studiată. A fost descrisă esterificarea enzimatică catalizată de Lipozyme, a izosorbidei și sorbitolului cu acidul oleic, cu adaos de monooleat de sorbitan pentru mărirea vitezei de reacție [77]. S-a raportat de asemenea esterificarea sorbitolului cu acidul oleic utilizând lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată și a fost investigat efectul anumitor parametri și anume solubilitatea, raportul molar sorbitol/donor acil, stabilitatea enzimei și conținutul de apă. A fost realizată o instalație pilot în care apa formată în timpul reacției a fost îndepărtată în mod eficient prin recircularea mediului de reacție printr-o coloană externă cu site

moleculare. În acest mod au fost obținute randamente de reacție ridicate [78]. Monooleatul de sorbitol a mai fost produs prin cataliză cu Novozyme 435 utilizând substraturile sub formă de topitură și presiune redusă pentru îndepărtarea apei din sistem. Rezultatele au fost comparabile cu cele obținute în solvenți organici, cu sau fără eliminarea apei. Cea mai eficientă metodă a fost cea în care s-au utilizat solvenți organici, cu eliminarea apei prin refluxarea la presiune joasă pe o substanță higroscopică. Acest proces a fost aplicat pentru producerea și caracterizarea unor surfactanți cu natură hidrofilă și hidrofobă diferită [79, 80]. Pentru sinteza esterilor sorbitolului cu acizii grași catalizată de lipaza din *Candida antarctica* B, s-a arătat că formarea unui amestec eutectic este utilă în prepararea unui amestec sorbitol-acid gras cu o concentrație foarte ridicată. În mediu eutectic, moleculele de substrat fiind distribuite omogen, viteza inițială de reacție precum și productivitatea totală au fost îmbunătățite. Amestecuri eutectice omogene de sorbitol și acizi grași C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub> au fost preparate utilizând un amestec adjuvant [81]. Diferite lipaze (*Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, pancreas de porc, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus delemar*) au fost investigate în reacția de esterificare dintre acidul decanoic și sorbitol, lipaza din *Candida rugosa* fiind cea mai activă în acest studiu. Reacția a fost studiată utilizând un sistem bifazic în care solventul polar utilizat a fost apa, faza apoasă fiind reprezentată de o soluție saturată de sorbitol iar faza organică de acidul gras. A mai fost subliniat avantajul utilizării unui reactor cu membrană în comparație cu un reactor cu amestecare, membrana separând cele două faze precum și suportul de imobilizare a enzimei [82].

### 1.3.1.3. Manitolul

D-manitolul este un hexitol derivat din D-manoză. D-manitolul este larg distribuit în natură, în măslini, platani, fructe și vegetale (dovleci, căpșuni, ceapă, țelină). Seva uscată prin încălzirea scoarței frasinului (*Fraxinus ornus* L.) conține 30-50% manitol. Proust a izolat manitolul din acest material, în formă cristalină. Algele marine, în special cele maronii, sunt de asemenea bogate în manitol, conținând 10-20% manitol, în funcție de timpul de recoltare. Un număr mare de ciuperci și bacterii pot produce acest poliol din glucoză, fructoză sau zaharoză.

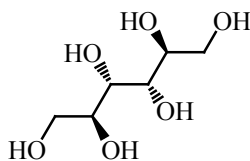


Figura 1.16. Structura moleculară a D-manitolului.

Manitolul formează complecși chelatici cu ionii de metale (Fe, Cu și Ni) în soluție apoasă. Complecșii cu fier prezintă o stabilitate mare. Chiar la temperaturi ridicate de 150- 170°C, manitolul nu reacționează cu proteinele conform reacției Maillard. Nitrarea manitolului cu acid azotic duce la formarea hexanitratului (hexanitromanitol), care este utilizat ca aprinzător pentru detonatoare și fitile electrice. Asemeni altor polialcoolii, la încălzire în prezența acidului sulfuric sau clorhidric concentrat, manitolul eliberează apa cu formarea izomanidei (1,4:3,6-dianhidromanitol). Manitolul nu poate fi fermentat de drojdii. Producerea manitolului prin extracția din plante nu este importantă din punct de vedere economic. Doar în

China, manitolul este obținut prin extracție acidă din alge marine. Manitolul este produs industrial din zaharoză, după inversia la sirop de glucoză-fructoză (1:1), sau din soluție de glucoză, care este de asemenea convertită la sirop de fructoză. Teoretic, dintr-un sirop de glucoză-fructoză (1:1) la pH neutru se formează 25% manitol și 75% sorbitol. Hidrogenarea are loc la presiune ridicată în prezența Ni Raney ca și catalizator. Datorită solubilității scăzute în comparație cu cea a sorbitolului, manitolul este izolat din soluția hidrogenată concentrată prin cristalizare. Filtratul conține încă cantități considerabile de manitol, care pot fi separate cromatografic. Dacă se utilizează zaharoza ca materie primă și hidrogenarea este efectuată în soluție alcalină, manitolul se poate obține cu randament de 31%. Într-o soluție pură de glucoză, D-glucoza poate fi epimerizată la D-manoză înainte de hidrogenare prin adăugarea unei soluții acide de molibdat de amoniu. Manoza este apoi hidrogenată direct la D-manitol. Au fost descrise procese microbiologice pentru producerea directă a manitolului din glucoză sau fructoză. În 1986, izolarea manitolului din siropul de glucoză-fructoză a fost efectuată prin utilizarea manitol dehidrogenazei în locul hidrogenării. Siropul de manitol nu este disponibil comercial datorită tendinței de a cristaliza. Industria farmaceutică este cea mai mare consumatoare de manitol. Datorită reactivității chimice și higroscopicității scăzute, poate fi folosit la fabricarea tabletelor ca excipient dulce inert, potrivit pentru agenți organici și anorganici [67].

Prin esterificarea manitolului cu acizi grași se obțin compuși cu proprietăți surfactante care pot fi utilizați ca aditivi în industria alimentară și farmaceutică. Prin esterificarea manitolului cu acidul oleic s-a obținut un amestec de produși, printre care un oleat de oligozaharidă care poate fi utilizat ca emulgator la prepararea vaccinurilor [83]. 1-O-lauril-D-manitolul, un surfactant neionic, a fost sintetizat printr-o metodă chemoenzimatică pornind de la 1,2:4,5-di-O-izopropiliden-D-manitol și laurat de vinil ca agent de acilare. Hidrofobicitatea ridicată a substraturilor a permis efectuarea reacției enzimatică în mediu de n-hexan, sau fără utilizarea unui solvent. Lipaza din *Candida antarctica* B a fost utilizată ca și catalizator. Această lipază acționează diferit în funcție de poziția grupărilor hidroxil față de grupările izopropilidenice. Hidroliza selectivă a grupărilor izopropilidenice a dus la obținerea surfactanților neionici fără prezența izomerilor [84]. Sinteza 1-O-lauril-D-manitolului și 1,6-di-O-lauril-D-manitolului, pornind de la laurat de vinil și derivați de manitol având două dintre cele șase grupări hidroxil protejate cu grupări izopropilidenice, urmată de hidroliza selectivă a grupării izopropilidenice, a fost de asemenea realizată cu lipaze imobilizate comercial (Novozyme 435, lipaza din *Candida antarctica* B și Lipozyme RMIM, lipaza din *Rhizomucor miehei*) precum și lipaze imobilizate prin adsorbție pe Acurell MP1004 (lipaza din *Mucor Javanicus*, *Aspergillus niger* și *Penicillium roqueforti*). Lipaza Novozyme 435 a dus la cele mai mari conversii, în timpul de reacție cel mai scurt [85].

A fost descrisă și prepararea unor derivați sulfonați ai manitolului, cum sunt 1,2:3,4-di-O-izopropiliden-3,4-di-O-p-toluensulfonat-D-manitol; 1,2:3,4-di-O-izopropiliden-3,4-di-O-metansulfonat-D-manitol; 1,2:3,4-di-O-izopropiliden-3,4-di-O-trifluorometansulfonat-D-manitol. Asemenea intermediari sulfonați la centrii chirali neprotejați sunt compuși care conțin grupări ușor de îndepărtat, pentru a se obține ulterior liganzi chirali valoroși [86].

#### 1.3.1.4. Lactitolul

Lactitolul (4-O-β-D-galactopiranozil-sorbitol, 4-O-β-D-galactopiranozil-glucitol) a fost descris pentru prima dată de Sendrens în anul 1920.

A fost produs de Karrer și Buchi în 1936 prin reducerea lactozei. În prezent, lactitolul este preparat comercial din lactoză pură, prin hidrogenare în fază lichidă sau în pat fix cu Ni Raney ca și catalizator, în proces continuu sau discontinuu. Condițiile de operare includ 40 – 50% soluție apoasă neutră, temperaturi de aproximativ 100°C și presiune  $\geq$  40 bari. Apoi catalizatorul este separat iar soluția hidrogenată este purificată prin deionizarea completă cu un schimbător de ioni. După evaporarea cu efect multiplu a siropului purificat la un conținut de 75% solid, lactitolul este izolat prin cristalizare la rece. În funcție de condițiile de cristalizare, lactitolul cristalizează sub formă de mono- sau dihidrat, sau chiar trihidrat. Lactitolul anhidru cristalin poate fi obținut numai din soluții etanoliche. Prin încălzirea lactitolului la 170 – 240°C, acesta este transformat parțial în derivați anhidricați (lactitan), sorbitol și zaharuri cu molecule mai mici. Formarea lactitanului este accelerată în mediu acid (de exemplu cu acid p-toluensulfonic). Deoarece molecula de lactitol nu conține grupare carbonil, stabilitatea chimică a acesteia este mai mare decât a dizaharidului corespunzător și anume lactoza. De asemenea stabilitatea sa în mediu alcalin este mai mare decât cea a lactozei. O soluție de 10% lactitol, ajustată la pH 13 cu soluție de hidroxid de sodiu, poate fi încălzită la 100°C timp de o oră fără apariția decolorării. Stabilitatea lactitolului în mediu acid este similară cu cea a lactozei. La încălzirea unei soluții de 10% lactitol la 100°C timp de 4 ore la pH 1 sau 2, aproximativ 5,6% respectiv 1,4% din lactitol este hidrolizat. În aceste condiții nu apare decolorarea.

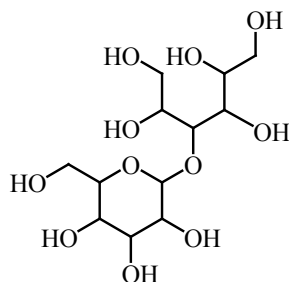


Figura 1.17. Structura chimică a lactitolului.

Cele nouă grupări hidroxil ale lactitolului pot fi esterificate cu acizi grași. Hidroliza enzimatică a lactitolului de către  $\beta$ -galactozidaze a fost studiată de Karrer și Buchi. Au descoperit că hidroliza lactitolului este foarte dificilă. Acțiunea  $\beta$ -glucozidazelor are ca rezultat și formarea de oligozaharide. Lactitolul se utilizează în principal la fabricarea ciocolatei, gumei de mestecat, bomboanelor, jeleurilor de fructe, drajeurilor, înghețatei și gemurilor [67].

Esterificarea lactitolului cu acizi grași duce la obținerea unor compuși cu proprietăți de emulsifiere și detergente. Palmitatul de lactitol a fost obținut prin esterificarea directă cu acizii grași ai grăsimilor comestibile astfel încât formarea anhidropoliolilor să fie minimizată [87]. Lactitolul a fost transesterificat cu succes cu o serie de esteri metilici alifatici utilizând catalizator alcalin la 90°C. În acest mod au fost obținuți lauratul, palmitatul și stearatul de lactitol. Aceștia au demonstrat proprietăți detergente și de emulsifiere comparabile cu cele ale derivaților de lactoză [88]. Un alt mod de a obține derivați de lactitol cu proprietăți surfactante îmbunătățite este oxialchilarea cu oxid de propilenă sau etilenă urmată de transesterificarea eter-alcoolilor obținuți cu o serie de esteri de acizi grași în scopul

producerii eteri-esterilor lactitolului cu catenă lungă. Acești compuși au solubilitate mai ridicată în apă în comparație cu derivații de lactitol preparați prin transesterificarea directă [89]. Prin esterificarea directă a lactitolului și lactitolului propoxilat cu acizi grași cu catenă lungă s-au obținut stearatul de lactitol, palmitatul de lactitol și esterii propoxilați corespunzători. Toți esterii au demonstrat proprietăți surfactante excepționale. Esterii propoxilați au arătat proprietăți de dispersie și detergente superioare celor ale esterilor de lactitol convenționali. Stabilitatea emulsiilor formate cu toți acești produși a fost mai mare decât a monolauratului de sorbitan, care este un emulgator și stabilizator disponibil comercial [90].

### 1.3.1.5. Maltitolul

Maltitolul (4-*O*- $\alpha$ -D-glucopiranozil-D-sorbitol, 4-*O*- $\alpha$ -D-glucopiranozil-D-glucitol) este produs din siropuri cu conținut ridicat de maltoză și glucoză, din care maltoza pură este obținută prin separare cromatografică cu rășini schimbătoare de ioni.

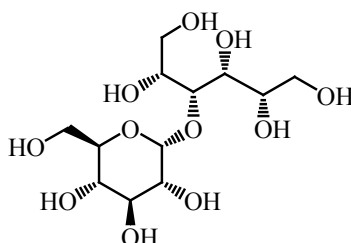


Figura 1.18. Structura chimică a maltitolului.

Aplicațiile maltitolului corespund în principal celor ale zaharurilor. Oricum, higroscopicitatea sa și capacitatea de îmbrunare sau dezvoltare a aromelor sunt diferite. Maltitolul poate fi utilizat la fabricarea ciocolatei, caramelului, gumei de mestecat, gemurilor, înghețatei, etc. [67].

Derivați ai maltitolului, cum sunt 3-*allo*-maltitolul și galactomaltitolul, au fost sintetizați prin tratarea derivaților metansulfonilați ai benzil  $\beta$ -maltozidei cu benzoat de sodiu, urmată de îndepărtarea grupărilor protectoare și reducerea cu borohidruură de sodiu. Evaluarea senzorială a maltitolului și derivaților acestuia a dezvăluit faptul că în generarea gustului dulce este implicat capătul reducător, iar legătura de hidrogen intramoleculară guvernează accesarea situsului receptor gustativ de către această clasă de polioli cu proprietăți de îndulcire [91].

A fost raportată sinteza enzimatică a esterilor maltitolului cu acid lauric și acid palmitic utilizând Novozyme 435 ca și catalizator, studiindu-se efectul raportului molar maltitol/acid gras, timpului de reacție, cantității de acetonă ca mediu de reacție și cantității de enzimă, asupra conversiei [92]. Au fost de asemenea sintetizați noi polimeri glicoconjugați utilizând o metodă chemoenzimatică și anume esterificarea maltitolului cu esterul divinilic al acidului decandioic, catalizată de lipaze, cu formarea esterilor vinilici ai maltitolului. Acești esteri au fost transformați prin polimerizare în polimeri glicoconjugați ai derivaților de polivinilalcooli utilizând ca inițiator acidul L-ascorbic. Polimerii glicoconjugați au demonstrat interacțiuni puternice cu lectinele și cu hepatocitele [93].

### 1.3.2. Alchil glicozidele

Primele sinteze de alchil poliglicozide au fost efectuate cu 100 de ani în urmă. În cursul dezvoltărilor ulterioare, reacția glucozei cu alcoolii a fost aplicată alcoolilor cu lanț lung ( $C_8$  până la  $C_{16}$ ), formându-se un amestec complex de alchil mono-, di-, tri- și oligoglicozide ca amestec de  $\alpha$ - și  $\beta$ -anomeri (Figura 1.19). Astfel, producții industriale se numesc alchil poliglicozide și sunt caracterizați prin lungimea lanțului alchil și prin numărul mediu de unități de glucoză atașate – gradul de polimerizare [94]. În literatură este descrisă de asemenea eterificarea zaharozei cu 1,2-epoxidodecan cu diferite amine terțiare ca și catalizatori. Adiția reversibilă a aminelor terțiare pe epoxid a dus la formarea unei sări de amoniu cuaternară puternic bazică, responsabilă de activitatea catalitică. Un nou proces catalitic heterogen eficient a fost dezvoltat și are la bază utilizarea rășinilor schimbătoare de anioni bazice ca și catalizatori [95]. Eterificarea directă a zaharozei, trehalozei și izomaltozei cu 1,2-epoxidodecan a fost de asemenea studiată. A fost investigată activitatea catalitică a diferiți catalizatori solizi bazici cu proprietăți superficiale hidrofile-lipofile diferite [96].

Deoarece alchil poliglicozidele sunt disponibile în cantități suficiente, utilizarea lor ca materii prime pentru dezvoltarea unor surfactanți speciali a dobândit un interes considerabil.

În prezent, derivatizarea alchil poliglicozidelor este studiată în vederea modificării proprietăților surfactante. O varietate mare de derivați de alchil poliglicozide poate fi obținută folosind metode relativ simple, cum este substituția nucleofilă. În afară de esteri sau compuși etoxilați, se mai pot sintetiza produși ionici, cum ar fi sulfați sau fosfați (Figura 1.20). Până în prezent există doar câteva produse lansate pe piață: esterii metilici ai glucozidelor și derivații anionici ai alchil poliglicozidelor. De asemenea, esterificarea metil glucozidei (obținută din amidon sau din glucoză și metanol) cu esteri metilici ai acidului stearic sau oleic duce la producții doriți (Figura 1.21). Prin etoxilarea ulterioară se obțin polietilenglicol metil glucozidele respective.

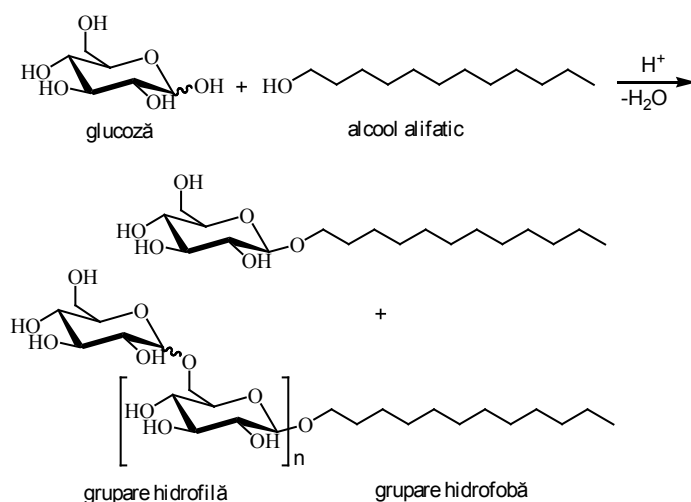


Figura 1.19. Sinteza alchil glicozidelor prin acetalizarea glucozei cu un alcool alifatic în cataliză acidă.



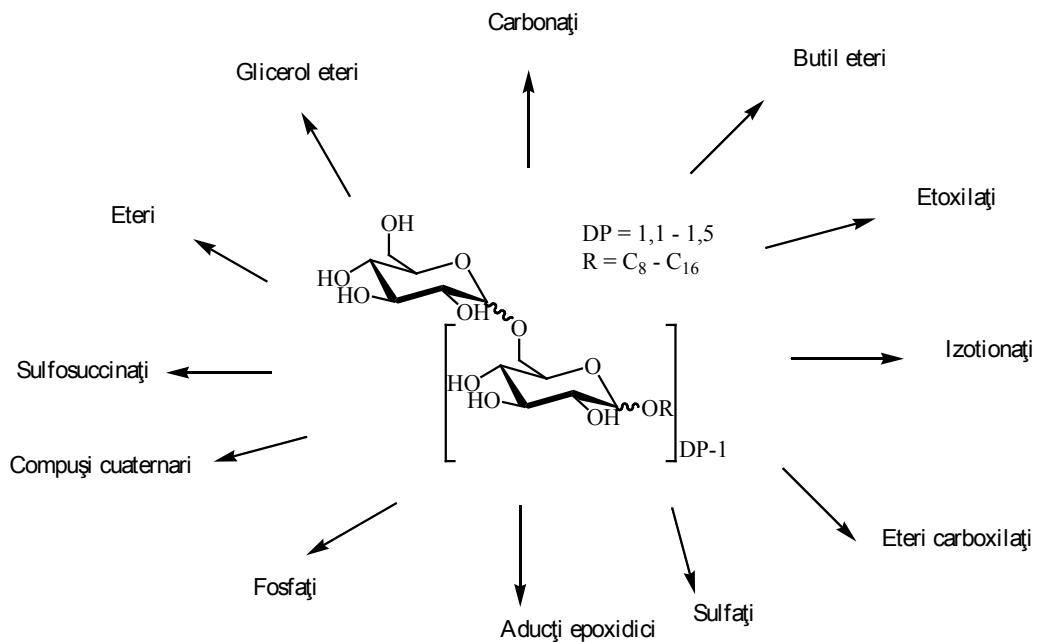


Figura 1.20. Derivați de alchil poliglicozide.

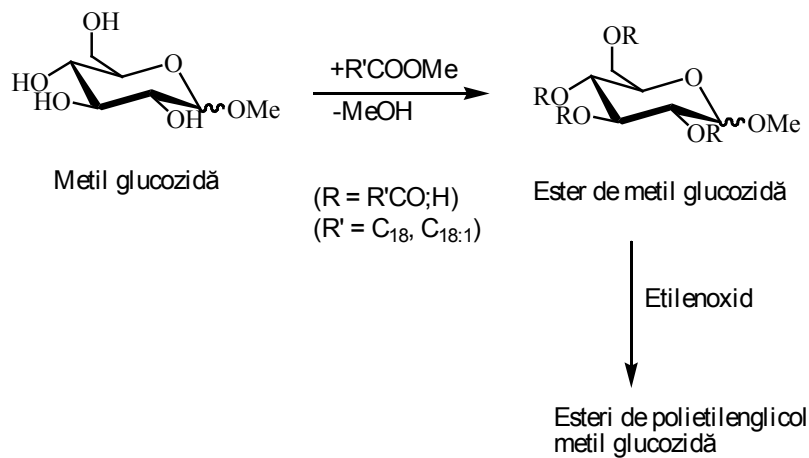


Figura 1.21. Sinteza esterilor metilici ai glucozidei prin transesterificarea metil glucozidei cu esterii metilici ai acizilor grași (R'COOMe) în cataliză bazică cu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> la 120°C-160°C.

Datorită caracterului lor relativ lipofil, esterii metilici ai glucozidei sunt greu solubili în apă, în contrast cu alchil poliglicozidele având aceeași lungime a lanțului hidrofoab, dar prezintă proprietăți de emulsifiere excelente. Aceștia sunt folosiți ca agenți emolienți, de hidratare și de emulsifiere, precum și ca agenți de îngroșare în cosmetice. Pentru a ajusta proprietățile reologice și a obține un comportament de emulsifiere apă/ulei specific se pot varia lungimea hidrocarbunii și gradul de

substituție. Piața totală pentru acești produși, incluzându-i și pe cei etoxilați, este estimată la o valoare apropiată 10.000 t/an [94].

$\beta$ -galactozidaza a fost utilizată pentru obținerea alchilglicozidelor în 40% DMF sau acetonitril, sau în sistem bifazic în care alcoolul are rol de solvent organic. După obținerea alchilglicozidelor, etapa următoare de esterificare nu este împiedicată de solubilitatea scăzută a zaharurilor în solvenții organici deoarece alchilglicozidele sunt solubile în mediu organic [64]. A fost descrisă dezvoltarea unei proceduri simple, utilizând regioselectivitatea lipazelor, care ar permite producția comercială în cantități mari a esterilor etilglucozidei cu acizi grași. Producții prezintă proprietăți diferite de cele ale surfactanților neionici petrochimici în ceea ce privește structura și puritatea [97]. Esterii aromatici de alchilglucozide se găsesc în natură în familia *Salicaceae* și sunt cunoscuți pentru activitatea lor antimicrobiană și antivirală. Ei sunt folosiți pentru tratarea migrenelor, febrei și reumatismului. Alcoolii, fenolii și mercaptanii există în plante, în principal, sub forma glicozidelor acestora și sub această formă sunt precursori pentru compuşii de aromă. Anumite glicozide, de asemenea, prezintă activitate antimicrobiană [98].

#### 1.4. Utilizarea lipazelor în chimia carbohidraților

Enzimele au atras o atenție deosebită ca și catalizatori pentru sinteza chimicalelor și furnizează o cale unică pentru sinteza biosurfactanților [99, 100]. Enzimele sunt adaptate în mod natural pentru a procesa materiile prime regenerabile, iar caracteristicile lor de prim interes pentru sinteza chimică sunt abilitatea de a cataliza o varietate mare de reacții, selectivitatea lor unică și specificitatea. Selectivitatea este recunoscută la trei nivele: chemo-, regio- și enantioselectivitate. Aceasta implică faptul că reacțiile care sunt dificil de realizat pe calea chimică clasică sau procesele care necesită mai multe etape chimice sunt facilitate prin biocataliză. Mai mult, selectivitatea ridicată a proceselor enzimatice are ca rezultat reducerea cantităților de produși secundari, ceea ce facilitează purificarea produsului și prin urmare are loc creșterea randamentului total al procesului. De asemenea, utilizarea substanțelor chimice toxice necesare pentru protecția/deprotecția grupelor funcționale este adesea evitată. Un alt avantaj important al biocatalizei este eficiența energetică ridicată, datorită abilității enzimelor de a cataliza reacțiile în condiții blânde de temperatură și presiune în comparație cu procesele chimice. O limitare majoră a aplicării enzimelor o constituie faptul că acestea sunt molecule fragile și sunt sensibile la condițiile dure de mediu. Sintezele chimice implică în mod invariabil un mediu organic pentru solubilizarea reactanților și produșilor și pentru deplasarea echilibrului de reacție în sensul formării produsului. Dezvoltările din enzimologia neapoasă din ultimii ani au arătat în mod cert faptul că enzimele prezintă activitate catalitică în mediu cu conținut scăzut de apă, iar diferiți solvenți organici pot chiar altera selectivitatea acestora [101]. Enzimele hidrolitice pot realiza sinteza în condițiile în care apa este îndepărtată din sistem. Conținutul de apă necesar pentru activitatea optimă variază pentru diferite enzime [102]. Solventul influențează viteza reacției enzimatice prin solvatarea diferită a substratului și prin interacțiunea directă cu enzima. În general, solvenții hidrofobi inactivează enzimele mai puțin decât cei hidrofili, dar există și excepții [103].

În scopul utilizării lor în mediu organic, enzimele necesită imobilizarea pe un suport solid sau prin înrețelare, pentru a evita formarea de agregate [104]. Deși mare parte a cercetărilor în domeniu au implicat utilizarea solvenților organici

pentru a crește solubilitatea reactanților și produșilor, tendința actuală este de a dezvolta procese fără solvent, deoarece acestea sunt mai sigure, mai blânde cu mediul înconjurător și, în consecință, mai atractive pentru aplicații industriale [105].

Biotehnologia modernă a furnizat instrumente pentru accesarea și dezvoltarea unor biocatalizatori noi cu caracteristici dorite pentru aplicațiile de interes. Noi biocatalizatori pot fi accesați direct din probele de ADN din mediul înconjurător fără a fi nevoie de izolarea microorganismului. Evoluția enzimelor este de asemenea posibilă *in vitro*, prin modificarea compoziției de aminoacizi a enzimei prin mutație într-un mod rațional sau aleator. Această metodă a furnizat enzime cu termostabilitate îmbunătățită, stabilitate ridicată în solvenți organici și specificitate modificată [106].

Biocataliza a fost utilizată pentru sinteza surfactanților cu diferite grupări hidrofile, care sunt legate de lanțul alifatic hidrofob printr-o legătură esterică, amidică sau glicozidică. Printre parametrii cei mai importanți în sinteza enzimatică se numără diferența de solubilitate dintre reactantul hidrofil și cel hidrofob. Utilizarea solvenților hidrofilii pentru creșterea solubilității componentelor hidrofiele duce la creșterea toxicității mediului, afectând activitatea enzimatică. O alternativă o constituie modificarea părții hidrofiele, în scopul creșterii solubilității acesteia în componentul hidrofob. Solubilitatea poate fi îmbunătățită de asemenea prin creșterea temperaturii, scop pentru care este benefică utilizarea enzimelor termostabile.

Potențialul sintetic al lipazelor este foarte vast deoarece acestea, în comparație cu majoritatea enzimelor, pot să accepte o gamă largă de substraturi, sunt stabile în solvenți organici neapoși și pot fi aplicate în reacții de hidroliză sau în sinteza esterilor, prin alegerea unui solvent adecvat. În plus, lipazele pot transforma o serie largă de substraturi diferite de trigliceride, cum ar fi esteri alifatici, aliciclici, biciclici și aromatici chiar și cu esteri pe bază de amestecuri de compuși organometalici. În cazul substraturilor de tipul esterilor racemici sau al celor cu mai multe grupări hidroxil, lipazele reacționează cu enantio- și regioselectivitate mare. Acil-enzima care intermediază reacțiile catalizate de lipaze nu se formează numai din esteri carboxilici, ci și dintr-o gamă largă de alte substraturi cum ar fi tioesteri sau amine activate, care extind considerabil potențialul sintetic al lipazelor. În prezent, este posibilă alegerea lipazei dorite dintr-o varietate mare de preparate comerciale disponibile sau chiar explorarea diferitelor lipaze și esteraze care sunt disponibile comercial sub formă de kituri [107]. Modificarea lipazelor în vederea utilizării lor practice este extensiv descrisă în literatură [108].

În mod normal, lipazele prezintă activitate catalitică ridicată chiar în medii cu conținut scăzut de apă, ceea ce face posibilă îndepărtarea apei în mod eficient, fără efecte negative asupra reacției enzimatică. Pentru a găsi un solvent care să dizolve în mod eficient atât un acid gras cât și un zahăr, o metodă eficientă s-a dovedit a fi modificarea reversibilă a zahărului, pentru a-i crește hidrofobicitatea și astfel similaritatea cu acidul gras. Unele dintre grupările hidroxilice secundare ale glucozei pot fi derivatizate cu un reactiv hidrofob, lăsând gruparea hidroxil primară liberă să reacționeze cu acidul gras în reacția enzimatică catalizată de lipaze. O astfel de metodă este utilizarea acetalilor care, fiind miscibili cu acidul gras, fac posibilă sinteza esterilor fără adaos de solvent. Gruparea acetal poate fi ușor îndepărtată prin cataliză acidă după etapa enzimatică. O metodă alternativă este utilizarea unui complex reversibil format între zahăr și un derivat de acid boronic hidrofob. Formarea complexului cu acid fenilboronic a fost utilizată pentru solubilizarea fructozei în hexan, urmată de esterificarea sa catalizată de lipaze. Este important faptul că lipazele sunt capabile să accepte acetali și derivați de acid

boronic, deși aceștia sunt substraturi destul de voluminoase. Printre lipazele utilizate frecvent se numără cele din *Rhizomucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas* și *Candida antarctica* [109, 110].

O altă metodă de a crește solubilitatea zaharului în mediul hidrofob este aceea de a-l transforma în alchilglicozidă. După acilarea enzimatică, esterul de alchilglicozidă rezultat poate fi un surfactant util. Această metodă s-a dovedit eficientă chiar și la folosirea unor alcooli cu catenă relativ scurtă (cum este etanolul) pentru obținerea glicozidei [111]. Este posibilă obținerea unor randamente mari în sisteme fără solvenți, pornind de la un monozaharid în etapa de alchilare urmată de etapa de acilare în care se obține esterul alchilglicozidic. Etapa de alchilare este favorizată de utilizarea unor alcooli cu catenă scurtă, în special butanol [112]. Cele mai multe studii privind sinteza enzimatică a esterilor de zaharuri s-au concentrat pe esterificarea monozaharidelor, deoarece problema solubilității scăzute a substraturilor crește semnificativ cu creșterea dimensiunii zaharului. Oricum, prin alegerea potrivită a condițiilor de reacție s-a dovedit posibilă acilarea eficientă a unor di- și trizaharide. Amestecurile de 2-metil-2-butanol și dimetilsulfoxid au fost utilizate în combinație cu esteri vinilici ( $C_8$ - $C_{18}$ ) pentru a face posibilă acilarea eficientă a maltozei, maltotriozei și leucozei [113].

Lichidele ionice constituie solvenți neapoși promițători pentru dizolvarea zaharurilor și au fost folosite în diferite studii de sinteză enzimatică a esterilor de zaharuri. Lipaza din *Candida antarctica* B a fost cea mai eficientă enzimă pentru sinteza esterilor glucozei în sisteme bifazice conținând lichid ionic și terț-butanol [13]. Recent, utilizarea soluțiilor suprasaturate de zahar și a tratamentelor cu ultrasunete au fost raportate pentru a face sinteza esterilor de zaharuri în lichide ionice și mai eficientă [114]. O conversie enzimatică eficientă poate fi obținută chiar dacă majoritatea reactanților sunt prezenți în stare solidă. Această metodă a fost folosită cu succes la sinteza enzimatică a esterilor de glucoză cu acizi grași ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ). Este important faptul că substraturile se dizolvă pe parcursul reacției și deseori producții precipită în timp ce se formează, ceea ce poate fi un avantaj datorită unui efect favorabil asupra poziției de echilibru. Lipaza din *Candida antarctica* B este un catalizator eficient în acest sistem și solvenții utilizați (în cantități moderate) includ metil etil cetona, acetona sau dioxanul. În scopul creșterii randamentului de ester, apa formată în reacție poate fi îndepărtată prin distilare azeotropă, iar solventul (de exemplu metil etil cetona) poate fi eliminat după condensare prin pervaporare [115]. De asemenea, lipaza din *Candida antarctica* B a catalizat acilarea regioselectivă, la gruparea hidroxil primară, a  $\beta$ -D-(+)-glucozei și a diferitelor glucozide cu o varietate de acizi carboxilici arilalifatici neactivați pentru obținerea esterilor cu activitate de suprafață ridicată și solubilitate mare în apă, în vederea utilizării ca agenți de udare și emulgatori pentru emulsiile apă-ulei [116]. În mod similar, lipazele au fost folosite în mediu fără solvent pentru producerea surfactanților de tipul esterilor de zaharuri cu acizi grași omega-3 și omega-6 polinesaturați [117, 109]. În concordanță cu structura ei, lipaza din *Candida antarctica* B prezintă o selectivitate de substrat foarte ridicată, atât în ce privește regioselectivitatea cât și enantioselectivitatea. Lipaza din *Candida antarctica* B a fost utilizată intensiv ca și catalizator pentru acilarea regioselectivă a diferiți carbohidrați. O lucrare în acest domeniu descrie acilarea regioselectivă catalizată de lipaza din CalB la poziția 6 a etilglucozidei. Acilarea înalt selectivă a grupării hidroxil primare din carbohidrat este oarecum surprinzătoare pentru lipaza din *Candida antarctica* B, în contrast cu alte lipaze testate în același condiții, care au avut rezultate mai slabe și nu au prezentat selectivitate pentru gruparea hidroxil primară. În consecință acilarea înalt selectivă în poziția 6 este mai degrabă o funcție a spațiului limitat

disponibil din centrul activ al enzimei, decât o specificitate generală a lipazei pentru grupările hidroxil primare. Utilizarea lipazei din *Candida antarctica* B ca și catalizator regioselectiv a fost aplicată cu succes și la alți carbohidrați, utilizând diferiți solvenți și donori de acil. Regio-selectivitatea lipazei din *Candida antarctica* B a fost utilizată de asemenea în dezacilarea selectivă a diferiților esteri ai glucozei. Utilizând pentaacetat de  $\alpha$ -D-glucoză ca și substrat s-a constatat hidroliza selectivă în poziția 6-O. Surprinzător, pentaacetatul de  $\beta$ -D-glucoză a fost hidrolizat selectiv în poziția 1-O. Alți  $\beta$ -1-O esteri cu lanț mai scurt au fost de asemenea hidrolizați eficient, în timp ce esterii acidului octanoic sau alți esteri ai unor acizi grași cu lanț mai mare nu au fost transformați, probabil pentru că sunt prea voluminoși și accesul la centrul activ al enzimei este blocat. Cu toate că monoesterii carbohidraților au reprezentat până acum cel mai mare grup de compuși care a fost studiat folosind lipaza din CalB ca și catalizator regioselectiv, s-au înregistrat progrese și cu alți polihidroxi. S-au obținut rezultate bune de asemenea și cu nucleozide și diferiți steroizi și glucozid-steroidi, care au fost acilați selectiv ducând la obținerea de compuși puri utilizați în studii biologice și medicale [6].

Lipazele pot accepta o varietate foarte mare de nucleofili pentru dezacilarea intermediarilor acil-enzimă și utilizând condiții de reacție optime a fost posibilă acilarea eficientă a unui număr mare de carbohidrați (Tabelul 1.1). Producții principale sunt cei obținuți prin esterificarea grupării hidroxil primare. În cazul carbohidraților cu mai multe grupări hidroxil primare, enzima poate acila selectiv, în unele cazuri, una dintre acestea (cazul maltozei), în timp ce în alte cazuri se obțin amestecuri de produși (cazul fructozei). În anumite situații (exemplul zaharozei) se poate obține acilarea la diferite poziții, prin alegerea potrivită a enzimei. Majoritatea esterilor de carbohidrați obținuți au fost preparați plecând de la monozaharide.

Datorită miscibilității insuficiente a substraturilor, dificultatea sintezei crește cu creșterea lanțului hidrofob, dar mai ales a lanțului hidrofil al substraturilor. Există totuși câteva exemple de acilare a di-, tri- și polizaharidelor. Un alt grup de compuși polari înrudiți care pot fi acilați pe cale enzimatică cu formare de surfactanți sunt alditolii, de exemplu sorbitolul. Au fost obținute amestecuri cu conținut diferit de mono-, di- și triesteri. Randamente mari și regioselectivitate ridicată au fost obținute în sinteza esterilor de zaharuri cu acizi grași alifatici cu lanț mare de atomi de carbon, catalizată de lipaze [24].

Tabelul 1.1. Esteri de zaharuri sintetizați pe cale enzimatică.

Carbohidrat	Donor acil	Produși principali	Enzimă	Ref.
D-glucoză	Acid octanoic	6-O-octanoil-D-glucoza	<i>C. antarctica</i>	5
	Acid C12-C18	6-O-acil-D-glucoza		13
	Acetat de vinil	6-O-acetilglucopiranozida	Lipaza din pancreas de porc	3
	Acid stearic	monostearat de glucoză	<i>Lipozyme TM 20</i>	
	Acid palmitic	6-O-palmitoil-D-glucopiranoza	<i>Novozyme SP435</i>	
	Acid miristic	Miristat de glucoză		118
	Metacrilat de metil	Metacrilat de glucoză	<i>Lipozyme IM 20</i>	3
	L-alanina	Monoesteri		
D-fructoză	Acid palmitic	Monoesteri de fructoză	<i>Pseudomonas sp.</i>	3
		Monopalmitat de fructoza	<i>Lipozyme IM 20</i>	
		6-O-palmitoil-fructoza	<i>Novozyme SP435</i>	
	Acid miristic	Miristat de fructoză		
	Acetat de vinil	1-O-acetilfructozida	Lipaza din pancreas de porc	
	Acid stearic	monostearat de fructoză	<i>Lipozyme SP382</i>	
			<i>Lipozyme IM60</i>	
	Acid oleic	Monostearat de fructoză	<i>Lipozyme</i>	
	Acid linoleic	Oleat de fructoză	<i>Lipaza NTG</i>	
Esteri vinilici	Amestecuri de esteri	<i>Lipaza AK</i>		
L-alanina	1-O-lauril-fructoza	<i>Lipozyme IM 20</i>		
D-galactoză	Acid palmitic	6-O-palmitoil-D-galactoza	<i>Pseudomonas sp.</i>	15
			<i>Novozyme SP435</i>	3
	L-alanina	Monoesteri	<i>Lipozyme IM 20</i>	
D-xiloză	Acid palmitic	5-O-acil-D-xiloză	<i>Pseudomonas sp.</i>	15
Etil glucozidă	Acid C8-C18	6-O-monoester	<i>C. antarctica</i>	6
Sorbitol	Acid oleic	Monooleat de sorbitol	<i>Novozyme 435</i>	78
				79
				80
Maltoză	Laurat de vinil	Laurat de maltoză	<i>T. lanuginosus</i>	1
	Acid capronic	6-O-caproil-maltoza	<i>Novozyme SP435</i>	17
Lactoza	Laurat de vinil	Monolaurat de lactoză	<i>P. cepacia,</i> <i>M. miehei,</i> <i>T. lanuginosus</i>	44
Zaharoză	2,2,2-trifluoroetilbutirat	1-O-monobutiril-zaharoza	<i>Bioenzyme 240</i>	3
	Acid miristic	Miristat de zaharoză	<i>Novozyme SP435</i>	
	Laurat de vinil	Laurat de zaharoză	<i>T. lanuginosus</i> <i>H. lanuginosa</i>	1 119

Fezabilitatea tehnică a utilizării enzimelor ca biocatalizatori în sinteza anumitor molecule organice complexe este bine stabilită. Din punct de vedere economic, această metodă este puțin probabil a fi viabilă pentru producerea surfactanților cu preț scăzut, dar poate constitui o opțiune pentru sinteza surfactanților cu valoare mare pentru aplicații alimentare, agricole și medicale [120].

### 1.5. Esterii aromatici ai zaharurilor și derivaților acestora

Acizii aromatici, care joacă un rol important în metabolismul plantelor, se găsesc în natură, în mod frecvent, sub forma esterilor cu alcooli polihidrici și carbohidrați [121]. Semințele de floarea soarelui conțin cantități semnificative de compuși fenolici, cum sunt derivații acizilor p-cumaric, izoferulic, sinapic precum și esterii ai zaharurilor cu acidul hidroxicinamic [122]. Din semințele de rapiță au fost izolați și identificați esterii cu glucoza (1,6-di-O-sinapoil-glucoza), esterii cu gentiobioza (1-O-cafeoil-gentiobioza și 1,2,6'-tri-O-sinapoil-gentiobioza) precum și 4'-(6-O-sinapoil-glucoza)-3,7-di-O-glucozida și 3-O-soforozid-7-O-(2-O-sinapoil-glucozida) [123]. În plante, carbohidrații se găsesc sub forma esterilor lor cu acidul ferulic și cu acidul p-cumaric [124]. În arabinoxilani acidul ferulic este legat printr-o legătură esterică cu gruparea hidroxil din poziția 5 a arabinofuranozidei. Din orz au fost izolați și esterii ai acidului p-cumaric și s-a estimat că la fiecare 15 unități de arabinoză, o unitate este esterificată cu acidul ferulic și la fiecare 31 unități, o unitate este esterificată cu acidul p-cumaric. Polizaharide feruloilate au fost identificate în spanac și sfecla de zahăr. În ambele cazuri acidul ferulic este esterificat cu arabinoza și galactoza din pectine [125]. De asemenea oligozaharide feruloilate au fost identificate ca și constituenți ai heteroxilanilor în tărâțele de porumb [126].

S-a arătat că esterii aromatici de zaharuri prezintă activitate antitumorală și pot fi folosiți ca agenți antiinflamatori și anticancerigeni [127]. Este cunoscut faptul că acizii fenolici și esterii acestora prezintă activitate antioxidantă și sunt inhibitori de carcinogeneză. Mai mult, esterii zaharurilor cu diferiți acizi fenolici, izolați din plante sau sintetizați sub forma esterilor fenolici de alchilglucozide, sunt compuși activi din punct de vedere farmaceutic cu acțiune antimicrobiană, antivirală, antiinflamatoare și antitumorală demonstrată [128 - 130]. Combinând esterii aromatici de glucoză și glicozidele fenolice s-au obținut noi esterii aromatici de arilglucozide cu activitate farmaceutică [131]. Esterii fenilici ai acidului cafeic și ferulic sunt prezenți în propolis și sunt utilizați de secole în medicina tradițională ca agenți antiinflamatori. Acești esterii de acizi hidroxicinamici lipofili au demonstrat activitate biologică însemnată [130].

În ultimii ani a crescut interesul pentru dezvoltarea antioxidantilor naturali, aceștia fiind considerați inofensivi în comparație cu cei sintetici [132]. Activitatea antioxidantă a feruloilarabinozei, o substanță model a fragmentelor pereților celulari ai cerealelor, în sistemele de autooxidare a lipoproteinelor cu densitate mică și absorbția sa au fost studiate și s-a arătat că esterii acidului ferulic au un efect pozitiv [133]. Compușii fenolici din anumite extracte vegetale au demonstrat o capacitate mare de a capta radicalii de oxigen și de a inhiba oxidarea și creșterea bacteriilor patogene [134]. Acești compuși sunt parțial solubili în apă și prezintă proprietăți antioxidante naturale [135].

Utilizarea esterilor naturali ai acizilor aromatici cu polioli este restricționată de disponibilitatea lor redusă, drept consecință a dificultății de izolare a acestora din plante și complexității sintezei lor (necesitatea utilizării grupărilor protective) cât și a formării produșilor secundari atunci când se utilizează acid clorhidric și anhidride [121]. Sinteza chimică a esterilor acizilor fenolici este dificilă și datorită sensibilității termice și posibilității de oxidare în anumite condiții de pH a acizilor fenolici [135].

Pe cale chimică, au fost obținuți monoesterii ai sorbitolului cu acizi aromatici, prin transesterificarea esterilor metilici ai acizilor aromatici corespunzători cu D-sorbitolul în dimetilformamidă, în prezența  $K_2CO_3$  (Figura 1.22). Reactivitatea

esterilor metilici ai acizilor aromatici în reacțiile de transesterificare depinde de influența (efecte electronice și sterice) substituenților donori (-OH, -NH<sub>2</sub>) și acceptori (-NO<sub>2</sub>, -Cl) din inelul aromatic asupra centrului de reacție (atomul de carbon al grupării carbonil). Monoesterii obținuți sunt substanțe microcristaline solubile în apă, alcool, dimetilsulfoxid, dimetilformamidă și insolubili în benzen și clorofom [121].

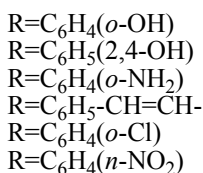
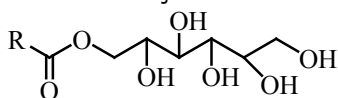


Figura 1.22. Structura chimică a monoesterilor aromatici ai sorbitolului obținuți prin transesterificarea sorbitolului cu diferiți acizi aromatici substituiți, în prezența K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ca și catalizator.

Esterii acidului *p*-hidroxibenzoic au reacționat cu xilitolul în mediu bazic cu formarea unui amestec de 1-, 2- și 3-xilitil 4-hidroxi-benzoați [136].

Oricum, acești produși nu îndeplinesc cerințele pentru aplicațiile în industria alimentară. Pentru a contracara dezavantajele proceselor chimice convenționale, utilizarea enzimelor în medii neapoase a devenit o nouă metodă pentru obținerea, în condiții blânde de reacție, a unor produși de mare valoare [137]. Utilizarea lipazelor s-a dovedit a fi o metodă foarte convenabilă de sinteză a esterilor acizilor fenolici [135].

Multe cercetări au fost concentrate pe extracția antioxidanților din uleiuri vegetale, ierburi, condimente, tărâțe de orez și ceaiuri, în principal datorită interesului tot mai mare de a înlocui antioxidanții sintetici, care pot avea acțiune cancerigenă. Derivații acizilor polifenolici, pe de altă parte, sunt cunoscuți pentru rolul lor de antioxidanți foarte eficienți în sistemele biologice și se găsesc în plante sub formă de esteri cu carbohidrați, acizi grași și proteine. Natura hidrofilă a acestor compuși poate restricționa aplicativitatea practică în medii hidrofobe, ca lubrefianți. Astfel, esterificarea polifenolilor cu lanțuri alifatic funcționalizate poate fi o metodă utilă pentru modificarea proprietăților fizice cum sunt solubilitatea, miscibilitatea și activitatea antioxidanților lipofili în emulsii și formule pe bază de uleiuri [138].

În acest sens, diferiți acizi fenolici (acidul cafeic, acidul dihidrocafeic, acidul ferulic, acidul cinamic, acidul 3,4-dihidroxicinamic, acidul hidroxifenilpropionic) au fost esterificați cu alcoolii alifatici (C<sub>4</sub> – C<sub>18</sub>) în prezența lipazei din *Candida antarctica* imobilizată pe rășină acrilică macroporoasă (Novozyme 435), fără adaos de solvent, al cărui rol a fost asigurat de excesul de alcool, care a permis de asemenea o agitare și dispersie a materialului insolubil corespunzătoare [135, 137]. Novozyme 435 a fost singura lipază capabilă să catalizeze esterificarea acidului ferulic cu etanol sau 1-octanol în *tert*-butanol, conversiile fiind de aproximativ 13% după 14 zile [139]. De asemenea mai multe lipaze (*Candida antarctica*, *Humicola lanuginosa*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas sp.*, *Geotrichum candidum*) au fost utilizate pentru sinteza octanoatului de 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibenzil și octanoatului de 3,4-di-hidroxifeniletanol, compuși care au fost apoi testați pentru activitatea antioxidantă în uleiurile vegetale [138]. Esterificarea acidului



dihidrocafeic cu alcoolul linolenic, catalizată de lipaza din *Candida antarctica*, în solvent organic, a dus la obținerea unui ester cu activitate antioxidantă comparabilă cu cea a  $\alpha$ -tocoferolului [132]. A fost investigată influența lanțului alifatic și structurii compusului aromatic asupra vitezei de esterificare a unor antioxidanți naturali cum sunt derivații de acid cinamic cu alcooli alifatici, în mediu de solvent organic, catalizată de lipazele immobilizate din *Candida antarctica* și *Rhizomucor miehei* [140].

S-a arătat că lipazele nu acceptă doar acizii grași alifatici ca și donori, ci permit și sinteza eficientă a compușilor proveniți de la acizii arilalifatici hidrofobi cu lanț de atomi de carbon mare cât și din zaharuri cum ar fi 2-(hidroximetil) fenil- $\beta$ -D-glucopiranozida și 1-fenilglucozida [116]. A fost de asemenea examinată esterificarea acidului p-cumaric, acidului p-hidroxifenilacetic și acidului p-hidroxifenilpropionic cu monozaharide cum sunt glucoza, fructoza și n-octil glucozida, catalizată de lipaza din *Candida antarctica*, în *terț*-butanol. Formarea exclusivă a monoesterilor a demonstrat regioselectivitatea ridicată a procesului [128]. Novozyme 435 a fost utilizată ca și biocatalizator pentru acilarea unor flavonoid glucozide cum sunt naringenin-7-ramnoglucosida și quercetin-3-O-glucopiranozida cu acid palmitic, acid cinamic, acid fenilpropionic și derivați hidroxilați ai acestuia ca donori acil [141].

$\beta$ -D(+)-glucoza, n-alkil- $\beta$ -D(+)-glucozidele și 1-fenilglucozidele au fost acilate regioselectiv la gruparea hidroxil primară cu o varietate de acizi carboxilici arilalifatici neactivați utilizând lipaza din *Candida antarctica* B în mediu de *terț*-butanol. Esterii arilalifatici ai glucozei au prezentat solubilitate mare în apă și au arătat activitate superficială, putând fi utilizați ca agenți de emulsifiere ulei-apă și detergenți, în timp ce n-alkil și arilglucozidele pot avea aplicații ca agenți de udare sau emulsifiere apă-ulei (Figura 1.23) [116].

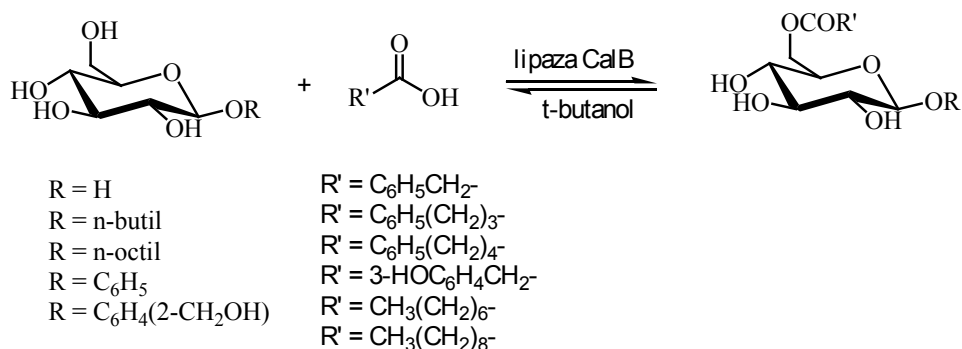


Figura 1.23. Esterificarea  $\beta$ -D(+)-glucozei, n-alkil- $\beta$ -D(+)-glucozidei și arilglucozidelor cu acizi carboxilici arilalifatici, catalizată de lipaza din *Candida antarctica* (CalB) în *terț*-butanol.

S-a arătat că esterii glucozei cu acizii hidroxicinamici sunt larg răspândiți în plante. Totuși, sinteza acestor esteri de glucoză este puțin descrisă în literatură. Deși s-a arătat că 1-O-antraniloil glucoza a fost obținută pe cale enzimatică din acid antranilic și uridin difosfoglucoză, în prezența unui preparat enzimatic din *Lens esculentum*, s-a sugerat faptul că esterii acizilor fenolici sunt sintetizați pornind de la glucoză și derivatul acil al coenzimei A [142].

Datele de literatură care descriu sinteza chimică și enzimatică precum și caracterizarea esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților acestora sunt limitate comparativ cu cele care descriu esterii alifatici de zaharuri. Astfel că cercetările în

domeniu oferă noi oportunități pentru un spectru larg de compuși cu valoare ridicată.

## **1.6. Imobilizarea enzimelor prin metoda de entrapare în sol-gel**

Interesul mare pentru imobilizarea enzimelor este datorat avantajelor enzimelor imobilizate în ce privește stabilitatea mai mare, posibilitatea reutilizării, separarea ușoară din mediul de reacție și prevenirea contaminării produșilor de reacție cu enzimă [143]. Adsorbția, legarea covalentă pe suprafețe solide, entraparea în hidrogeluri polimerice și microîncapsularea au fost mult timp utilizate pentru imobilizarea biomoleculilor și celulelor. Aceste metode nu sunt generice și nu există o tehnologie universală. Entraparea în sol-gel este, probabil, singura tehnologie de imobilizare facilă și generică. Materialele sol-gel oferă câteva avantaje în comparație cu matricile organice polimere, care sunt larg utilizate în biotehnologie [144].

Sinteza sol-gelului a apărut la granița dintre diferite domenii științifice, cum sunt chimia anorganică, coloidală și organică, chimia fizică a sticlei, chimia polimerilor, fiind subiectul multor monografii și articole de sinteză [145]. Flexibilitatea asociată proceselor sol-gel duce la fabricarea unor materiale hibride înalt specializate [146]. Utilitatea metodei este îmbunătățită prin antrenarea și atașarea catalizatorului încapsulat la o varietate de suporturi.

Entraparea în sol-gel a biomaterialelor și complexelor organice a cunoscut dezvoltări importante, ghidate de o serie de aplicații dintre care cele mai răspândite sunt cu siguranță cele în domeniul biosenzorilor. Prin selecția atentă a precursorilor și aditivilor, acești compuși pot fi proiectați pentru o aplicație specifică dată și pot produce materiale utile și robuste. Încă de la începuturile ei, tehnica de sinteză a sol-gelurilor a cunoscut o evoluție impresionantă. Materialele implicate sunt în principal oxizi, în special silice, alumina, aluminosilicați, dioxid de titan, dioxid de zirconiu și multe altele. Pentru entraparea enzimelor, cel mai studiat dintre aceste materiale este de departe dioxidul de siliciu. Aceste materiale au furnizat medii biocompatibile pentru imobilizarea enzimelor [147]. Preferința pentru silice este datorată faptului că gelurile corespunzătoare pot fi ușor adaptate la o gamă largă de texturi poroase, rețele, funcționalități de suprafață și condiții de procesare. pH-ul, timpul de gelificare, transparența sau hidrofobicitatea, de exemplu, pot fi adaptate la o enzimă sau aplicație specifică. Alte geluri anorganice necesită condiții de sinteză, cum este pH-ul, care nu sunt întotdeauna favorabile pentru încapsularea enzimei. Bineînțeles, gelurile pot fi utilizate pentru imobilizarea enzimelor prin adsorbție, sau grefarea covalentă la suprafață, pe sfere de gel presintetizate, la fel ca oricare alt tip de suport. Oricum, gelurile prezintă interes, în principal, deoarece o enzimă poate fi imobilizată prin construirea rețelei poroase de gel în jurul fiecărei macromolecule de enzimă, cum este ilustrat în Figura 1.24, o tehnică care a fost denumită încapsulare, entrapare sau incluziune [148]. Biomoleculele sunt incluse în interiorul rețelei rigide poroase care nu este gonflabilă în apă și protejează biospeciile împotriva agresiunilor externe (pH, temperatură, solvenți, anticorpi) [144].

În principiu, încapsularea înseamnă clădirea unui perete poros în jurul unității încapsulate, iar capsula nu trebuie să fie sferică. Încapsularea în gel constă în "tricotarea" unui astfel de perete poros, prin condensarea chimică a unei rețele de silica gel în jurul enzimei. În acest proces, enzima se comportă ca un șablon, astfel că dimensiunea nanocapsulelor este în general mult mai mare decât majoritatea porilor care există în pereții de gel, în special în xerogeluri. Dimensiunea nanocapsulelor poate fi astfel suficient de mare pentru încapsularea unei celule vii. În cel mai bun caz, gelurile fac posibilă nanoîncapsularea fiecărei molecule de enzimă individuală, cu condiția ca aceste macromolecule să nu se aglomereze în timpul procesului de încapsulare. În preparatul final, un fragment de gel cuprinzând un număr variabil, în general mare, de astfel de nanocapsule, poate fi construit sub forma unor granule macroscopice, sfere, pelicule sau membrane care pot fi manipulate ușor. La o încapsulare corespunzătoare, fiecare moleculă de enzimă este prinsă în interiorul nanoporilor, deși este necesar un spațiu suficient pentru modificarea conformației necesară unui ciclu catalitic complet. Astfel, moleculele de enzimă nu necesită atașarea, prin adsorbție sau alte legături ionice sau covalente, la pereții de gel, deși asemenea interacțiuni pot apărea în mod natural și pot interfera cu eficiența enzimei. În plus, difuzia substraturilor și produșilor în interiorul și în afara pereților nanocapsulelor trebuie să fie liberă [148].

Prepararea materialelor biologice prin procesul sol-gel necesită ca mai multe cerințe să fie îndeplinite simultan. În primul rând, metoda trebuie să fie aplicabilă soluțiilor apoase, întrucât acestea sunt necesare pentru menținerea funcțiunii biologice a biomoleculelor.

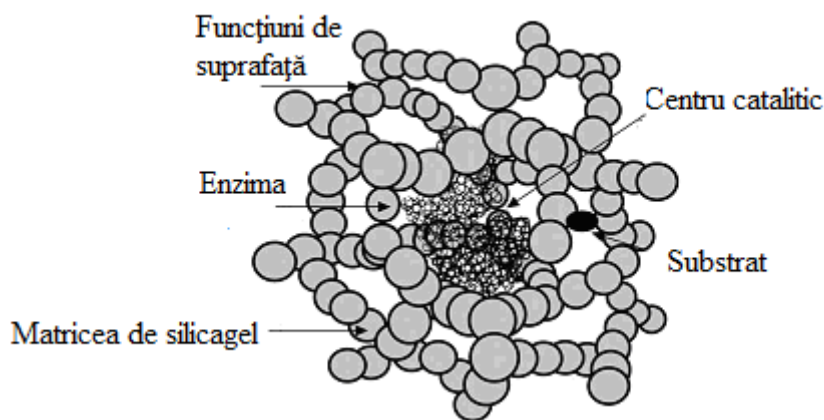


Figura 1.24. Ilustrarea schematică a unei matrici sol-gel cu enzima entrapată.

În al doilea rând, reacția de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH și tărie ionică necesare pentru funcționarea proteinelor (pH = 4 – 10, tăria ionică între 0,01 și 1 M). În al treilea rând, procesul trebuie să aibă loc la o temperatură apropiată de cea a camerei, pentru a menține proteinele în conformația lor nativă. În al patrulea rând, materialul trebuie să aibă dimensiunea porilor suficient de mică pentru a preveni pierderea biomoleculei dar suficient de mare pentru a permite analiților mai mici să pătrundă cu ușurință în matrice. De asemenea, proprietățile materialului ar trebui să poată fi modificate pentru a permite schimbarea mediului intern astfel încât să maximizeze activitatea biomoleculei entrapate. Materialul final trebuie să fie optic transparent sau

conductor electric pentru a permite măsurători spectroscopice sau electrochimice, în cazul utilizării materialului pentru dezvoltarea senzorilor. Fabricarea materialului trebuie să fie directă și reproductibilă și ar trebui să fie adaptabilă la o varietate de formate, incluzând sticle voluminoase, filme subțiri, coloane, fibre, pudre și rețele. Pentru realizarea acestor scopuri, biocompozitele derivate din sol-gel sunt în general preparate în conformitate cu procesul descris în Figura 1.25.

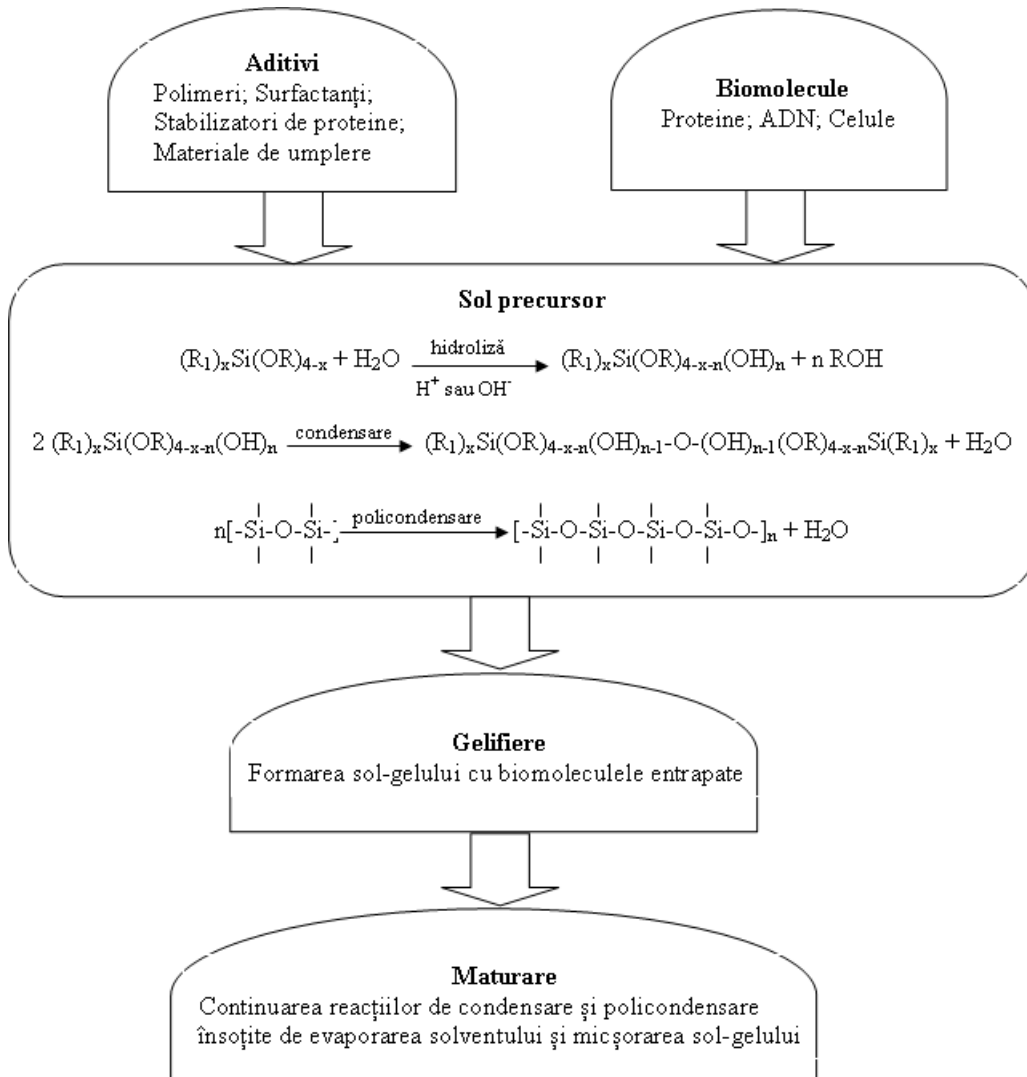


Figura 1.25. Procesul de entrapare prin metoda sol-gel.

Formarea materialului începe cu hidroliza parțială sau completă a unui precursor potrivit pentru formarea unui sol apos. Precursorii pot consta din tetraalcoxilani, mono-, di- sau tri-alkil alcoxilani, sau pot cuprinde grupări funcționale cum sunt alchenil, aril, amino, carboxil, tiol, sau alte grupări precum și

părți redox active, flavine sau chinone. Alți centri metalici, cum sunt Al, Ti, V, sau Ce, pot fi folosiți de asemenea pentru modificarea proprietăților materialului. Reacția de hidroliză a silanilor precursori poate fi catalizată acid sau bazic și poate fi urmată de transesterificare cu aditivi cum este glicerina pentru a forma poligliceril silicați, care sunt mult mai biocompatibili decât alcoxisilanii tipici. După hidroliză, solul poate fi utilizat imediat sau poate fi depozitat timp de câteva săptămâni pentru a permite evoluția continuă a particulelor de sol. În acest timp, au loc noi reacții de hidroliză și condensare având ca rezultat o varietate de polisilicați liniari, ramificați și coloidali. Precursorul hidrolizat este apoi amestecat cu o soluție tampon apoasă conținând biomoleculele, un catalizator, aditivi, polimeri, agenți de modelare, specii redox sau agenți de umplere care pot fi necesari pentru modificarea proprietăților materialului final. Modificarea pH-ului și prezența sărurilor și catalizatorilor adăugați încurajează o reacție de polimerizare la scală mare pe o perioadă de minute sau ore, având ca rezultat gelifierea solului și astfel entraparea biomoleculelor. Gelurile inițiale sunt fluide și au un conținut ridicat de apă (50-80%) și pori mari (până la 200 nm diametru). Maturarea rețelei de silice umede timp de câteva zile până la săptămâni este însoțită de noi reacții de condensare și rigidizare a rețelei. În timpul acestei etape, alcoolul entrapat și apa rezultată de la reacțiile inițiale de hidroliză și condensare vor fi îndepărtate din matrice, cauzând micșorarea ei cu 10-30%, a diametrului porilor cu 25% și creșterea proporției grupărilor siloxanice față de cele silanice, datorită creșterii particulelor materialului. În final, materialul maturat este parțial uscat, având ca rezultat pierderea aproape totală a apei interstițiale, înrețelarea matricii, micșorarea porilor la 2-20 nm, precum și micșorarea per ansamblu a materialului până la 85% din volumul inițial [149].

Din momentul apariției încapsulării biomoleculelor, enzimele au fost mult studiate datorită mecanismelor biochimice binecunoscute, disponibilității comerciale, aplicațiilor variate, solubilității ridicate în apă, stabilității ridicate, simplității moleculelor în comparație cu organismele animale, plantele sau microorganismele.

În 1955 Dickey a demonstrat pentru prima dată bioîncapsularea cu menținerea parțială a activității ureazei și catalazei. Grupul lui Avnir a entrapat cu succes în silica gel o fosfatază, care și-a menținut 30% din activitatea inițială timp de două luni, cu creșterea stabilității termice. Shtelzer și colaboratorii au entrapat tripsina într-un compozit binar derivat de sol-gel utilizând tetraetoxisilan și polietilenglicol. În același an, Zink și colaboratorii au entrapat alte proteine, citocromul C și mioglobina, în matrice sol-gel având la bază tetraetoxisilanul. Studii ulterioare asupra bioîncapsulării au fost accelerate de alte grupuri și câteva proteine ca mioglobina, hemoglobina, citocromul C, lactat oxidaza, alcalin fosfataza, Cu-Zn superoxid dimutaza, ureaza, bacteriorodopsina, peroxidaza din hrean și acetilcolinesteraza au fost imobilizate în matrici de sol-gel. Rapoarte anterioare au descris diferite aspecte ale biomoleculelor entrapate în sol-gel cum ar fi conformația, dinamica, accesibilitatea, cinetica de reacție, activitatea și stabilitatea. Cea mai investigată arie de aplicații a biomoleculelor entrapate în sol-gel a fost cea a biosenzorilor. Există o cerere mare pentru biodetectori miniaturizate și portabile în domenii cum sunt monitorizarea medicală in vivo, diagnosticare, monitorizarea bioproceselor, analiza alimentară, monitorizarea mediului înconjurător, materiale biologice, împreună cu abilitatea de a produce sol-geluri optice și conductoare și fabricarea lor în diferite formate [150]. Enzimele entrapate în sol-gel au fost implicate în construirea biosenzorilor, utilizând diferite metode de detecție cum sunt metodele electrochimice și optice. Proprietățile inerente ale matricii, cum sunt transparența optică, aria suprafeței mare, inerția chimică și fotochimică precum și abilitatea de a obține orice formă dorită (monoliți, filme subțiri, pudre, fibre) au

permis proiectarea senzorilor optici. O altă potențială aplicație a enzimelor entrapate în sol-gel este testarea medicamentelor. Besanger și alții au entrapat enzime importante din punct de vedere clinic, cum sunt ciclooxigenaza 2, factor Xa, dihidrofolat reductaza și A-glutamyl transpeptidaza, folosind tetraetoxisilan și diglicerilsilan (DGS). Enzimele entrapate în DGS au demonstrat activitate catalitică și stabilitate ridicată.

În industria chimică este necesară o gamă largă de catalizatori pentru transformări chimice bine definite. Aceste reacții sunt nespecifice în condiții normale, astfel că produsul dorit este disponibil doar în concentrații mici sau în amestec cu produși secundari. Aceasta are ca rezultat necesitatea unor procese de purificare costisitoare, care adeseori fac sinteza chimică ineficientă din punct de vedere economic. O alternativă o reprezintă utilizarea enzimelor. Acești biocatalizatori permit transformări cu specificitate ridicată în condiții de reacție moderate. Datorită stereo- și regio-selectivității ridicate, aplicarea enzimelor poate fi superioară sintezei chimice. Câteodată, procesele enzimatică pot fi utilizate pentru producția compușilor care sunt dificil de sintetizat pe cale chimică. Metodele enzimatică sunt în special potrivite pentru sinteza compușilor optic activi. Adesea, doar unul din enantiomerii unui compus are efect farmaceutic, pe când celălalt enantiomer nu are un astfel de efect, sau chiar prezintă un efect nefavorabil. Astfel, sintezele biotehnice au câștigat o mare importanță în producerea compușilor care necesită puritate enantiomerică ridicată pentru scopuri farmaceutice sau comerciale. Foarte important pentru enzime ca și catalizatori în chimia organică este faptul că unele dintre acestea (de exemplu lipazele) își mențin activitatea catalitică în medii neapoase.

Lipazele sunt enzimele cel mai frecvent utilizate în chimia organică, deoarece acestea pot realiza esterificări sau transesterificări chemo-, regio- și stereoselective și de asemenea pot face posibilă cataliza acilării enantioselective a aminelor. Reetz și colaboratorii au imobilizat cu succes diferite lipaze în matrici sol-gel hidrofobe, având ca rezultat o stabilitate și activitate îmbunătățită în reacțiile de esterificare și transesterificare în solvenți organici. Activitățile îmbunătățite se datorează în principal accesibilității mai mari a enzimei, datorită distribuției fine în interiorul matricii și interacțiunilor dintre grupările hidrofobe prezente în matricile de sol-gel și situsurile active ale lipazei. Lipaza entrapată în sol-gel pe bază de tetraetoxisilan și-a menținut 5% din activitate. Încorporarea grupărilor alchil hidrofobe în matricea de silice a dus la îmbunătățirea activității. Când interfețele hidrofobe sunt absente, lipazele au anumite elemente ale structurii secundare (un „capac” hidrofob) care acoperă centrul activ, accesul lor la substraturi fiind blocat. În prezența interfețelor hidrofobe, au loc modificări conformaționale care duc la „deschiderea” structurii lipazei. Într-un alt studiu, lipaza entrapată în materiale sol-gel hidrofobe a fost implicată în hidroliza esterilor în mediu apos. În timpul reutilizării s-a înregistrat o reducere cu 5% a activității datorită pierderii mecanice a enzimei. În mod uzual, după fiecare ciclu de reacții chimice, catalizatorul trebuie să fie separat din mediul de reacție, scop pentru care metoda uzuală este filtrarea. Pentru simplificarea separării, nanoparticule de magnetită au fost entrapate împreună cu lipaza în matrici sol-gel cu metiltrimetoxisilan. Lipazele nu au fost afectate de prezența magnetitei, astfel că biocatalizatorii heterogeni au putut fi separați magnetic din mediul de reacție. De asemenea, lipaza entrapată în sol-gel de filosilicat a putut fi folosită ca și biocatalizator în conversia unor grăsimi reziduale la alchilesteri. Adăugarea sitelor moleculare a dus la îmbunătățirea randamentelor, datorită eliminării apei din reacție. O metodă convenabilă pentru procesele multienzimatice este co-imobilizarea enzimelor. Prin co-imobilizarea format

dehidrogenazei, formaldehid dehidrogenazei și alcool dehidrogenazei în silica geluri, împreună cu donorul de electroni NADH, sinteza metanolului a putut fi efectuată la temperaturi și presiuni joase. Kuncova și colaboratorii au studiat efectul a diferiți solvenți organici asupra esterificării acidului stearic utilizând lipaze imobilizate. Enzima liberă și-a pierdut activitatea în acetonă și toluen, în timp ce lipazele imobilizate în sol-gel și-au pierdut doar parțial activitatea. Stabilitatea termică a lipazei a crescut de 55 de ori în urma entrapării în material sol-gel pe bază de amestec de propiltrimetoxisilan și tetrametoxisilan. Timpul de înjumătățire al lipazei imobilizate a fost de 4 luni la 40°C în *n*-hexan. Această stabilitate nu s-a datorat numai entrapării fizice ci și multiplelor interacțiuni suplimentare cu silica prin interacțiuni de hidrogen, ionice sau hidrofobe și prin atașarea uniformă la suport. Nakane și colaboratorii au entrapat invertaza într-o rețea tridimensională de acetat de celuloză și fibre de dioxid de zirconiu. Invertaza imobilizată a reținut 92% din activitatea inițială, chiar după 10 cicluri de spălări repetate. Prin creșterea concentrației de proteină, activitatea invertazei a fost îmbunătățită datorită dispersiei omogene și gonflării complet restricționate.

Chiar dacă enzimele entrapate în sol-gel arată stabilitate crescută față de modificările fizico-chimice care au loc, totuși apar limitări difuzionale care duc la valori  $K_M$  mai mari și au un impact mare asupra conversiei la utilizarea enzimelor imobilizate în aplicațiile industriale. Pentru biotransformări eficiente sunt necesare eforturi pentru îmbunătățirea proprietăților de difuzie ale matricii sol-gel [151].

În afară de aplicațiile ca biosenzori și biocatalizatori, multe alte utilizări au fost descrise. De exemplu, ficobiliproteinele și bacteriorodopsina își mențin fotoactivitatea în silica geluri, deschizând posibilitatea pentru biotransducători în stare solidă și dispozitive biooptice de depozitare [152].

Imobilizarea lipazei din *Pseudomonas stutzeri* într-un material hidrofob prin entraparea în elastomeri siliconici a avut ca rezultat activarea considerabilă a acestei enzime, probabil datorită unui transfer de masă îmbunătățit a compușilor hidrofobi, cum este benzoina și stabilizarea lipazei în forma sa activă. După imobilizare, au fost aplicate temperaturi de până la 60°C fără a se înregistra o pierdere semnificativă a activității, în timp ce lipaza nativă s-a dezactivat în urma incubării la 50°C. Datorită creșterii activității și stabilității lipazei din *Pseudomonas stutzeri* (lipaza TL) au putut fi obținute conversii mai mari într-un timp mai scurt decât atunci când s-a utilizat lipaza nativă, iar catalizatorul a putut fi reutilizat, astfel că productivitatea după 4 cicluri a fost îmbunătățită de aproape 30 de ori [153].

Raportări asupra imobilizării lipazei din specia *Arthrobacter* pe polimeri insolubili au arătat proprietăți modificate în ceea ce privește stabilitatea și enantioselectivitatea. A fost descrisă o metodă ușoară pentru prepararea β-amino alcoolilor enantiopuri prin modularea proprietăților enzimei prin imobilizare pe suporturi solubile și insolubile, utilizând tehnica de entrapare/legare covalentă. A fost studiată eficiența enzimei imobilizate pe suporturi insolubile preparate pe bază de tetraetilortosilicat și aminopropiltriethoxisilan și suporturi solubile derivate din copolimerizarea N-vinil-pirolidon-alilglicidil-eterului, pentru rezoluția cinetică a β-amino alcoolilor, în comparație cu enzima nativă [154].

O placă de rășină de acetat de polivinil a fost folosită ca suport pentru formarea polimerului hibrid organic-anorganic de sol-gel în porii acesteia. Lipaza din *Candida cylindracea*, imobilizată prin entrapare în acest material pe bază de tetrametoxisilan și propiltrimetoxisilan a catalizat eficient esterificarea directă a geraniolului cu acidul acetic în *n*-hexan anhidru pentru sinteza acetatului de geraniol, un ester aromat [155].



Sinteza particulelor de silice nanostructurate uniforme a fost efectuată prin coprecipitarea într-o microemulsie cu anumite modificări. Lipaza din *Candida rugosa* a fost imobilizată prin legare covalentă la nanoparticule de silice activate cu glutaraldehidă. Studiile cinetice ale enzimei libere și imobilizate au sugerat faptul că enzima suferă modificări conformaționale în timpul imobilizării, care au ca rezultat o energie de activare mai mică necesară pentru hidroliza p-nitrofenilfosfatului. De asemenea specificitatea lipazei imobilizate a fost diferită, aceasta prezentând o activitate de esterificare de 7 ori mai mare decât cea a enzimei native, în timp ce pentru sinteza butiratului de etil, acetatului de etil sau caprilatului de etil nu s-a înregistrat o diferență semnificativă. Lipaza imobilizată a arătat proprietăți bune de reutilizare. Acest studiu demonstrează faptul că lipaza imobilizată în acest mod poate fi utilizată pentru sinteza esterilor, fiind ușor de recuperat [156].

Lipaza din *Burkholderia cepacia* a fost imobilizată cu succes în sol-geluri, utilizând metoda de liofilizare pentru uscarea gelului. Enzima a fost de asemenea imobilizată prin înrețelare cu glutaraldehidă, fără adăugarea unui aditiv. Aceste preparate imobilizate au fost utilizate pentru acilarea înalt enantioselectivă a 1-feniletanolului, 1-(2-furil) etanolului și 1-amino-2-feniletanolului N-acilat, cu acetat de vinil în solvenți organici. Hidroliza enzimatică a esterilor obținuți a avut loc ca reacție secundară acilării în prezența lipazei native, în timp ce în prezența preparatelor imobilizate hidroliza a fost suprimată [157].

Un bioreactor foarte eficient a fost realizat cu lipază imobilizată într-un monolit de silice, prin utilizarea unei metode sol-gel în două etape: prepararea monolitului de silice pe bază de metiltrimetoxisilan, urmată de acoperirea acestuia cu silicați având substituenți alchil mai hidrofobi. Acest tip de bioreactor a fost aplicat pentru producerea esterilor metilici de acizi grași prin metanoliza uleiului de rapiță în n-hexan, utilizând lipaza din *Rhizopus oryzae*. Lipaza imobilizată în matrice sol-gel pe bază de propiltrimetoxisilan și tetrametoxisilan a avut cele mai bune performanțe, având o activitate de 10 ori mai mare decât lipaza nativă [158].

A fost raportată de asemenea încapsularea lipazei din *Rhizomucor miehei* într-o matrice mezoporoasă în prezența unui surfactant, printr-o metodă sol-gel care implică hidroliza/policondensarea unui precursor de silice la pH neutru și temperatura camerei. Biocatalizatorul entrapat a fost utilizat la transesterificarea trioleinei cu metanol, fără utilizarea unui solvent. Entraparea enzimei într-un surfactant care este asamblat cu silica la pH neutru și temperatura camerei permite prepararea unui biocatalizator heterogen activ. Gelifierea lentă a silicei și prezența surfactantului permite conservarea mobilității lipazei într-o formă activă și protejată. Faptul că enzima se poate deplasa aproape liberă în canalul mezoporos, cu centrul catalitic activat de către grupările hidrofobe ale surfactantului, are ca rezultat o lipază imobilizată cu activitate mai mare decât forma sa nativă. Matricea de silice permite creșterea vitezei de transesterificare, datorită abilității de a adsorbi trigliceridele. În plus, structura ordonată mezoporoasă îmbunătățește stabilitatea enzimei și descrește viteza de pierdere a enzimei din matrice [159].

Lipaza comercială din *Candida antarctica* a fost entrapată într-un aerogel de silice format din 60% tetrametoxisilan și 40% metiltrimetoxisilan și uscat prin metoda cu dioxid de carbon supercritic. Biocatalizatorul obținut s-a utilizat pentru transesterificarea directă a uleiului de floarea soarelui cu metanol, fără adăugarea unui alt solvent. Enzima entrapată în aerogel a fost reutilizată de 5 ori, fără a suferi degradări mecanice. Activitatea sa a crescut cu 40% după a doua utilizare, iar după a cincea utilizare activitatea a rămas cu 20% mai mare decât după prima utilizare. Prin comparație, lipaza din *Candida antarctica* imobilizată comercial a prezentat o activitate mai mare decât lipaza entrapată în aerogel după prima utilizare, dar



activitatea sa a scăzut cu 20% în timpul celei de-a doua utilizări. Comportamentul aerogelului după prima utilizare a fost explicat prin adsorbția de către gel a glicerinei rezultate după prima utilizare, care furnizează un mediu favorabil moleculelor de enzimă [160].

Comportamentul lipazei entrapate în sol-gel depinde de proprietățile fizice și structurale ale suportului și de proprietățile fizice și chimice ale lipazei. Conformația lipazei entrapate într-un gel poate fi îmbunătățită prin grefarea unei funcționalități corespunzătoare, provenită din silani alchil-substituiți sau aditivi, pe rețeaua de gel care înconjoară enzima. Lipaza din *Candida rugosa* entrapată în sol-gel obținut prin hidroliza alcoxisilanilor, cum este tetraetoxisilanul, în prezența polietilenglicolului, a arătat activitate hidrolitică considerabilă. Acest lucru poate fi explicat prin obținerea unor pori mai mari utilizând un aditiv care inhibă contracția gelului în timpul sintezei suportului. Aceeași lipază entrapată în sol-gel preparat prin hidroliza metiltrimetoxisilanului, în prezența polietilenglicolului, a arătat activitate de esterificare ridicată. Aceasta are legătură cu interacțiunile provocate de natura sa hidrofobă-hidrofilă. Cele mai eficiente sisteme (cu aditiv/tetraetoxisilan și cu aditiv/metiltrimetoxisilan) sunt eficiente în aplicații biocatalitice [161].

Lipazele par să joace un rol important în formarea rețelei de silice în timpul gelifierii matricii, a dimensiunilor porilor și ariei suprafeței specifice. Acțiunea lipazei reduce grupările Si-OH și produce pori mai mari și aria suprafeței mai mică. Porii mai mari facilitează difuzia substraturilor și explică activitatea hidrolitică mai mare a lipazei entrapate în matricea sol-gel cu tetraetoxisilan-polietilenglicol în comparație cu alte matrici sol-gel. Structura cu pori mai deschiși permite o accesibilitate mai mare a substraturilor și se corelează cu activitatea hidrolitică mai mare observată pentru lipaza entrapată în sol-gel format cu tetraetoxisilan și polietilenglicol ca aditiv [162].

Lipaza din *Candida rugosa* entrapată în silica gel în absența sau în prezența polietilenglicolului ca aditiv a arătat activitate de esterificare la fel de mare ca cea obținută cu lipaza nativă. Aparent, acest lucru se datorează tipului de precursor utilizat pentru prepararea matricii și depinde și de conținutul de apă al biocatalizatorului [163].

Lipaza din specia *Arthrobacter* a fost entrapată cu succes prin metoda sol-gel, folosind metacriloxipropil-trimetoxisilan ca precursor iar preparatul imobilizat rezultat a prezentat activitate și stabilitate mai ridicată. La hidroliza p-nitrofenilfosfatului și acilarea asimetrică a unui amestec racemic de S-4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenten-1-onă cu acetat de vinil, activitatea și activitatea specifică a acestui preparat imobilizat au fost mult mai ridicate în comparație cu preparatul imobilizat cu octiltrimetoxisilan, care a fost raportat ca fiind un silan precursor foarte bun pentru entraparea în sol-gel a lipazelor. Determinarea hidrofobicității matricilor sol-gel investigate, prin măsurători ale unghiului de contact, a arătat că diferența de activitate dintre diferiții silani precursori nu poate fi explicată doar pe baza hidrofobicității [164].

Imobilizarea lipazelor în matrici sol-gel hibride folosind anumite lichide ionice de tip săruri de imidazoliu ca aditivi a avut ca rezultat obținerea unor biocatalizatori cu eficiență catalitică ridicată. Randamentul de regăsire a activității totale după imobilizare a fost în general mai mare de 100%, cea mai bună valoare fiind obținută în cazul lichidului ionic tetrafluoroborat de octil-metil-imidazoliu ([Omim]BF<sub>4</sub>) utilizat ca aditiv. Rezoluția cinetică a alcoolilor secundari este un scop foarte important în biocataliză. Cu toate că lipaza nativă din *Pseudomonas fluorescens* nu este suficient de enantioselectivă pentru acest proces, s-a demonstrat că utilizând biocatalizatori imobilizați prin entrapare în sol-gel și un mediu de reacție potrivit se pot obține

valori ale ale raportului enantiomeric E mai mari de 50 în cazul acilării 2-hexanolului. În cazul acestei reacții, lichidele ionice sunt un mediu de reacție mai bun decât solvenții organici, dar cu valori mai scăzute ale enantioselectivității [8].

Lichidele ionice pot avea o funcție importantă, deoarece ele contribuie la formarea matricii sol-gel și de asemenea pot facilita reacția enzimatică prin natura lor hidrofilă sau hidrofobă. Rezultatele au dovedit că alegerea potrivită a structurii lichidului ionic și a silanilor precursori poate avea ca rezultat lipaze entrapate cu valori mai mari ale activității și enantioselectivității, comparativ cu enzimele native [165].

Lipazele imobilizate s-au dovedit a fi importante pentru chimiștii organicieni, mai ales pentru rezoluția chirală a amestecurilor racemice. S-a demonstrat că depunerea pe un suport solid a enzimelor imobilizate prin entrapare în sol-gel are ca efect îmbunătățirea stabilității și activității catalizatorilor, dar nu modifică semnificativ enantioselectivitatea. Atât derivații etoxisilanici cât și cei metoxisilanici sunt precursori valoroși pentru matricea de sol-gel, ducând la obținerea unor preparate a căror activitate este cu atât mai ridicată cu cât timpul de gelificare este mai lung și efectul termic al reacțiilor de condensare nu generează supraîncălzirea micromediului, ceea ce ar putea duce la inactivarea enzimei [7].

Un alt studiu a avut ca scop imobilizarea prin entrapare în sol-gel a unor lipaze microbiene cu sau fără lichide ionice ca aditivi și utilizarea preparatelor obținute în reacții de rezoluție cinetică a unor substraturi racemice. A fost studiată influența lungimii lanțului hidrofob atât din silanul precursor cât și din lichidul ionic asupra activității și enantioselectivității. În cazul acilării alcoolilor secundari prin biocataliză cu lipază din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) entrapată în sol-gel, eficiența catalitică a fost îmbunătățită comparativ cu enzima nativă, prin prezența unei grupări hidrofobe nehidrolizabile mai lungi (octil) în matricea de silice și prin folosirea unui lichid ionic ca aditiv. Totuși, creșterea concentrației acestor grupări peste un optim nu a fost benefică nici pentru caracteristicile de gelificare, nici pentru activitatea catalitică.

Folosirea unui lichid ionic cu un lanț alchil mai lung (octil în loc de butil) a fost avantajoasă pentru eficiența catalitică. Din contră, raportul enantiomeric E a scăzut cu lungimea grupării alchil din silan în ordinea: metil > propil > octil, indiferent de lungimea lanțului alchil din lichidul ionic. Studiile efectuate cu ajutorul microscopiei cu scanare electronică asupra enzimelor imobilizate au evidențiat o structură mezo/macroporoasă, mai compactă în cazul matricilor cu grupări metil, ce pare a facilita discriminarea cinetică a enantiomerilor, dar nu și viteza de reacție globală [166].

A fost de asemenea investigată imobilizarea prin entrapare în sol-gel a lipazei microbiene Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* folosind ca precursori tetrametoxisilan și alchil- sau aril-trimetoxisilan. Preparatele enzimatică obținute au fost testate pentru rezoluția cinetică a unor alcooli alifatici secundari: 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol prin acilare cu acetat de vinil. Prezența grupării octil nehidrolizabile în matricea sol-gel a avut ca efect obținerea celei mai mari conversii, pe când cea mai bună enantioselectivitate s-a obținut când în matrice au fost prezente grupări fenil. Această metodă ar putea fi eficientă pentru aplicații la scară largă pentru a obține alcooli și esteri optic activi [167].

O extindere importantă a metodei de entrapare în sol-gel este utilizarea unor suporturi poroase în timpul procesului sol-gel. Astfel, a fost investigată dubla imobilizare a lipazei din pancreas de porc folosind tetraetoxisilan și metil- sau feniltrietoxisilan ca precursori și diferite suporturi solide (Celite 545, Celite 521, Celite C22, CaCO<sub>3</sub>, Purolite 200/108/02/5, Celuloză Avicel PH-101). Preparatele

obținute au fost folosite în reacția de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol în mediu de *n*-hexan. Prezența grupărilor nehidrolizabile metil și fenil în matricea sol-gel a dus la obținerea unor valori ale randamentului de regăsire a activității enzimatică mai mari de 100%. Atunci când s-au folosit amoniac (catalizator) și Celite 545 (adsorbent) în protocolul de imobilizare s-au obținut valori ridicate ale activității de esterificare [168].

A fost studiată enantioselectivitatea și specificitatea de substrat a lipazelor A și B din *Candida antarctica* precum și a lipazei AK Amano 20 din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel, pentru rezoluția cinetică la scală preparativă a amestecurilor racemice de etil 3-heteroaryl-3-hidroxiopropanoate cu esteri vinilici [171, 172]. A fost de asemenea investigată stereoselectivitatea la rezoluția cinetică a unor  $\beta$ -hidroxi-esteri aromatici cu acidul decanoic și esteri ai acidului decanoic prin cataliză cu lipaze, în mediu de solvent organic [171].

Utilizarea enzimelor, în special a lipazelor, pentru sinteza compușilor chirali a fost solid fundamentată în ultima perioadă, iar biotransformările sunt acceptate ca o metodologie comună pentru prepararea intermediarilor și produșilor chirali. În ultima vreme au apărut o serie de procese interesante care utilizează hidrolaze, oxidoreductaze, sau liaze ca și biocatalizatori pentru sinteza compușilor chirali. Oricum, utilizarea lipazelor în solvenți organici reprezintă o metodologie excelentă pentru prepararea unui singur izomer chiral prin hidroliză enzimatică, transesterificare sau aminoliză. Aplicațiile lipazelor în sintezele asimetrice includ rezoluția cinetică a alcoolilor racemici, acizilor, esterilor sau aminelor, precum și asimetrizarea unor compuși prochirali. În ultimii ani, a existat un interes tot mai mare pentru obținerea unui singur enantiomer și de aceea procesele de rezoluție cinetică sau asimetrizarea enzimatică enantioselectivă a compușilor prochirali au o relevanță specială pentru multe companii farmaceutice [172].

## 1.7. Surfactanți pe bază de zaharuri

Surfactanții pe bază de zaharuri sunt caracterizați, în principal, prin prezența grupărilor hidrofile în structura lor polară. Această caracteristică structurală, împreună cu numeroasele posibilități de legare a grupării hidrofile a zaharului cu lanțul alchil hidrofob, furnizează acestor surfactanți proprietăți fizico-chimice unice, unele dintre acestea fiind substanțial diferite de ale surfactanților etoxilați neionici obișnuiți. Deși, în mod tradițional, acești compuși amfilici au prezentat doar interes academic, recent ei au devenit obiect de studiu pentru mulți cercetători, deschizând astfel noi domenii de cercetare în chimia coloranților și a suprafețelor, atât din perspectiva fundamentală cât și cea tehnologică. Alături de proprietățile caracteristice ale acestor surfactanți, un fapt remarcat frecvent este acela că pot fi obținuți din resurse regenerabile și au o comportare ecologică excelentă. În prezent există o tendință clară de a înlocui surfactanții convenționali cu compuși mai "prietenosi" cu mediul înconjurător, deși trebuie remarcat faptul că surfactanții pe bază de zaharuri posedă și alte proprietăți care îi transformă în produși foarte avantajoși din punct de vedere al performanței lor. De aceea, în prezent se efectuează o serie de studii referitoare la designul și dezvoltarea de noi molecule surfactante pe bază de zaharuri, caracterizarea soluțiilor și comportamentului la interfață, stabilirea relației structură-proprietăți, precum și pentru găsirea de noi aplicații industriale ale acestor materiale.

Surfactanții pe bază de zaharuri sunt rezultatul final al unui concept de produs, care se bazează pe cea mai mare posibilitate de a utiliza resurse regenerabile. În timp ce derivatizarea uleiurilor și grăsimilor pentru a produce o

varietate de surfactanți diferiți pentru un domeniu larg de aplicații este bine pusă la punct și are o tradiție veche, producția surfactanților pe bază de grăsimi, uleiuri și carbohidrați la scară industrială este relativ nouă [173].

În prezent, cei mai importanți surfactanți pe bază de zaharuri sunt alchil-poliglicozidele, esterii sorbitanului și esterii zaharozei [174]. Având în vedere structura amfifilică a unui surfactant tipic cu o grupare "cap" hidrofilă și o "coadă" hidrofobă, legarea unei molecule de carbohidrat (ca alternativă pentru polietilenglicol) de un derivat de grăsime sau ulei, cum este un acid gras sau un alcool alifatic, a constituit întotdeauna o mare provocare [175].

Deși știința a raportat numeroase căi de a realiza aceste legături și de asemenea a descris un număr mare de carbohidrați diferiți utilizați în astfel de reacții, din perspectiva industrială doar câteva zaharuri satisfac criteriile de preț, calitate și disponibilitate pentru a constitui o sursă de materie primă interesantă. Acestea sunt, în principal, zaharoza obținută din sfeclă de zahăr și din trestie de zahăr, glucoza derivată din amidon și sorbitolul ca derivat hidrogenat al glucozei. Mai recent, au fost folosite ca materii prime și lactoza, xiloza și reziduurile pe bază de carbohidrați derivate din paie și de la procesarea hemicelulozei [176].

### 1.7.1. Surfactanți pe bază de sorbitan

Acești esteri sunt cunoscuți de câteva decenii, când au fost stabilite primele procese chimice industriale în vederea fabricării lor.

În prima etapă se realizează deshidratarea sorbitolului în prezența unui acid, cu formarea 1,4-sorbitanului ca izomer principal, care într-o etapă secundară este esterificat cu acizi grași folosind un catalizator alcalin (de exemplu  $K_2CO_3$ ) la temperaturi cuprinse între 200-250°C (Figura 1.26).

În funcție de tipul și cantitatea de acid gras folosit, diferite compoziții de produși, formate din amestecuri de mono-, di-, sau triesteri de sorbitan (laurati, oleati, stearati) au fost obținute cu valori HLB (bilanțul hidrofil/lipofil) între 1 și 8. Pentru modificarea acestor materiale relativ hidrofobe, o tehnologie comună este derivatizarea ulterioară a esterilor de sorbitan prin reacția cu etilenoxid pentru obținerea esterilor de sorbitan etoxilați sau polisorbitanilor, cu valori HLB cuprinse între 10 și 17, în funcție de numărul de unități de etilenoxid atașate.

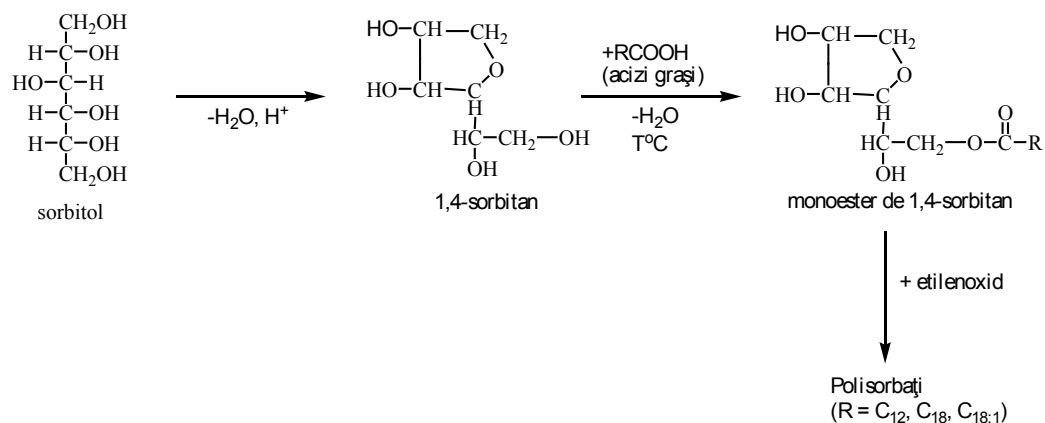


Figura 1.26. Sinteza esterilor de sorbitan prin deshidratarea intramoleculară a sorbitolului urmată de esterificarea cu acizi grași în cataliză bazică.

Piața esterilor de sorbitan (inclusiv produșii etoxilați) este estimată la aproximativ 20.000 t/an. Sunt folosiți în principal ca emulgatori în produsele farmaceutice, alimentare, cosmetice, pesticide, pentru polimerizări ale emulsiilor și explozivi precum și alte aplicații tehnice [173].

### 1.7.2. Surfactanți pe bază de zaharoză

Acești esteri sunt considerați foarte "blânzi" în ce privește proprietățile lor dermatologice și sunt aprobați ca aditivi alimentari în multe țări. În consecință, sunt materii prime perfecte pentru formulările alimentare și cosmetice, iar folosirea lor în aplicații cum sunt anumite tipuri de emulgatori, are o tradiție veche [177].

În Asia, esteri ai zaharozei cu grad scăzut de esterificare se utilizează și în detergenții speciali. Octaesterii au fost dezvoltăți de către Procter & Gamble și sunt folosiți ca substituenți noncalorici ai grăsimilor în industria alimentară. În prezent, producătorii principali de esteri de zaharoză sunt Dai-Ichi Kogyo Seiyaku și Mitsubishi în Japonia, Croda și Procter & Gamble în Statele Unite, Sisterna în Olanda și Cognis în Germania. Capacitatea de producție existentă este mult mai mare decât potențialul pieței actuale, care este estimată a fi mai mică de 10000 t/an. Cererea și volumul pieței ar putea crește substanțial dacă procesele de producție, în special pentru sinteza mono- și di-esterilor ar fi optimizate.

Esterii de zaharoză și acizii grași, numiți adesea și "sucroesteri" sunt obținuți la scală industrială pentru aplicații ca aditivi alimentari și cosmetici, în special emulgatori.

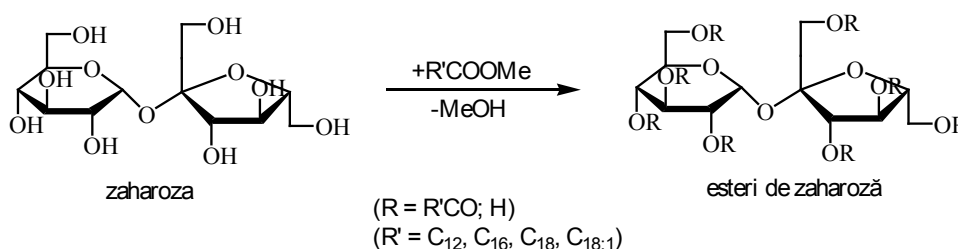


Figura 1.27. Sinteza esterilor de zaharoză prin transesterificarea cu esteri metilici ai acizilor grași în cataliză bazică.

Sucroesterii se obțin și se utilizează ca și amestecuri de regioizomeri și mono-, di- și triesteri, iar proprietățile lor fizico-chimice, în special bilanțul hidrofil-lipofil (HLB) calculat, depind în principal de gradul mediu de substituție, la fel ca și de prezența impurităților care provin din procesul de fabricație (în principal resturi de acizi grași și săpunuri). Ca și alternativă, sistemele Winsor s-au dovedit a fi o metodă mai precisă pentru compararea proprietăților sucroesterilor [178].

Prin alegerea potrivită a gradului de substituție (amestecuri mai bogate în mono-, di- și triesteri) și a lungimii lanțului alchil al acidului gras, pot fi atinse o gamă largă de proprietăți ale surfactanților, în timp ce se menține simplitatea conexiunii cu esterul. Pot fi obținuți emulgatori foarte polari (cu grad scăzut de substituție), fără o etapă suplimentară de etoxilare așa cum este nevoie la alți compuși bazați pe monozaharide. Proprietatea cheie a acestora este absența toxicității. Au mai fost descrise și alte proprietăți interesante, cum sunt cele de gelifiere ale hibridilor zaharoză-aminoacid-acid gras.

Majoritatea studiilor cu privire la proprietățile esterilor zaharozei cu acizii grași se referă la aplicațiile acestora ca și emulgatori, care reprezintă amestecuri de regioizomeri cu diferite grade de substituție. Este evident că lungimea lanțului alifatic și numărul acestora au cea mai mare influență asupra proprietăților surfactanților [178, 179]. O hidrofilitate crescută a esterilor de zaharoză poate fi obținută prin sulfatare [179] sau prin glicozilare enzimatică [180].

Printre esterii de zaharoză, au fost obținuți și câțiva derivați ai acizilor grași fluorurați, surfactanți special creați pentru emulsii care conțin fluorocarboni utilizați pentru aplicații biomedicale, în special pentru substituția sângelui [181]. Au fost de asemenea descriși și o serie de surfactanți pe bază de aspartat de zaharoză. Carbonații micști și alchil carbamații cu lanțuri alchil mai mari au fost obținuți în mediu alcoolic prin reacții cu cloroformiați, respectiv izocianați, demonstrând faptul că și reactivi sensibili în prezența apei pot fi utilizați în mediu apos, pe baza reactivității ridicate a zaharozei comparativ cu apa și alcoolii simpli [182].

S-au găsit câteva aplicații ale derivaților de zaharoză și în domeniul aditivilor alimentari. Degradarea termică, acidă sau bazică a zaharozei duce la diferite tipuri de caramel care are multe utilizări în industria alimentară fie ca aromă (de obicei obținută prin procese în cataliză acidă) fie în calitate de colorant (processe în cataliză bazică), în funcție de proprietățile componentelor principali (anhidride, oligozaharide sau derivați de 2-(hidroximetil)furfural). Esterii zaharozei cu acizi grași cu grad de substituție scăzut sunt cunoscuți în sistemul european al aditivilor alimentari ca și E 473 iar sucrogliceridele ca și E 472. Esterii cu acizi grași ai zaharozei cu grad de substituție mare (penta- până la octaesteri), cât și poliesterii de zaharoză, se comportă în mod analog cu grăsimile și pot să înlocuiască trigliceridele în pregătirea mâncărurilor. Ne fiind recunoscute ca substraturi de lipazele digestive, aceștia nu sunt metabolizați și pot fi astfel utilizați ca și substituenți de grăsimi necalorice. Ei sunt produși sub denumirea comercială de "Olestras" și sunt aprobați de legislația din America de Nord pentru realizarea alimentelor dietetice. S-a constatat de asemenea un efect benefic al poliesterilor de zaharoză în absorbția intestinală a colesterolului LDL [183]. Poliesterii de zaharoză au mai fost utilizați și ca agenți de contrast pentru realizarea imaginilor de rezonanță magnetică în medicină. La fel ca și alți substituenți ai grăsimilor, poliesterii de zaharoză au demonstrat abilități în extragerea vitaminelor solubile în grăsimi. Esterii de zaharoză sunt utilizați în reglarea densității din anumite băuturi [184]. Sucraloza (triclorigalactozaharoză) este produsă la scară industrială și comercializată ca și îndulcitor în Anglia și în alte țări, având o putere de îndulcire de 650 de ori mai mare decât zaharoza. Fiind mai stabilă la temperaturi ridicate comparativ cu alți îndulcitori sintetici, poate fi utilizată și la gătitul mâncărurilor. S-a arătat că gustul dulce al sucralozei se bazează pe interacțiuni cu ambele subunități ale receptorului cu gust dulce [185].

Printre aplicațiile farmaceutice, octasulfatul de zaharoză (și sarea de aluminiu a acestuia) prezintă aplicații în tratamentul ulcerului [10]. Câteva hidrogeluri pe bază de zaharoză, obținute din monomeri acrilici de zaharoză, pot fi utilizate pentru transportul controlat al medicamentelor în organism. În același domeniu, acetat izobutiratul de zaharoză se utilizează ca gel biodegradabil pentru eliminarea controlată a medicamentelor injectabile sau orale [183].

Zaharoza, la fel ca și alți carbonați simpli, se utilizează ca aditiv în suspensii minerale, ciment și ceramică. Caracterul higroscopic al carbohidraților și abilitatea lor de a interacționa cu particule coloidale anorganice și diferiți ioni modifică fenomenul de hidratare din interiorul suspensiilor, precum și reologia mediului și cinetica proceselor respective (cel mai adesea prin încetinire). Polibenzoații de zaharoză (grad de substituție între 6 și 8) sunt folosiți ca aditivi în vopselele

cosmetice și ca agenți de plastifiere pentru învelișul de suprafață. Octaacetatul de zaharoză se utilizează de asemenea ca aditiv în diferite mase plastice, adezivi și alți produși, având un gust foarte amar. Unii acetati de zaharoză sau alți derivați de zaharoză esterificați sunt utilizați ca și înalbitori auxiliari pentru a înlocui acidul etilendiaminotetraacetic. Poliesterii cu lanț scurt de atomi de carbon ai zaharurilor au fost studiați și pentru proprietățile lor de înalbitori auxiliari [180].

Derivații carbonizați de zaharuri sunt utilizați ca și catalizatori acizi solizi în producerea de biodiesel, iar zaharoza carbonizată tratată cu etilenă și apoi pirolizată duce la obținerea de materiale utilizate ca și anodi de carbon pentru bateriile cu ioni de litiu. Printre produșii care provin din degradarea sau termoliza zaharozei, hidroximetilfurfuralul este o substanță chimică foarte utilă, care poate fi integrată în diferite scheme sintetice [186].

### 1.7.3. Surfactanți pe bază de glucoză

Primul pas în rezolvarea problemei de derivatizare neselectivă a carbohidraților a fost făcut atunci când Emil Fischer a descoperit reacția dintre glucoză și alcoolii, cu formarea alchil glucozidelor [133]. Reacția de glucozidare este foarte selectivă, datorită funcțiunii de hemiacetal din molecula de glucoză și reactivității crescute a grupării hidroxil de la  $C_1$ . Cognis a fost prima companie care a oferit alchil glicozide cu lanț alchil  $C_{12}/C_{14}$  la nivel industrial, de calitate cerută. În prezent, Cognis este furnizorul cu cea mai mare capacitate din lume, iar capacitatea mondială totală este estimată la aproximativ 85.000 t/an. Aplicațiile principale ale alchil glucozidelor de tip  $C_{12}/C_{14}$  sunt cele de surfactanți în detergenți de vase și alți detergenți, precum și ca produse pentru igienă personală, iar ale alchil glucozidelor de tip  $C_8/C_{10}$  (sau  $C_8$  ramificat) ca detergenți pentru suprafețe dure, agrochimicale și detergenți industriali [94].

În ceea ce privește proprietățile lor ecologice, toxicologice și dermatologice, alchil poliglicozidele și glucamidele acizilor grași pot fi considerați surfactanți care conferă produsului o eficiență deosebită. În general, surfactanții derivați de la glucoză s-au dovedit a fi foarte eficienți în detergenții manuali de vase concentrați. Prin folosirea alchil poliglicozidelor, cantitatea totală de surfactanți într-o formulare poate fi redusă, la același nivel de performanță. Mai mult, detergenții manuali de vase, care conțin alchil poliglicozide, sunt extrem de blânzi pentru piele. În detergenții lichizi, alchil poliglicozidele au fost folosite pentru prima dată în anul 1989. S-a constatat faptul că alchil poliglicozidele pot îmbunătăți stabilitatea la temperatură scăzută și la depozitare și, mai mult decât atât, permit înlocuirea săpunurilor de trietanolamină cu săpunuri de sodiu și potasiu. De asemenea, a fost descris efectul folosirii alchil poliglicozidelor ca și componente în detergenți asupra stabilității enzimelor și, ca o consecință, asupra performanțelor de curățire.

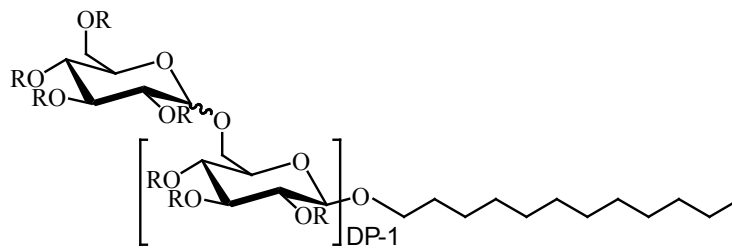
În produsele pentru igienă personală, alchil poliglicozidele reprezintă un concept relativ nou. Acești compuși pot fi combinați cu componente convenționale sau pot să le înlocuiască pe acestea în noi tipuri de formulări, conducând la un spectru îmbogățit de efecte suplimentare. În ceea ce privește capacitatea de spumare, sunt comparabili cu betainele și sulfosuccinații. Spuma formată de alchil poliglicozide este formată din bule mai fine și poate fi mai cremoasă decât alte sisteme.

Alchil poliglicozidele ( $C_8/C_{10}$  și  $C_{12}/C_{14}$ ) s-au arătat a fi substituenți ai alchilfenolilor etoxilați în formulările agrochimice. Au toleranță ridicată față de săruri și au dat rezultate bune ca adjuvanți în unele ierbicide. Produsele cu lanț alchil scurt



(C<sub>8</sub>/C<sub>10</sub> și C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>) sunt aprobate ca ingrediente de către United States Environmental Protection Agency, USEPA.

Esterii neionici de alchil poliglucozide (citrați, sulfosuccinați, tartrați) pot fi utilizați în aplicații de igienă personală. Sinteza acestora pornește de la alchil poliglicozide (C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>), care sunt esterificate cu acid citric, anhidridă maleică, respectiv acid tartric. Succinatul obținut în prima etapă este apoi supus sulfonării. Structurile acestor compuși sunt redată în Figura 1.28.



R = H sau R'

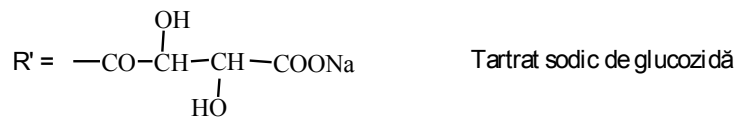
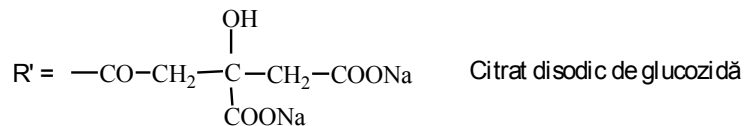


Figura 1.28. Exemple de derivați de alchil poliglucozide anionice.

Alchil poliglicozidele carboxilate au fost introduse pe piață de către compania Cognis ca noi surfactanți anionici cu performanțe excelente pentru aplicații în igiena personală. În formulările de șampoane și geluri de duș, surfactanții anionici au demonstrat un comportament de spumare mult mai bun, în comparație cu surfactanții neionici. De asemenea, îmbunătățesc efectele senzoriale în produsele de îngrijire personală. Aceste proprietăți fac ca produsele să fie corespunzătoare pentru aplicații cosmetice, de exemplu, geluri pentru curățirea tenului, șampoane pentru copii mici, șervețele umede, precum și pentru șampoane fără sulf. Un proces nou industrial bazat pe reacția dintre monocloracetat de sodiu și soluții apoase de alchil poliglucozide permite fabricarea acestui produs într-o manieră favorabilă din punct de vedere economic și ecologic [133].



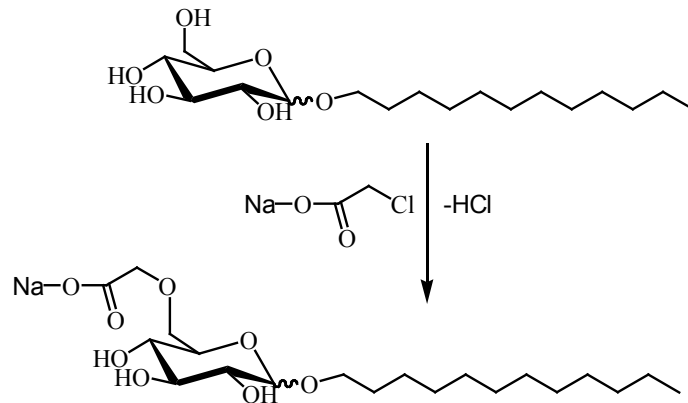


Figura 1.29. Sinteza alchil poliglicozidelor carboxilate.

#### 1.7.4. Surfactanți pe bază de inulină

Derivații de inulină reprezintă un exemplu de surfactanți polimerici pe bază de zaharuri, pentru utilizarea ca emulgatori în aplicații tehnice variate, ca vopsele, agenți de acoperire, agrochimicalele precum și în cosmetice. Surfactanți pe bază de inulină extrasă din rădăcina de cicoare sunt produși la scară industrială și comercializați sub numele Inutec [187].

Comparând surfactanții pe bază de zaharuri existenți, rezultă că generarea unei structuri amfifile poate fi realizată cel mai ușor utilizând glucoza ca sursă de carbohidrați, deoarece până în prezent nici o metodă pentru derivatizarea selectivă a sorbitolului și zaharozei nu a fost dezvoltată la scară industrială. Alte motive pentru care la ora actuală alchil poliglicozidele sunt cei mai de succes surfactanți pe bază de zaharuri sunt performanțele remarcabile, multifuncționalitatea, prețul competitiv, siguranța ridicată pe care o conferă produsului, precum și procesul de fabricare favorabil mediului înconjurător [188].

### 1.8. Concluzii

Esterii zaharurilor și derivaților acestora sunt tot mai mult utilizați ca biosurfactanți în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. De asemenea, anumiți esteri aromatici ai zaharurilor au demonstrat activitate biologică ceea ce a devenit un subiect foarte interesant pentru diferite procese biologice. Totuși, potențialul acestor compuși nu a fost pe deplin explorat deoarece obținerea oligoesterilor de zaharuri este o problemă dificilă în chimia organică datorită prezenței multiplelor grupări hidroxil în molecula de zahar și reactivității similare a acestora. Utilizarea lipazelor ca și biocatalizatori pentru producerea la scară industrială a esterilor de zaharuri și derivaților acestora, este de mare interes, datorită specificității de substrat, regioselectivității, eficienței catalitice în condiții blânde de reacție și cantității reduse de deșeuri. Ținând cont de avantajele utilizării enzimelor comparativ cu procesele chimice tradiționale, esterificarea și transesterificarea regioselectivă catalizată de lipaze este de departe mecanismul preferat pentru sinteza esterilor zaharurilor și derivaților acestora. Oricum, costul produsului final sintetizat pe cale enzimatică este mai ridicat comparativ cu

metodele care utilizează catalizatori chimici obișnuiți. O alternativă o reprezintă imobilizarea enzimelor în scopul creșterii stabilității operaționale, reutilizării biocatalizatorului pe termen lung, ceea ce face ca procesul biocatalitic să devină eficient din punct de vedere economic și competitiv cu procesele convenționale. Randamentul de obținere a esterilor de zaharuri depinde mult de tipul de enzimă și de condițiile de reacție, ceea ce face ca optimizarea parametrilor, în special a biocatalizatorului și solventului, să fie esențială pentru eficiența procesului. De asemenea, solubilitatea redusă a zaharurilor în solvenții organici nepolari, în care lipazele își mențin activitatea catalitică, face dificilă sinteza esterilor de di- și oligozaharide. O alternativă atractivă în acest sens o reprezintă metodele chemo-enzimatice, care implică etape de protejare a grupărilor hidroxil secundare cu grupări hidrofobe, ceea ce duce la creșterea solubilității zaharurilor, urmate de esterificarea enzimatică a grupărilor hidroxil primare, iar apoi deprotejarea prin hidroliză în mediu acid.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit selecția biocatalizatorului pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor, optimizarea parametrilor de reacție și determinarea parametrilor cinetici pentru sinteza esterilor aromatici ai alditolilor, precum și sinteza chemo-enzimatică a esterilor aromatici ai zaharurilor.

## 2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

### 2.1. Introducere

Potențialul sintetic al lipazelor este foarte extins, deoarece acestea, în comparație cu majoritatea enzimelor, sunt stabile în solvenți organici neapoși, și în funcție de solventul utilizat pot fi aplicate în reacțiile de hidroliză sau sinteză. În plus, lipazele pot să accepte o gamă largă de substraturi, altele decât trigliceridele, cum ar fi esterii alifatici și aromatici [107].

Deși lipazele au capacitatea de a transforma și compuși aromatici, datele de literatură despre utilizarea lor pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharidelor sau derivaților de zaharide sunt puține. Asemenea compuși ar putea avea aplicații extrem de interesante atât ca surfactanți (așa cum sunt deja utilizați o serie de esteri alifatici ai zaharurilor), cât și ca antioxidanți dacă funcțiunea aromatică este derivată de la un acid fenolic. Din acest motiv, obiectivul principal al acestei teze a fost sinteza biocatalitică a esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri. În acest scop, s-a testat activitatea de esterificare și transesterificare, precum și specificitatea față de compușii alifatici și aromatici, a lipazelor native provenite din diferite surse, a unor preparate imobilizate comercial (Novozyme 435 și Lipozyme TL IM) precum și a lipazelor imobilizate în diferite matrici de silice. Biocatalizatorii selectați în urma acestor studii au fost utilizați pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri în mediu de solvent organic.

Au fost studiate parametri care influențează reacția (temperatura, natura mediului de reacție, timpul de reacție, concentrația de biocatalizator, raportul molar, concentrația de substrat) în vederea determinării condițiilor optime pentru sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor, optimizarea procesului fiind esențială pentru creșterea eficienței acesteia. Au fost de asemenea determinați parametri cinetici care caracterizează activitatea de acilare a biocatalizatorului utilizat.

Sinteza enzimatică a esterilor aromatici de zaharuri s-a dovedit a fi deosebit de dificilă, în condițiile în care solubilitatea zaharurilor este redusă în solvenții organici care sunt în general utilizați în procesele biocatalitice. Doar puține enzime sunt cunoscute pentru menținerea activității catalitice în piridină sau dimetilsulfoxid, solvenți care pot solubiliza concentrații ridicate de zaharuri. Pentru a surmonta această problemă, s-a adoptat o metodă alternativă care a fost descrisă în literatura de specialitate pentru prepararea esterilor de zaharuri cu acizii grași și anume acetalizarea zaharurilor. Prin această metodă solubilitatea zaharurilor în solvenții organici a fost îmbunătățită, evitându-se astfel utilizarea solvenților cu polaritate crescută în mediul de reacție. Pornind de la acești intermediari au fost sintetizați, pe cale enzimatică, esterii aromatici ai zaharurilor. Producții finali se pot obține în urma hidrolizei în mediu acid a grupărilor acetal.

Determinarea randamentelor de reacție și distribuției produșilor a fost efectuată cu ajutorul cromatografiei de gaze și cromatografiei de lichide, iar structurile esterilor aromatici ai zaharurilor precum și a intermediarilor implicați în lanțul de reacții chimice au fost identificate folosind tehnici fizico-chimice avansate: spectrometria de masă, spectroscopia de infraroșu și spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară.

## 2.2. Selecția biocatalizatorului

Pentru a evalua activitatea catalitică a lipazelor în reacțiile zaharidelor și derivaților acestora, a fost studiată legarea compușilor aromatici printr-o legătură esterică de molecula unui carbohidrat. Gama largă de substraturi, regioselectivitatea și enantioselectivitatea mare precum și proprietățile bune de imobilizare fac ca lipazele să fie cel mai des folosite pentru formarea de legături esterice. Datorită acestor proprietăți, lipazele (triacilglicerol acil hidrolazele) au o importanță industrială deosebită. Utilizarea lipazelor în medii de reacție neapoase propune o metodologie excelentă pentru prepararea unor compuși cu valoare mare prin reacții de hidroliză enzimatică, transesterificare sau reacții de aminoliză [189].

Deoarece lipaze diferite pot avea specificitate de substrat diferită și eficiență catalitică diferită, pentru a determina care este cel mai eficient catalizator pentru modificarea zaharurilor au fost evaluate lipaze native din diferite surse, pe mai multe substraturi, în reacții de transesterificare și esterificare. Specificitatea lipazelor atât față de zaharuri cât și față de compusul aromatic a fost testată prin înlocuirea treptată a unor substraturi model cu substraturile de interes. Mai întâi a fost determinată activitatea de transesterificare a lipazelor native în reacția de acilare a 1-octanolului cu laurat de vinil, apoi a fost determinată activitatea catalitică a acestora prin înlocuirea esterului alifatic cu compuși aromatici. Alcoolul primar a fost apoi înlocuit cu diferiți carbohidrați, determinându-se activitatea catalitică a lipazelor native în reacția de acilare a carbohidraților cu lauratul de vinil, respectiv cu compușii aromatici.

### 2.2.1. Activitatea de transesterificare a lipazelor native

Un număr de zece lipaze native provenind din surse microbiene, vegetale și animale (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, germeni de grâu și pancreas de porc) au fost investigate în calitate de biocatalizatori în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil în mediu de n-hexan, la 40°C. 1-octanolul, cunoscut ca substrat ideal în biotransformările catalizate de lipaze, a fost ales ca și componentă hidroxilică, iar lauratul de vinil a fost ales ca agent de acilare de referință, esterii vinilici fiind mult utilizați în reacțiile de acilare catalizate de lipaze deoarece prin formarea alcoolului vinilic ca produs secundar reacția devine practic ireversibilă și se obțin randamente mari. Aceste lipaze s-au dovedit a fi biocatalizatori utili în multe reacții de acilare, cât și în rezoluția cinetică a amestecurilor racemice, acizilor carboxilici și esterilor datorită specificității de substrat extinse [190]. De asemenea, ele sunt biocatalizatori excelenți în rezoluția cinetică a unor racemici de amine și alcooli, precum și în acilarea regioselectivă a unor compuși polihidroxilici [191]. Lipaza din *Candida antarctica* B este un catalizator robust și deosebit de eficient pentru o varietate surprinzător de mare de reacții, inclusiv multe sinteze regio- și enantioselective [6]. Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* a fost mult studiată pentru rezoluția cinetică a alcoolilor secundari și pentru proprietățile excelente de imobilizare în matrici anorganice [5, 7, 8, 13, 14, 15]. Schema de reacție este prezentată în Figura 2.1.



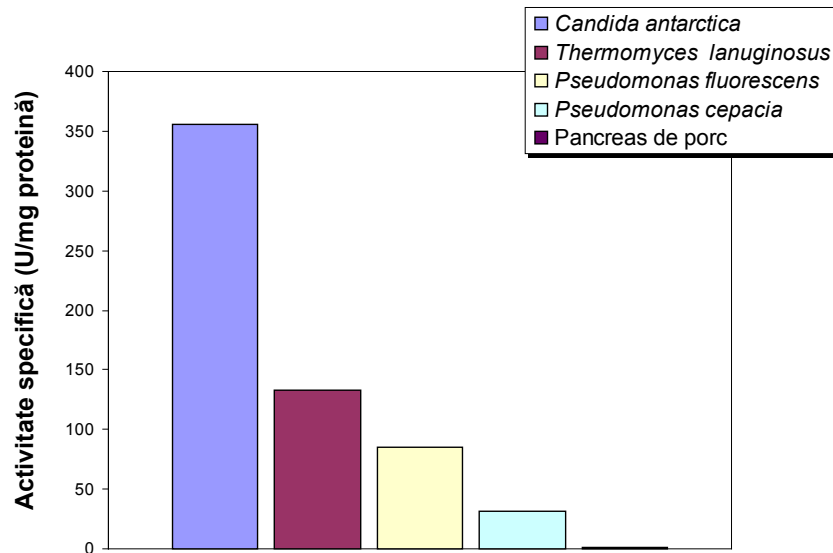


Figura 2.2. Activitatea specifică a diferitelor lipaze native în reacția de transesterificare a lauratului de vinil cu 1-octanol în n-hexan, la 40°C, după 1 minut de reacție.

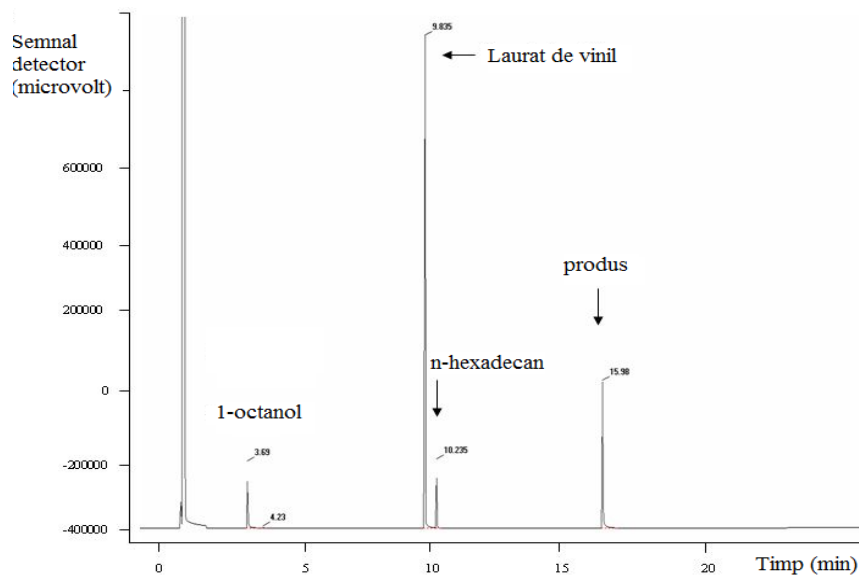


Figura 2.3. Cromatograma de gaze a amestecului de reacție de la acilarea 1-octanolului cu laurat de vinil în hexan, catalizată de lipaza din *Candida antarctica* B, după 3 ore de reacție (cf. Cap. 3.4.1).

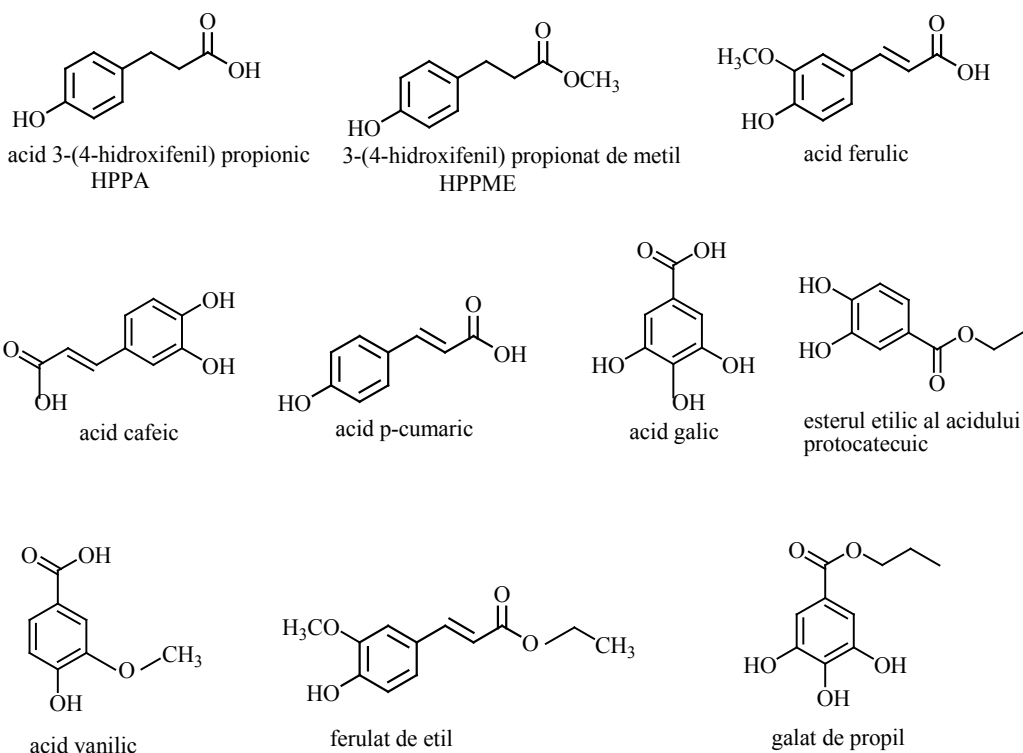
Rezultatele arată că dintre cele zece lipaze native testate doar lipazele provenind din *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* și lipaza din pancreas de porc au fost catalitice.

active în reacția de transesterificare studiată, în timp ce lipazele din *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* și germeni de grâu nu au prezentat activitate catalitică nici după 24 ore de reacție. Din Figura 2.2 se poate observa că cea mai mare activitate de transesterificare s-a înregistrat la lipaza din *Candida antarctica* B, urmată de cea din *Thermomyces lanuginosus* [193].

### 2.2.2. Specificitatea lipazelor native pentru compuși aromatici

Pentru a putea dezvolta un proces eficient catalizat de lipaze sunt necesare cunoștințe aprofundate despre specificitatea de substrat a acestora. Este bine cunoscut faptul că specificitatea de substrat este în mare parte dependentă de tipul de lipază. Diferite tipuri de lipaze pot prezenta specificitate de substrat și activitate catalitică diferită.

În acest context, lipazele native provenite din diferite surse (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, lipaza din germeni de grâu și lipaza din pancreas de porc) au fost testate ca biocatalizatori în reacții de esterificare și transesterificare a 1-octanolului cu diferiți acizi și esteri aromatici. Reacțiile au fost realizate în mediu de *tert*-butanol, la 40°C, timp de 48 de ore. Ca agenți de acilare au fost utilizați zece compuși aromatici, a căror structură chimică este redată mai jos:



Dintre substraturile aromatice testate, în condițiile de reacție studiate, doar 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil și acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic au dus la formarea esterilor corespunzători. În Figurile 2.4 și 2.5 este prezentată câte o cromatogramă a amestecului de reacție, după 25 de ore în cazul esterificării 1-octanolului cu HPPA, respectiv 48 de ore în cazul transesterificării cu HPPME, catalizată în ambele cazuri de lipaza din *Pseudomonas fluorescens*.

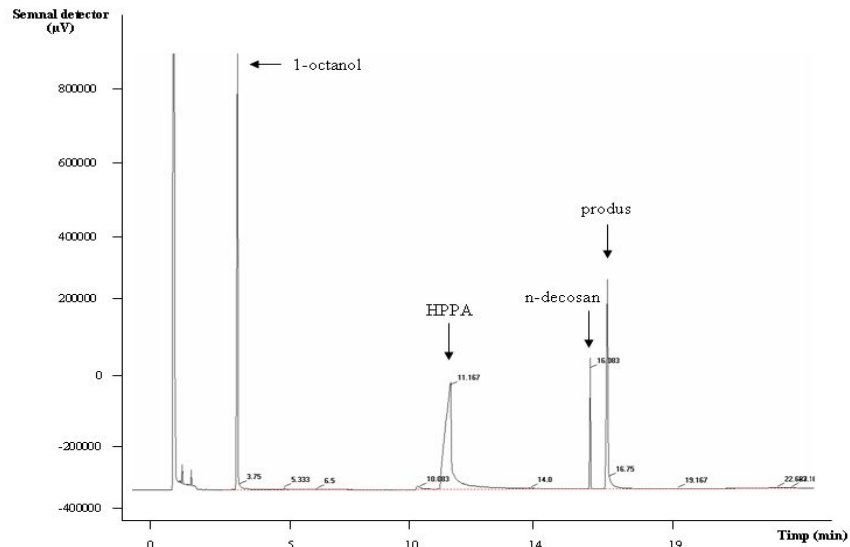


Figura 2.4. Cromatograma amestecului de la reacția de esterificare catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens*.

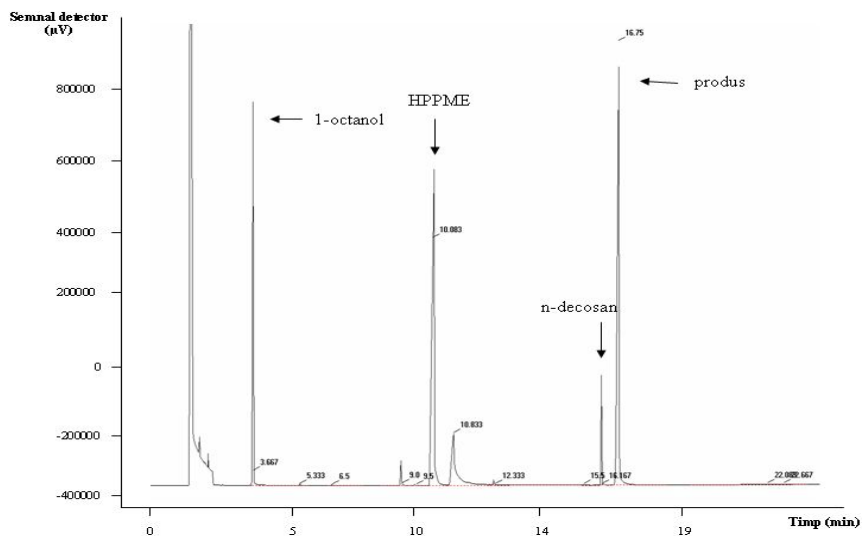


Figura 2.5. Cromatograma amestecului de la reacția de transesterificare catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens*.



În cazul altor substraturi aromatice, cum este acidul ferulic, substituentul metoxi și dubla legătură din catena laterală, conjugată cu inelul aromatic, poate afecta legarea în centrul activ al enzimei, pentru formarea intermediarului acil-enzimă. Activitatea enzimatică poate fi influențată în acest caz de efecte electronice sau sterice. Reactivitatea grupării carboxilice poate fi afectată de substituții nucleului aromatic cu efect donator de electroni, limitând astfel atacul nucleofil al alcoolului. Se pare că prezența simultană a unei duble legături în catena laterală, conjugată cu ciclul aromatic și a unei grupări hidroxil în poziția *para* inhibă lipaza. Acest fenomen se datorează mai mult unui efect electronic decât unui efect steric, deși efectul steric nu poate fi exclus. Prezența mai multor grupări hidroxil la ciclul benzenic inhibă de asemenea esterificarea grupării acide, dacă aceasta din urmă este conjugată cu ciclul, fie prin legare directă de ciclu, fie printr-o dublă legătură. Absența conjugării și a dublei legături în catena laterală face esterificarea posibilă. Efectele electronice inductive pot și ele modifica reactivitatea grupării carboxilice. În concluzie, prezența simultană a grupărilor hidroxil și a dublei legături în catena laterală face esterificarea mult mai dificilă. Compton și alții au raportat obținerea esterului octilic al acidului ferulic cu Novozyme 435 la 60°C în *tert*-butanol, însă randamentul obținut a fost foarte mic, doar în jur de 13% după 300 de ore de reacție [139], ceea ce face procesul ineficient din punct de vedere economic.

Schema de reacție este dată în Figura 2.6, iar rezultatele reacțiilor de esterificare a 1-octanolului cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic (HPPA) și 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil, obținute pe baza analizelor gaz cromatografice ale probelor prelevate la diferiți timpi de reacție, sunt prezentate în Tabelul 2.2 și 2.3. Activitățile specifice pentru reacția de transesterificare, calculate după un timp de reacție de 3 ore, au fost folosite pentru realizarea Figurii 2.7.

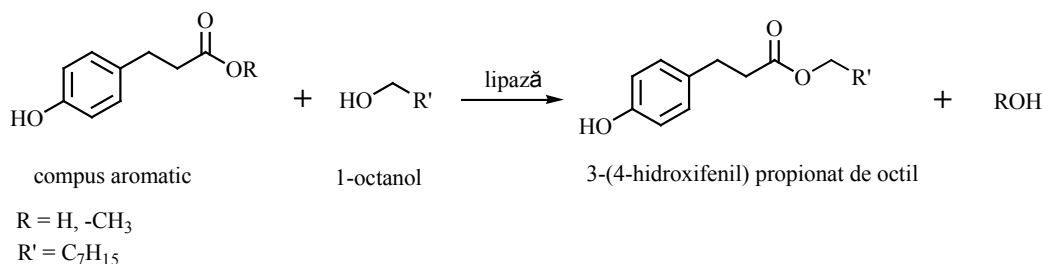


Figura 2.6. Reacția de acilare a 1-octanolului cu substratul fenolic, catalizată de diferite lipaze native.

Tabelul 2.2. Esterificarea 1-octanolului cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic (HPPA) în *tert*-butanol, prin biocataliză cu diferite lipaze native.

Biocatalizator	Timp (h)	$\eta_{\text{ester}}$ (%)	Activitate totală ( $\mu\text{moli/h/mg}$ enzimă)	Activitate specifică ( $\mu\text{moli/h/mg}$ proteină)
<i>Candida antarctica</i> B	1	1	0,007	1,04
	3	2	0,019	2,78
	6	4	0,032	4,69
	24	23	0,047	6,79
	48	35	0,037	5,30
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	1	0,032	1,59
	3	2	0,023	1,12
	6	3	0,023	1,12
	24	13	0,026	1,25
	48	22	0,023	1,13
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	0,240	0,06
	3	4	0,250	0,06
	6	9	0,290	0,07
	24	42	0,340	0,09
	48	54	0,230	0,06

Tabelul 2.3. Transesterificarea 1-octanolului cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil (HPPME) în *tert*-butanol, prin biocataliză cu diferite lipaze native.

Biocatalizator	Timp (h)	$\eta_{\text{ester}}$ (%)	Activitate totală ( $\mu\text{moli/h/mg}$ enzimă)	Activitate specifică ( $\mu\text{moli/h/mg}$ proteină)
<i>Candida antarctica</i> B	1	2	0,008	1,09
	3	3	0,009	1,30
	6	5	0,013	1,95
	24	9	0,018	2,60
	48	21	0,022	3,22
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	5	0,032	1,59
	3	6	0,019	0,94
	6	8	0,013	0,62
	24	9	0,007	0,35
	48	10	0,005	0,23
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	5	0,130	0,55
	3	9	0,140	0,58
	6	10	0,060	0,25
	24	79	0,170	0,66
	48	88	0,090	0,36

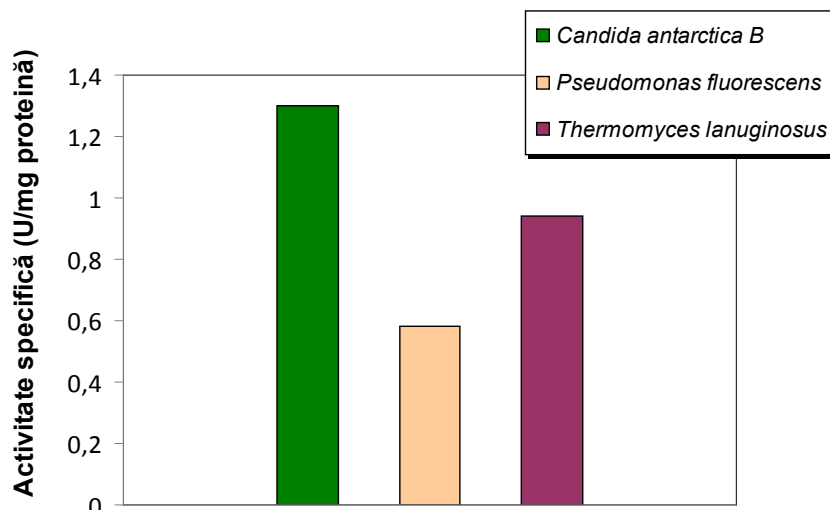


Figura 2.7. Activitatea specifică a diferitelor lipaze native în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil (HPPME) în *terț*-butanol, la 40°C, după 3 ore de reacție.

S-a demonstrat că în reacțiile de transesterificare a 1-octanolului cu compușii aromatici doar lipazele din *Candida antarctica B*, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens* prezintă activitate catalitică. Cea mai eficientă lipază a fost cea din *Candida antarctica B*, urmată de lipaza din *Thermomyces lanuginosus* și apoi cea din *Pseudomonas fluorescens*.

Se poate concluziona că specificitatea lipazelor testate este aceeași atât pentru esterul alifatic cât și pentru esterul aromatic, dar valorile activităților specifice sunt mult mai mari în reacția cu esterul alifatic decât în reacția cu esterul aromatic, chiar dacă în cea de-a doua reacție cantitatea de enzimă utilizată a fost de 10 ori mai mare și timpul de reacție mai îndelungat. Acest lucru poate fi datorat unor probleme de împiedicare sterică la centrul activ al enzimei din cauza nucleului aromatic, voluminos și rigid, care probabil interacționează mai greu cu centrul activ al lipazei.

### 2.2.3. Specificitatea lipazelor native pentru hidrații de carbon

Specificitatea lipazelor native pentru carbohidrați a fost determinată în reacții de transesterificare, prin înlocuirea alcoolului primar utilizat anterior (1-octanol), cu carbohidrați având lungimea catenei și secvență de monozaharide diferită. Ca biocatalizatori s-au utilizat lipazele native din *Candida antarctica B*, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens*, care au demonstrat cea mai mare eficiență în reacțiile de acilare studiate anterior.

### 2.2.3.1. Studiul acilării carbohidraților cu laurat de vinil

Schema de reacție este prezentată în Figura 2.8.

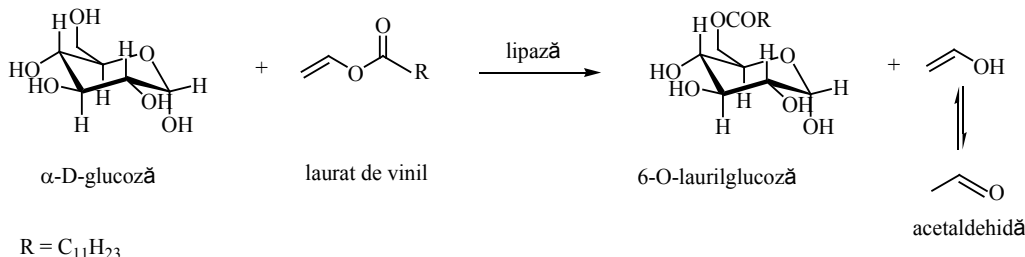


Figura 2.8. Reacția de transesterificare a  $\alpha$ -D-glucozei cu laurat de vinil catalizată de diferite lipaze native.

Zaharurile testate au fost mono-, di- și oligozaharide cu lungimea catenei și secvență diferită și anume:  $\alpha$ -D-glucoză, zaharoză, lactoză, inulină (amestec de oligozaharide cu DP = 2 – 7, cele mai abundente fiind cele cu DP = 3, 4 și 5), și maltodextrine (DE = 8). Amestecul de solvenți format din 10% dimetilsulfoxid și 90% *tert*-butanol a fost ales pentru a asigura atât o solubilitate ridicată a zaharurilor cât și o activitate rezonabilă a lipazei. Selecția mediului de reacție este întotdeauna dificilă pentru compușii foarte polari cum sunt zaharurile și derivații acestora. *tert*-butanolul a fost de multe ori ales ca mediu de reacție datorită capacității ridicate de solvatare a esterilor de zaharuri și datorită cerinței de a folosi în industria alimentară solvenți cu toxicitate cât mai mică. Pentru solubilizarea zaharurilor a fost necesară utilizarea unui co-solvent mai hidrofil, cum este dimetilsulfoxidul.

Amestecurile de reacție au fost analizate prin spectrometrie de masă, utilizând tehnica MALDI-TOF. Analizele de masă au arătat formarea monoesterilor, pentru toate zaharurile testate. În cazul inulinei și maltodextrinei, au fost detectați produși la grade de polimerizare între 2 și 5.

Pentru exemplificare, în Figura 2.9 este prezentat spectrul de masă al amestecului de reacție cu lactoza, efectuat în mod ion pozitiv (+), în care pot fi observați atât lactoza cât și monolauratul de lactoză format în urma reacției.

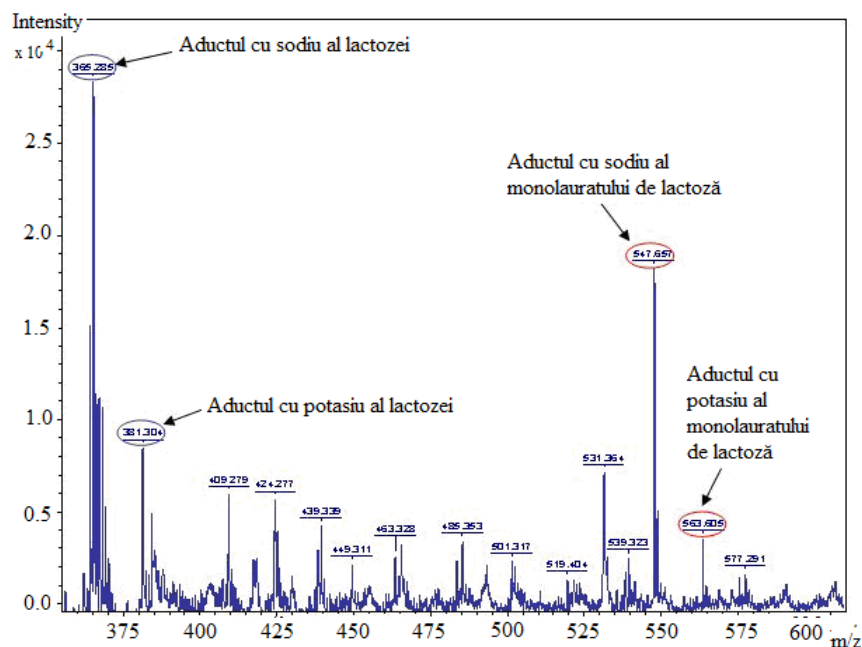


Figura 2.9. Spectrul de masă, în mod ion pozitiv, al amestecului de reacție la transesterificarea lactozei cu laurat de vinil catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens*, după 72 ore de reacție.

În cazul reacției de transesterificare a glucozei, conversiile au fost calculate prin analiza gaz-cromatografică a cantității de laurat de vinil rămasă nereacționată după 24 de ore de reacție, în timp ce pentru celelalte zaharuri ele au fost estimate pe baza spectrelor de masă MALDI-TOF, după 72 de ore de reacție (cf. Cap. 3.3.3). Aceste conversii au fost utilizate pentru a calcula activitățile specifice ale lipazelor native studiate pentru reacția de acilare a zaharurilor neprotejate. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.4.

Tabelul 2.4. Reacția de transesterificare a  $\alpha$ -D-glucozei, zaharozei, lactozei, inulinei și maltodextrinelor cu laurat de vinil, catalizată de lipazele din *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens*, după 72h de reacție.

Carbohidrat	Biocatalizator	Conversie (%)	Activitate specifică ( $\mu\text{moli/h/mg}$ proteină)
Glucoză	<i>P. fluorescens</i>	76 <sup>a</sup>	2,482
	<i>T. lanuginosus</i>	54 <sup>a</sup>	2,776
Zaharoză	<i>P. fluorescens</i>	16	0,1
	<i>T. lanuginosus</i>	39	0,4
Lactoză	<i>P. fluorescens</i>	41	0,25
	<i>T. lanuginosus</i>	30	0,3
Maltodextrine	<i>P. fluorescens</i>	20	0,02
	<i>T. lanuginosus</i>	9	0,015
Inulină	<i>P. fluorescens</i>	8	0,02
	<i>T. lanuginosus</i>	5	0,02

<sup>a</sup> după 24 de ore de reacție

Cea mai mare activitate s-a înregistrat în cazul  $\alpha$ -D-glucozei, urmată de dizaharide, iar cel mai puțin reactive au fost oligozaharidele. Acest lucru se datorează faptului că glucoza, fiind o moleculă mai mică, ajunge mai ușor la centrul activ al enzimei. Lipazele din *Pseudomonas fluorescens* și *Thermomyces lanuginosus* au avut activitate catalitică în reacțiile cu toate zaharurile studiate. Pe ansamblu, în reacția de transesterificare dintre lauratul de vinil și zaharurile studiate, cele mai bune rezultate s-au obținut cu lipaza din *Thermomyces lanuginosus*.

În cazul tuturor reacțiilor catalizate de lipaza din *Candida antarctica B*, s-au observat în spectrele de masă picuri  $m/z = 387$  (aductul cu sodiu) care pot corespunde unor esteri formați cu sorbitolul sau manitolul (Figura 2.10). Deoarece este cunoscut faptul că acești alditoli sunt folosiți ca aditivi în soluțiile enzimaticе, soluția de lipază *Candida antarctica B* folosită în reacții a fost supusă unei analize prin cromatografie cu schimb de anioni (HPAEC/PAD), metodă prin care au fost identificate cantități mari de sorbitol respectiv manitol.

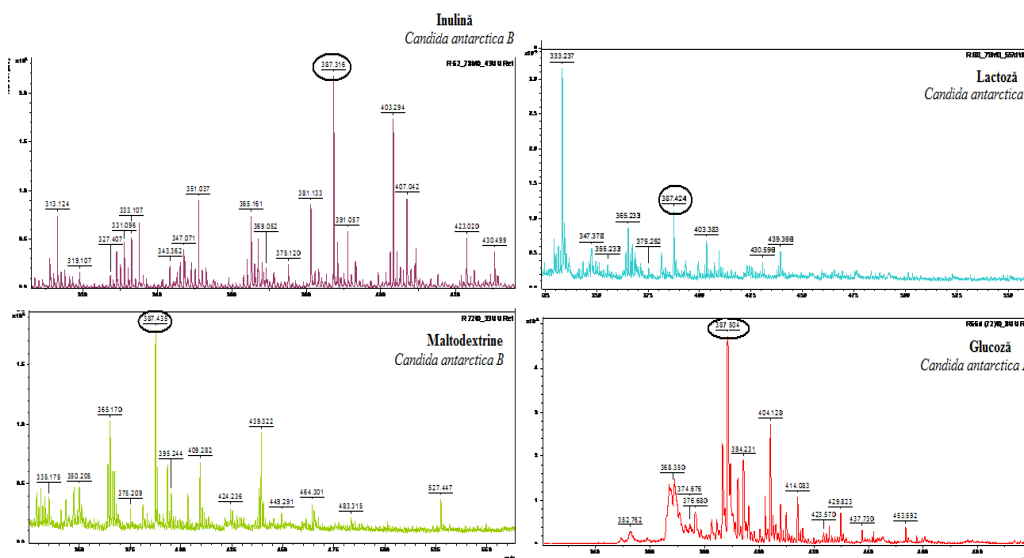


Figura 2.10. Spectrele de masă, în mod ion pozitiv, pentru reacțiile de acilare a zaharurilor cu lauratul de vinil catalizate de lipaza din *Candida antarctica B*, după 72h de reacție.

Astfel acești compuși care sunt mai reactivi decât zaharurile, datorită structurii liniare în comparație cu structura ciclică a zaharurilor, au reacționat cu lauratul de vinil, formându-se esterii corespunzători cu  $m/z = 387$  (aductul cu sodiul). Astfel se explică lipsa activității catalitice a lipazei din *Candida antarctica B* în reacțiile de transesterificare a zaharurilor studiate.

### 2.2.3.2. Studiul acilării carbohidraților cu compuși aromatici

Acest studiu s-a realizat cu aceleași zaharuri care au fost utilizate pentru reacția cu laurat de vinil, folosind ca agent de acilare 3-(4-hidroxifenil)-propionatul de metil. Schema reacției cu glucoza este prezentată în Figura 2.11.

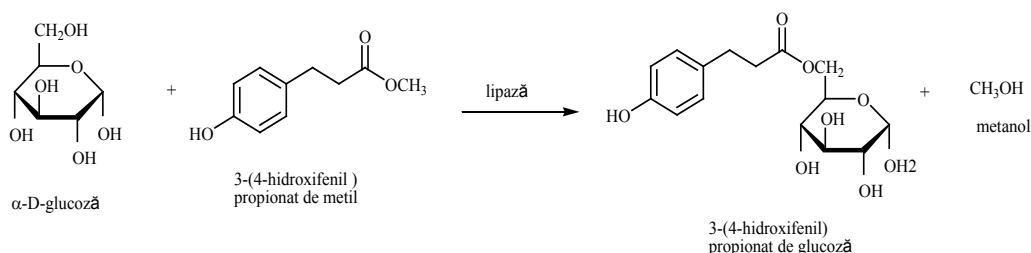


Figura 2.11. Reacția de transesterificare a  $\alpha$ -D-glucozei cu 3-(4-hidroxiifenil) propionatul de metil catalizată de diferite lipaze native.

Spectrele de masă ale probelor prelevate după 72h de reacție au arătat formarea produșilor de reacție pentru toate zaharurile studiate, dar nu și pentru toate lipazele testate. Astfel lipazele din *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens* au reacționat cu toate zaharurile utilizate formând esterii corespunzători, în timp ce în cazul reacțiilor cu lipaza din *Candida antarctica* B s-au observat în spectrele de masă picuri moleculare cu  $m/z = 329$  care corespund esterilor formați cu sorbitolul sau manitolul (Figura 2.13), ceea ce explică lipsa activității acestei lipaze în reacțiile cu zaharurile studiate. Glucoza, zaharoza și inulina au reacționat mai bine în condițiile date decât maltodextrinele și lactoza. Pentru exemplificare, în Figura 2.12 sunt ilustrate spectrele de masă înregistrate după 72h de reacție, de la reacțiile inulinei cu HPPME, în 10% DMSO/*tert*-butanol, catalizate de cele trei lipaze testate, cât și de la reacția fără enzimă (cf. Cap. 3.4.2).

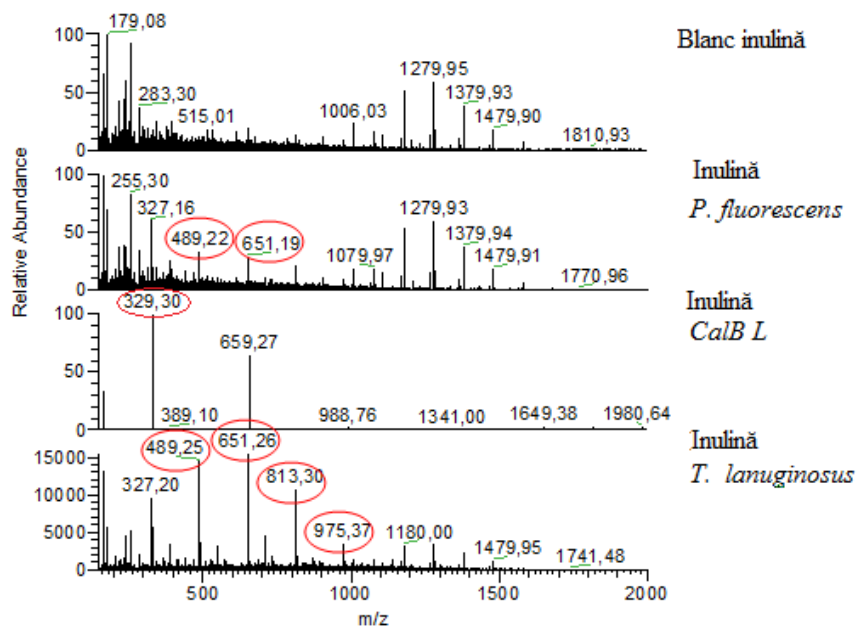


Figura 2.12. Spectrele UPLC MS pentru reacțiile de transesterificare ale inulinei cu HPPME în 10% DMSO/*tert*-butanol, catalizate de lipazele din *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus*, după 72h de reacție.

Se poate observa că în reacția fără adaos de enzimă (blanc) nu s-au detectat produși de reacție, ceea ce demonstrează că în reacțiile catalizate de lipaze acestea sunt responsabile de formarea esterilor aromatici cu inulina. În reacția catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* s-au format monoesteri în cazul oligozaharidelor cu grade de polimerizare 2 și 3, iar în reacția catalizată de lipaza din *Thermomyces lanuginosus* au fost detectați produși ai oligozaharidelor cu grade de polimerizare între 2 și 5. În spectrul UPLC MS al amestecului de reacție obținut cu lipază din *Candida antarctica B* se poate observa doar compusul cu  $m/z = 329$ , care corespunde esterilor cu sorbitol și manitol (Figura 2.13).

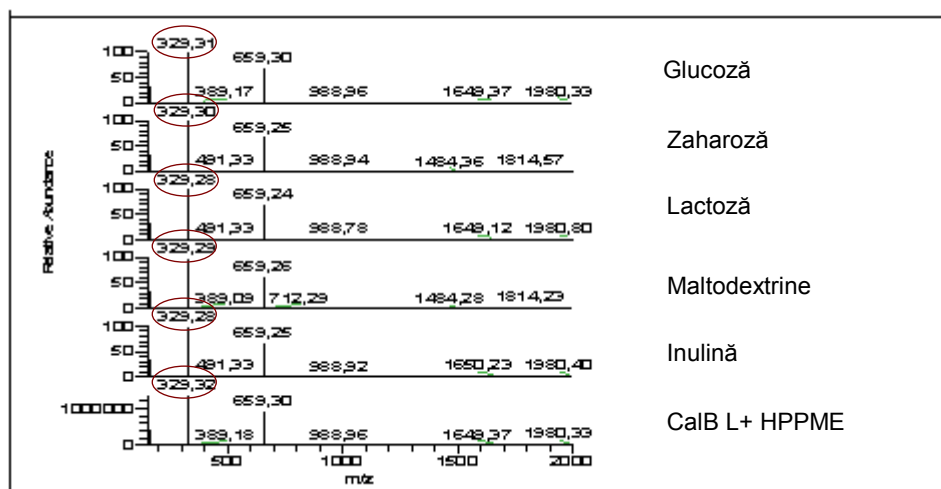


Figura 2.13. Spectrele UPLC MS pentru reacțiile de acilare a zaharurilor cu HPPME, catalizate de lipaza din *Candida antarctica B*, după 72h de reacție.

Estimările cantitative au arătat conversii foarte mici, deși au fost studiate diferite condiții de reacție (diferite medii de reacție, diferite concentrații de zahar, diferite concentrații de biocatalizator, diferite rapoarte molare). În Tabelul 2.5 sunt redate, pentru exemplificare, conversiile obținute după 72h de reacție, la transesterificarea zaharurilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil în 10% dimetilsulfoxid/*tert*-butanol, la raport molar 1:3, 20 mg/mL zahar, 10 unități lipază din *Thermomyces lanuginosus*.

Aceste rezultate conduc la ideea creșterii solubilității substratului în mediul de reacție, creștere ce poate fi realizată prin introducerea de grupări hidrofobe și ușor de îndepărtat ulterior, compatibilizând astfel substratul cu medii de reacție mai hidrofobe, mediile de reacție polare fiind toxice pentru enzimă. De asemenea, lipaza din *Candida antarctica B* pare a fi foarte activă față de alditoli, astfel că studiul obținerii unor esteri aromatici ai alditolilor prin cataliză cu lipaze reprezintă o oportunitate pentru o clasă nouă de compuși.

Derivatizarea chimică a zaharurilor cu grupări protectoare hidrofobe și esterificarea enzimatică ulterioară a intermediarilor, urmată de îndepărtarea grupărilor protectoare în mediu acid, reprezintă o metodă chemo-enzimatică prezentată în literatură pentru obținerea esterilor alifatici de zaharuri [47 – 52], care poate reprezenta o alternativă și pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor.



Tabelul 2.5. Reacția de transesterificare a  $\alpha$ -D-glucozei, zaharozei, lactozei, inulinei și maltodextrinelor cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil catalizată de lipazele native din *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens* și *Candida antarctica* B, după 72h de reacție.

Carbohidrat	Biocatalizator	Conversie (%)
$\alpha$ -D-glucoză	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
	<i>Candida antarctica</i> B	1
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6
zaharoză	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
	<i>Candida antarctica</i> B	< 1
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	4
lactoză	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
	<i>Candida antarctica</i> B	< 1
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	3
inulină	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
	<i>Candida antarctica</i> B	< 1
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	4
maltodextrine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
	<i>Candida antarctica</i> B	< 1
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	2

#### 2.2.4. Concluzii

- Dintre zece lipaze native testate, cele provenind din *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* și lipaza din pancreas de porc au demonstrat activitate catalitică în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil, în timp ce în reacția de acilare a 1-octanolului cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil, doar lipazele din *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens* au fost active catalitic.

- Dintre substraturile fenolice testate, doar 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil și acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic au dus la formarea produșilor de reacție în condițiile studiate.

- Specificitatea lipazelor testate a fost aceeași atât pentru esterul alifatic cât și pentru esterul aromatic, dar valorile activităților specifice au fost mult mai mari în reacția cu esterul alifatic decât în reacția cu esterul aromatic, ceea ce atestă că acizii aromatici sunt substraturi mai dificile în comparație cu acizii alifatici.

- Lipaza din *Thermomyces lanuginosus* a demonstrat specificitate pentru diferite zaharuri studiate și activitatea catalitică cea mai mare pentru reacția cu esterul aromatic ca donor acil. Lipaza din *Candida antarctica* B pare a fi foarte activă față de alditoli ca și substraturi, ceea ce reprezintă o posibilitate nouă în vederea obținerii unor esteri aromatici ai alditolilor.

### **2.3. Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol – gel și testarea preparatelor imobilizate ca biocatalizatori pentru reacții de acilare**

În ultimii ani, enzimele care interacționează dintr-o fază solidă, fie în formă imobilizată în diferite medii, fie în formă nativă în mediu de solvent organic cu conținut redus de apă, s-au bucurat de un interes din ce în ce mai mare. În plus, imobilizarea are ca rezultat îmbunătățirea stabilității termice, de pH sau operațională și o selectivitate mai bună, datorită influențelor favorabile asupra conformației centrului activ al enzimei. Lipazele sunt în mod special dispuse la asemenea modificări conformaționale, deoarece "capacul" hidrofoab pe care îl posedă și care obstrucționează accesul substratului la centrul activ poate fi îndepărtat în timpul imobilizării sau după imobilizare, având drept consecință creșterea activității.

O metodă generică de a prepara biocatalizatori eficienți și ușor de reutilizat o reprezintă încapsularea enzimelor în matrici sol-gel anorganice. Procesele sol-gel pot fi clasificate după natura precursorilor anorganici sau a alcoxidului. Metoda alcoxidului este mai importantă pentru încapsularea enzimei, pentru că reacțiile de hidroliză și cele de condensare au loc în condiții blânde, astfel că enzima nu este inactivată în timpul procesului. Sol-gelurile se obțin din alcoxi-silani prin reacții de hidroliză și condensare-polimerizare cu formarea unei structuri poroase de gel. Selecția potrivită a precursorilor și aditivilor pentru procesul sol-gel poate duce la obținerea unor materiale robuste, care pot fi concepute pentru o aplicație specifică dată. Un alt avantaj al încapsulării enzimelor în sol-gel este o posibilă stabilizare a structurii terțiare a acestora, datorită structurii relativ rigide a gelului obținut. În acest context și datorită faptului că studii anterioare au arătat că lipazele imobilizate în matrici de silice reprezintă biocatalizatori eficienți pentru reacțiile de esterificare și transesterificare, în acest studiu au fost evaluate lipazele din *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens* și *Candida antarctica* B, imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel.

#### **2.3.1. Studiul eficienței biocatalitice a lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel în reacții de esterificare**

Pentru acest studiu s-a utilizat lipaza din *Pseudomonas fluorescens*, care a fost supusă imobilizării prin metoda de entrapare în sol-gel, utilizând amestecuri de doi și respectiv trei silani precursori în diferite rapoarte molare și anume tetrametoxisilan și unul sau doi trimetoxisilani cu formula generală  $R-Si(OCH_3)_3$ , R fiind o grupare alchil sau aril nehidrolizabilă. A fost de asemenea testată eficiența structurii lichidelor ionice utilizate ca aditivi de imobilizare. Au fost investigate lichide ionice cu cation de imidazoliu cu diferite hidrofobități și anioni organici și anorganici.

Utilizarea lichidelor ionice ca aditivi poate avea influențe multiple atât asupra procesului de entrapare cât și asupra eficienței catalitice a enzimei imobilizate. Polaritatea lichidelor ionice și miscibilitatea cu silanii precursori și apa pot influența omogenitatea amestecului supus procesului sol-gel, caracteristicile de gelificare și structura matricii hibride de sol-gel. În ceea ce privește eficiența catalitică, a fost demonstrat că pretratarea lipazelor cu lichide ionice poate avea ca rezultat o activitate și stabilitate îmbunătățită și deci se poate presupune un asemenea efect în

cursul imobilizării lipazelor prin metoda sol-gel, la utilizarea lichidelor ionice ca aditivi [8].

Preparatele imobilizate prin entrapare în sol-gel, cu lichide ionice sau cu PEG ca aditivi de imobilizare, au fost testate într-o reacție în care este binecunoscută eficiența biocatalitică a lipazelor, acilarea 1-octanolului cu acid lauric în mediu de izooctan, la 40°C (Tabelul 2.6 și Tabelul 2.7). Activitățile și randamentele de regăsire au fost calculate după 24 de ore de reacție.

*Tabelul 2.6.* Influența compoziției matricii de sol-gel și a naturii aditivului în reacția de esterificare a 1-octanolului cu acid lauric, catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel.

Silani precursori	Aditivi	$\eta_{\text{ester}}$ (%)	Activitate totală ( $\mu\text{moli/h/mg}$ enzimă)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)
Enzima nativă	-	85	0,892	100
MeTMOS:TMOS (1:1)	OmimBF <sub>4</sub>	41	0,081	24
PrTMOS:TMOS (1:1)	OmimBF <sub>4</sub>	42	0,085	60
OcTMOS:TMOS (1:1)	OmimBF <sub>4</sub>	78	0,147	129
PhTMOS:TMOS (1:1)	OmimBF <sub>4</sub>	16	0,034	30
PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1:1:1)	PEG	84	0,177	126
PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1,6:0,4:1)	PEG	89	0,188	137
PhTMOS:MeTMOS:TMOS (0,4:1,6:1)	PEG	83	0,174	113

*Tabelul 2.7.* Influența naturii lichidului ionic utilizat ca aditiv în reacția de esterificare a 1-octanolului cu acid lauric, catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel pe bază de silani precursori OcTMOS și TMOS (în raport molar 1:1).

Silani precursori	Aditivi	$\eta_{\text{ester}}$ (%)	Activitate totală ( $\mu\text{moli/h/mg}$ enzimă)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)
Enzima nativă	-	85	0,892	100
OcTMOS:TMOS (1:1)	EmimBF <sub>4</sub>	40	0,085	66
	PmimBF <sub>4</sub>	59	0,122	86
	BmimBF <sub>4</sub>	51	0,108	94
	HmimBF <sub>4</sub>	91	0,187	165
	OmimBF <sub>4</sub>	78	0,147	129
	BmimPF <sub>6</sub>	81	0,169	81
	OmimPF <sub>6</sub>	26	0,054	43
	BmimNTf <sub>2</sub>	39	0,081	69
	EmimCOOCH <sub>3</sub>	58	0,123	107
	EmimCOOCF <sub>3</sub>	89	0,187	141

Randamentele de regăsire din Tabelul 2.7 au fost utilizate pentru graficul din Figura 2.14, care ilustrează influența lichidului ionic utilizat ca aditiv la imobilizare asupra activității catalitice a preparatelor enzimatiche obținute.

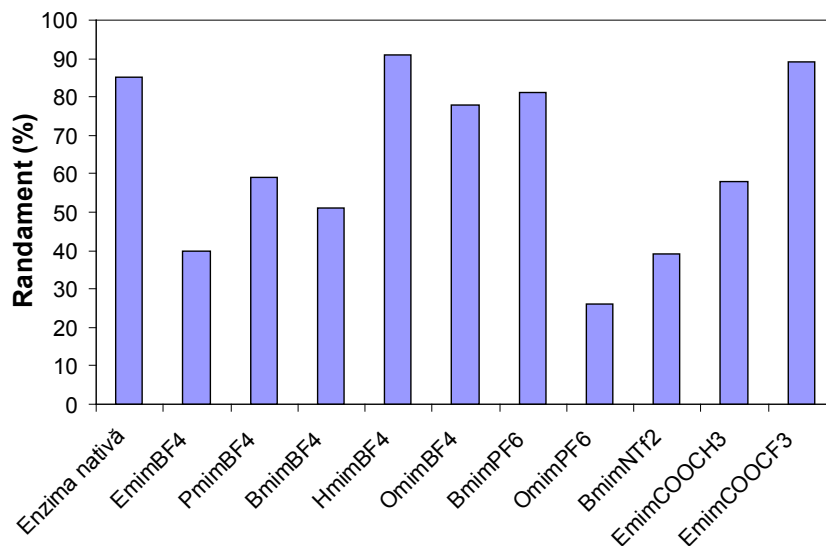


Figura 2.14. Influența structurii lichidului ionic asupra randamentului în ester în reacția de acilare a 1-octanolului cu acidul lauric, catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel, după 24 ore de reacție.

Imobilizarea lipazelor în matrici sol-gel formate cu amestecuri de trei silani precursori și PEG ca aditiv de imobilizare a avut ca rezultat biocatalizatori cu eficiență catalitică ridicată, în special la un raport molar mai ridicat de feniltrimetoxisilan. De asemenea utilizarea lichidelor ionice ca aditivi de imobilizare a dus la valori mari ale activității, în special în cazul preparatului obținut cu octiltrimetoxisilan [206].

În cazul preparatului obținut cu octiltrimetoxisilan și tetrametoxisilan, în raport molar 1:1, cu diferite lichide ionice ca aditivi, rezultatele arată că pentru lichidele ionice cu anion BF<sub>4</sub> activitatea de esterificare crește cu creșterea lanțului alchil din partea cationică. Randamentele de regăsire a activității totale după imobilizare au fost în general mai mari de 100%, cea mai mare valoare fiind înregistrată la utilizarea HmimBF<sub>4</sub> ca aditiv [192].

### 2.3.2. Studiul eficienței biocatalitice a lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel în reacții de transesterificare

Reacțiile de sinteză a esterilor prin transesterificare au, comparativ cu esterificările directe, avantajul faptului că nu se obține apă ca produs secundar și prin urmare controlul cantității de apă din sistem se poate realiza mai ușor. Pentru realizarea acestor reacții au fost investigate două lipaze microbiene, din *Thermomyces lanuginosus* și din *Candida antarctica* B, care au fost imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel.

Lipaza din *Thermomyces lanuginosus* a fost supusă imobilizării utilizând amestecuri de doi respectiv trei silani precursori și anume tetrametoxisilan și unul sau doi trimetoxisilani cu formula generală R-Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, R fiind o grupare alchil sau aril nehidrolizabilă, cu sau fără PEG ca aditiv de imobilizare.

Eficiența catalitică a preparatelor imobilizate obținute cu diferiți silani precursori a fost investigată în reacția de acilare a 1-octanolului, utilizând ca agent de acilare atât un ester fenolic (HPPME), care nu este un substrat natural pentru lipază, cât și un ester alifatic reactiv (laurat de vinil). Aceeași reacție a fost efectuată și cu lipaza nativă, pentru a permite calculul eficienței de imobilizare exprimată prin activitatea specifică relativă, care reprezintă raportul dintre activitatea specifică a enzimei imobilizate și activitatea specifică a enzimei native. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.8, iar pe baza acestuia s-a realizat Figura 2.15.

*Tabelul 2.8.* Influența silanilor precursori asupra randamentului de imobilizare și activitatea specifică a lipazei din *Thermomyces lanuginosus*, native și imobilizate prin entrapare în sol-gel, în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil (după 1 minut de reacție), respectiv HPPME (după o oră de reacție).

Silani precursori (raport molar)	$\eta_{\text{imob.}}$ (%)	Substrat	Activitate specifică <sup>a</sup> (U/mg proteină)	Activitate relativă <sup>b</sup>
Enzima nativă	-	Laurat de vinil	133	1,00
		HPPME	1,59	1,00
PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1,6:0,4:1)	67	Laurat de vinil	245	1,84
		HPPME	n.d. <sup>c</sup>	-
OcTMOS:TMOS (1:1)	91	Laurat de vinil	298	2,24
		HPPME	0,18	0,11
OcTMOS:TMOS (2:1)	87	Laurat de vinil	326	2,45
		HPPME	0,17	0,10
OcTMOS:TMOS (1:1) fără aditiv	93	Laurat de vinil	609	4,58
		HPPME	0,53	0,33
MeTMOS:TMOS (1:1)	98	Laurat de vinil	8	0,06
		HPPME	n.d. <sup>c</sup>	-
PrTMOS:TMOS (1:1)	89	Laurat de vinil	162	1,22
		HPPME	n.d.	-
PhTMOS:TMOS (1:1)	87	Laurat de vinil	198	1,49
		HPPME	n.d.	-
VTMOS:TMOS (1:1)	91	Laurat de vinil	207	1,55
		HPPME	n.d.	-
DMeDMOS:TMOS (1:1)	81	Laurat de vinil	259	1,95
		HPPME	n.d.	-
PhMeDMOS:TMOS (1:1)	91	Laurat de vinil	74	0,55
		HPPME	n.d.	-
(3-NH <sub>2</sub> Pr)TMOS:TMOS (1:1)	96	Laurat de vinil	10	0,07
		HPPME	n.d.	-
iBuTMOS:TMOS (1:1)	96	Laurat de vinil	112	0,84
		HPPME	n.d.	-

<sup>a</sup>Unități de activitate (U) exprimate ca  $\mu\text{moli produs/min}$ , în cazul reacției cu lauratul de vinil și  $\mu\text{moli produs/h}$ , în cazul reacției cu HPPME.

<sup>b</sup>Calculat ca raportul dintre activitatea specifică a enzimei imobilizate și activitatea specifică a enzimei native.

<sup>c</sup>nedetectabilă.

Din punct de vedere al randamentului de imobilizare, care reprezintă raportul dintre cantitatea de proteină inclusă în matricea de sol-gel și cantitatea de proteină supusă imobilizării, se poate observa că cel mai scăzut randament de imobilizare s-a obținut în cazul sistemului cu trei silani precursori. În cazul sistemelor binare randamentele de imobilizare au fost de peste 80%.

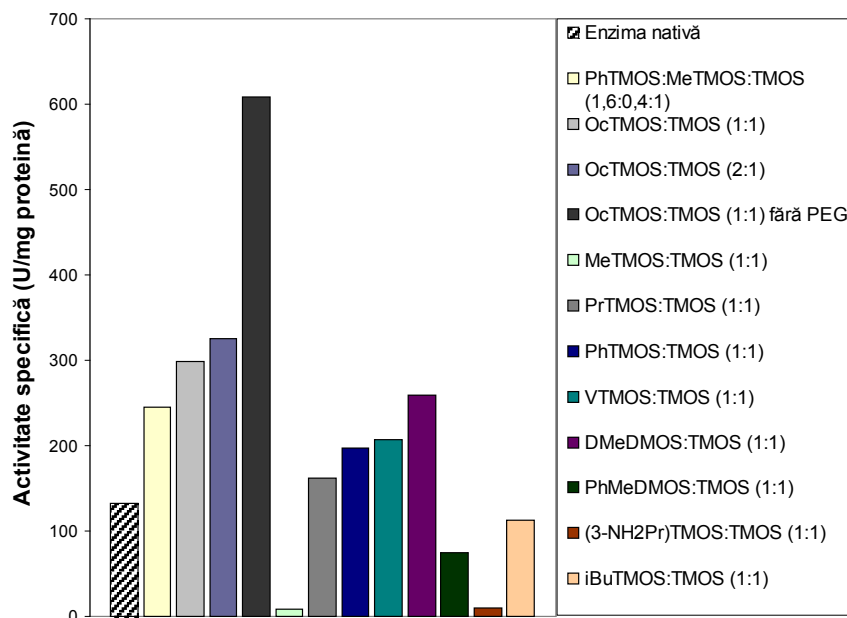


Figura 2.15. Activitatea specifică a lipazei din *Thermomyces lanuginosus* imobilizată prin metoda de entrapare în sol-gel cu diferiți silani precursori, în reacția de transesterificare dintre 1-octanol și laurat de vinil, după 1 minut de reacție.

Se observă că toate preparatele obținute prin metoda de entrapare în sol-gel au prezentat activitate catalitică în reacțiile de transesterificare cu laurat de vinil ca donor acil, dar majoritatea dintre ele nu au prezentat activitate catalitică în reacțiile cu HPPME. Chiar și în cazul preparatelor imobilizate care au demonstrat activitate catalitică pentru ambele substraturi, valorile activităților specifice au fost mult mai mari în reacția cu esterul alifatic. Specificitatea scăzută față de esterul fenolic ca și substrat poate fi datorată unor împiedicări sterice ale compusului fenolic cu structură aromatică, voluminoasă și rigidă, care duc la limitarea accesului la centrul activ al enzimei.

Preparatele imobilizate obținute cu diferiți silani precursori au demonstrat o influență considerabilă a structurii grupării nehidrolizabile asupra eficienței catalitice a acestora. În reacția de acilare a 1-octanolului cu lauratul de vinil, unele preparate imobilizate au demonstrat activități specifice mai mari în comparație cu enzima nativă (combinația de trei silani și combinațiile tetrametoxisilanului cu octiltrimetoxisilan, propiltrimetoxisilan, feniltrimetoxisilan, viniltrimetoxisilan și dimetildimetoxisilan), în timp ce altele au prezentat activitate mai mică (combinațiile tetrametoxisilanului cu metiltrimetoxisilan, 3-aminopropiltrimetoxisilan, fenil-metiltrimetoxisilan și izobutiltrimetoxisilan). Inactivarea parțială a enzimei în timpul procesului de imobilizare nu este un fenomen neobișnuit deoarece condițiile de imobilizare pot genera modificări ale conformației situsului activ sau chiar denaturarea structurii enzimei. În cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel cu implicarea metoxisilanului ca și precursor, când rezultă metanol ca produs secundar în reacția de policondensare, poate apărea un efect de inhibare. Prezența grupării octil nehidrolizabile în matricea de sol-gel, care induce o hidrofobicitate crescută a

matricei, a dus la cele mai ridicate valori ale activității. Cea mai mare eficiență catalitică a fost demonstrată de preparatul obținut cu OctTMOs:TMOS (1:1) fără aditiv de imobilizare.

În reacțiile cu esterul fenolic ca donor acil, doar preparatele imobilizate având grupări octil în compoziție au avut activitate catalitică. Cea mai mare activitate relativă comparativ cu lipaza nativă a avut-o preparatul imobilizat obținut fără aditiv, care a prezentat o activitate relativă de 33%. Este binecunoscută activarea lipazelor în medii hidrofobe, deci și grupările hidrofobe aparținând matricei sol-gel ar putea acționa în acest sens. O posibilă explicație pentru absența activității majorității preparatelor imobilizate ar putea fi o restricție însemnată a accesului inelului aromatic voluminos în matricea de sol-gel și prin urmare imposibilitatea difuziei la centrul activ al enzimei.

Lipaza din *Candida antarctica* B a fost imobilizată prin metoda de entrapare în sol-gel folosind aceeași rețetă, iar ca silani precursori un amestec binar de tetrametoxisilan și un alchiltrimetoxisilan. Activitățile specifice obținute în reacția de acilare a 1-octanolului cu esterul aromatic (HPPME), după o oră de reacție, sunt prezentate în Figura 2.16.

Preparatul pe bază de octiltrimetoxisilan a fost cel mai eficient, urmat de cele cu izobutiltrimetoxisilan și aminopropiltrimetoxisilan. Se observă un efect de activare în cazul preparatului cu grupare octil nehidrolizabilă, în sensul că preparatul imobilizat respectiv a avut activitate specifică de trei ori mai mare decât enzima nativă.

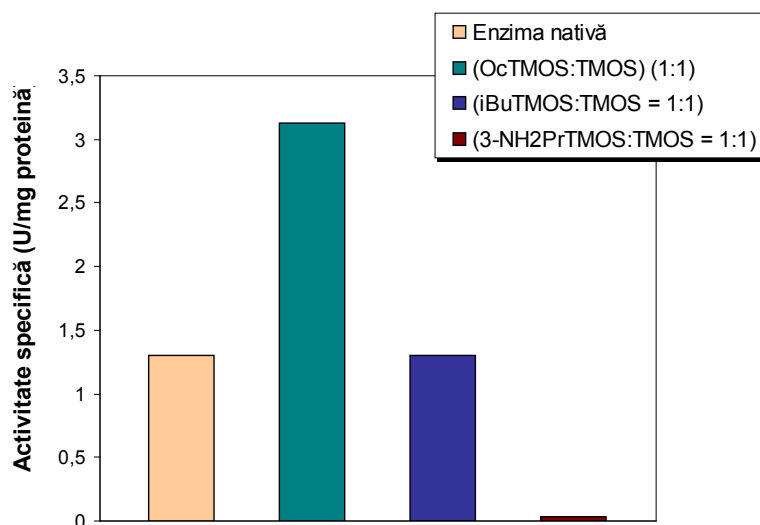


Figura 2.16. Activitatea specifică a lipazei din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol-gel cu diferiți silani precursori, în reacția de transesterificare dintre 1-octanol și HPPME, după 1h de reacție.

Este evident faptul că eficiența imobilizării este influențată în mare măsură și de natura enzimei, nu numai de natura silanilor și rețeta de imobilizare aleasă. Prin compararea datelor din Tabelul 2.8 și Figura 2.16 rezultă că, folosindu-se aceiași precursori (tetrametoxisilan și octiltrimetoxisilan) și aceleași condiții de

imobilizare, preparatul obținut cu lipază din *Candida antarctica* B a avut o activitate specifică de 6 ori mai mare decât cel din *Thermomyces lanuginosus*, în condițiile în care activitățile celor două enzime native au fost aproximativ egale [193]. Așadar, pentru obținerea esterilor aromatici, trebuie utilizată lipaza din *Candida antarctica* B.

### 2.3.3. Concluzii

- S-a realizat imobilizarea eficientă a mai multor lipaze microbiene prin metoda de entrapare în sol-gel, folosind amestecuri binare și ternare de silani precursori, în diferite rapoarte molare.

- Preparatele imobilizate cu lichide ionice ca aditivi au dovedit activitate de esterificare ridicată și randamente de regăsire a activității totale după imobilizare mai mari de 100%, în majoritatea cazurilor, creșterea lungimii catenei hidrocarbonate din lanțul alchil legat de gruparea imidazolică având efect favorabil asupra activității.

- Pentru reacția de acilare a 1-octanolului cu laurat de vinil s-a observat influența favorabilă a unei matrici mai hidrofobe, conținând grupări octil nehidrolizabile, provenite din precursorul silanic.

- Acilarea 1-octanolului cu un ester aromatic (HPPME) are loc mult mai greu decât reacția similară cu esterul alifatic, dar preparatul cel mai activ a fost și în acest caz cel obținut pe bază de octiltrimetoxisilan. Natura enzimei care se supune imobilizării este foarte importantă, lipaza din *Candida antarctica* B imobilizându-se cu eficiență mult mai mare decât cea din *Thermomyces lanuginosus*.

## 2.4. Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor

În comparație cu esterii alifatici, care au fost intensiv studiați, sinteza esterilor aromatici este mult mai dificil de realizat prin reacții catalizate de lipaze. În afară de faptul că esterii și acizii aromatici sunt substraturi nenaturale pentru lipaze, accesul donatorilor acil care conțin o parte aromatică la situsul activ al lipazei este mai dificil, ceea ce are ca rezultat conversii mai mici [131]. Selecția riguroasă a lipazei și optimizarea parametrilor de reacție pot însă permite obținerea unor performanțe ridicate. Selecția mediului de reacție este întotdeauna dificilă pentru compușii cu polaritate ridicată, cum sunt zaharurile și derivații de zaharuri. *Terț*-butanolul a fost adesea ales ca mediu de reacție, datorită cerințelor de a evita folosirea solvenților toxici, în special pentru produse utilizate industria alimentară și datorită abilității sale pentru solvatarea esterilor de zaharuri [194, 118]. În cazul nostru, acest solvent a solubilizat esterul metilic al compusului aromatic și esterii alditolilor, dar pentru solubilizarea alditolului a fost nevoie de un co-solvent mai hidrofil cum este dimetilsulfoxidul.

Lipazele s-au dovedit a fi deosebit de interesante datorită unei specificități variate de substrat și a fost demonstrat faptul că ele sunt mult mai active față de alcoolii cu structură ramificată decât față de acizii cu structură ramificată [194]. Se cunoaște și faptul că lipazele preferă ca substraturi grupările hidroxilice primare, însă acționează și asupra celor secundare.



### 2.4.1. Studiul acilării alditolilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil

Au fost investigate două lipaze, din *Thermomyces lanuginosus* și din *Candida antarctica* B, sub formă nativă, de preparate comerciale imobilizate (Lipozyme TL IM și Novozyme 435) și de preparate imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel: TL (OctMOS:TMOS = 1:1, fără aditiv), C1 (OctMOS:TMOS = 1:1), C2 (iBuTMOS:TMOS = 1:1) și C3 (3-NH<sub>2</sub>PrTMOS:TMOS = 1:1), în reacțiile de acilare ale unor alditoli cu cinci, respectiv șase grupări hidroxil având orientare sterică diferită (xilitol, arabitol, sorbitol și manitol) cu un ester fenolic, 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil (HPPME), într-un sistem binar de solvent, 10% dimetilsulfoxid și 90% *terț*-butanol. Donorul de acil aromatic a fost cel selectat anterior pentru acilarea zaharurilor nederivatizate. Amestecul de solvenți a fost ales pentru a asigura atât o solubilitate ridicată a alditolilor cât și o activitate rezonabilă a lipazei.

Schema reacției de formare a monoesterilor alditolilor este reprezentată în Figura 2.17.

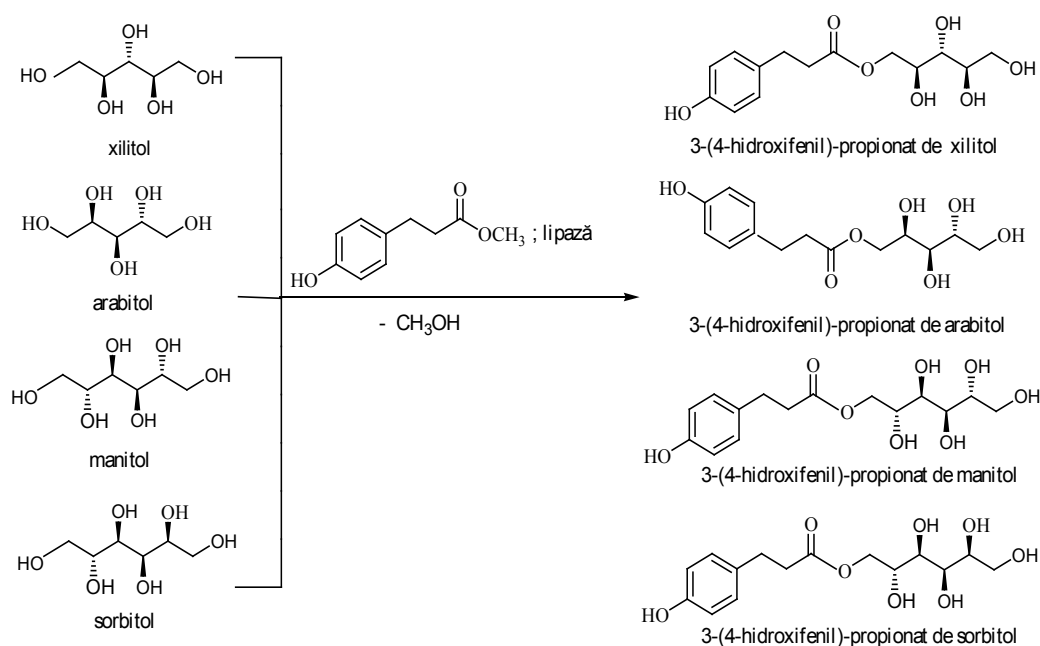


Figura 2.17. Acilarea xilitolului, arabitolului, manitolului și sorbitolului cu HPPME, catalizată de lipaze.

Într-o primă etapă, a fost determinată activitatea catalitică a lipazelor investigate în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu HPPME în *terț*-butanol, iar pe baza activității totale calculată în această reacție (Tabelul 2.9) s-a determinat cantitatea de biocatalizator utilizată pentru reacția de acilare a alditolilor.

Tabelul 2.9. Activitatea catalitică a lipazelor testate la transesterificarea 1-octanolului cu HPPME în *terț*-butanol, după o oră de reacție.

Biocatalizator	Activitate (U/mg enzimă)
Novozyme 435	0,03
Lipozyme TL IM	0,07
<i>Candida antarctica</i> B	0,008
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0,032
TL (OcTMOS:TMOS = 1:1, fără aditiv)	0,02
C1 (OcTMOS:TMOS = 1:1)	0,03
C2 (iBuTMOS:TMOS = 1:1)	0,013
C3 (3-NH <sub>2</sub> PrTMOS:TMOS = 1:1)	0,002

Reacțiile au fost realizate la 50°C, în *terț*-butanol și au fost oprite după 72 de ore, conversia determinându-se pe baza analizei HPLC, pe baza HPPME consumat în reacție. Rezultatele cele mai semnificative sunt prezentate în Figurile 2.18 și 2.19.

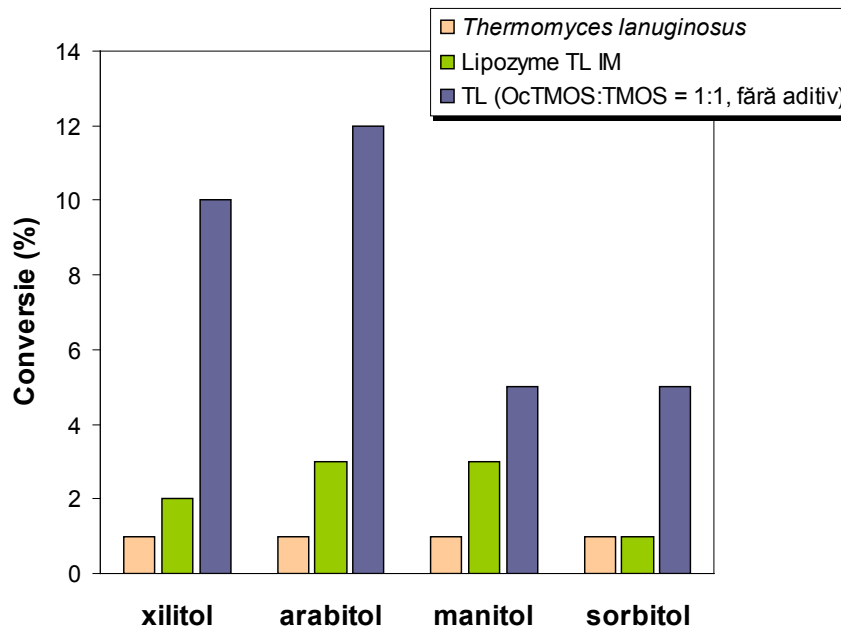


Figura 2.18. Influența tipului de biocatalizator asupra conversiei la acilarea alditolilor cu HPPME, catalizată de lipaza nativă, immobilizată comercial și immobilizată prin entrapare în sol-gel din *Thermomyces lanuginosus*, după 72 h de reacție.

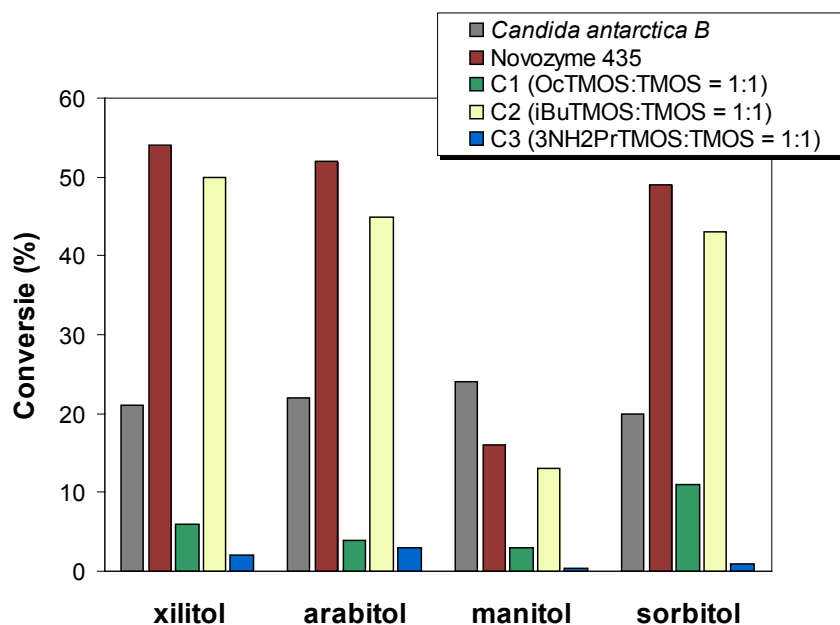


Figura 2.19. Influența tipului de biocatalizator asupra conversiei la acilarea alditolilor cu HPPME, catalizată de lipaza nativă, imobilizată comercial și imobilizată prin entrapare în sol-gel din *Candida antarctica B*, după 72 h de reacție.

Se poate observa că în cazul acestor substraturi lipaza *Candida antarctica B* a fost mult mai activă decât cea din *Thermomyces lanuginosus*, indiferent dacă a fost utilizată în formă nativă sau imobilizată. Deși specificitatea lipazelor studiate față de esterul fenolic este destul de redusă, prin prelungirea timpului de reacție s-au putut obține conversii de peste 50% în cazul lipazei din *Candida antarctica B*. În cazul lipazei din *Thermomyces lanuginosus*, preparatul imobilizat prin entrapare în sol-gel conținând o grupare hidrofobă (octil) nehidrolizabilă în matricea de silice a demonstrat o eficiență catalitică mai ridicată decât preparatul imobilizat comercial și decât lipaza nativă. Acest lucru atestă eficiența metodei de imobilizare prin entrapare în sol-gel. Lipazele dețin un "capac" hidrofob care obstrucționează transportul substratului la centrul activ al enzimei și care poate fi îndepărtat în mod favorabil în timpul procesului de imobilizare. Preparatul comercial din *Candida antarctica B* (Novozyme 435), imobilizat pe suport acrilic macroporos, a dus la cele mai ridicate conversii după 72 h de reacție, demonstrând performanțe catalitice excelente. Dintre preparatele din *Candida antarctica B* imobilizate prin entrapare în sol-gel, cea cu grupare nehidrolizabilă izo-butil s-a dovedit a fi cea activă în comparație cu ceilalți silani precursori și a avut o activitate comparabilă cu cea a preparatului imobilizat comercial (Novozyme 435). Așadar, în comparație cu substratul de 1-octanol, a fost înregistrată o diferență semnificativă, în sensul că creșterea hidrofobității matricei de sol-gel datorită prezenței unor grupări alchil cu lungime de catenă mai mare de 4 atomi de carbon a avut ca efect reducerea semnificativă a activității. Acest lucru confirmă faptul că optimizarea naturii și raportului silanilor precursori din care se obține sol-gelul trebuie realizată pentru fiecare caz în parte, iar printr-o selecție corespunzătoare se pot obține preparate ce performanțe catalitice excelente.

În spectrele de masă (MALDI TOF) s-au observat valorile  $m/z = 323,3$  care corespund maselor moleculare ale aducțiilor cu sodiu ai monoesterilor xilitolului și arabitolului, valorile  $m/z = 353,3$  care corespund maselor moleculare ale aducțiilor cu sodiu ai manitolului și sorbitolului, în timp ce valori  $m/z = 471$  și  $501$  corespunzătoare maselor moleculare ale aducțiilor cu sodiu ai diesterilor alditolilor nu au fost detectate. În Figura 2.20 se pot identifica aducții cu sodiu și potasiu ai monoesterilor aromatici ai xilitolului [195, 207].

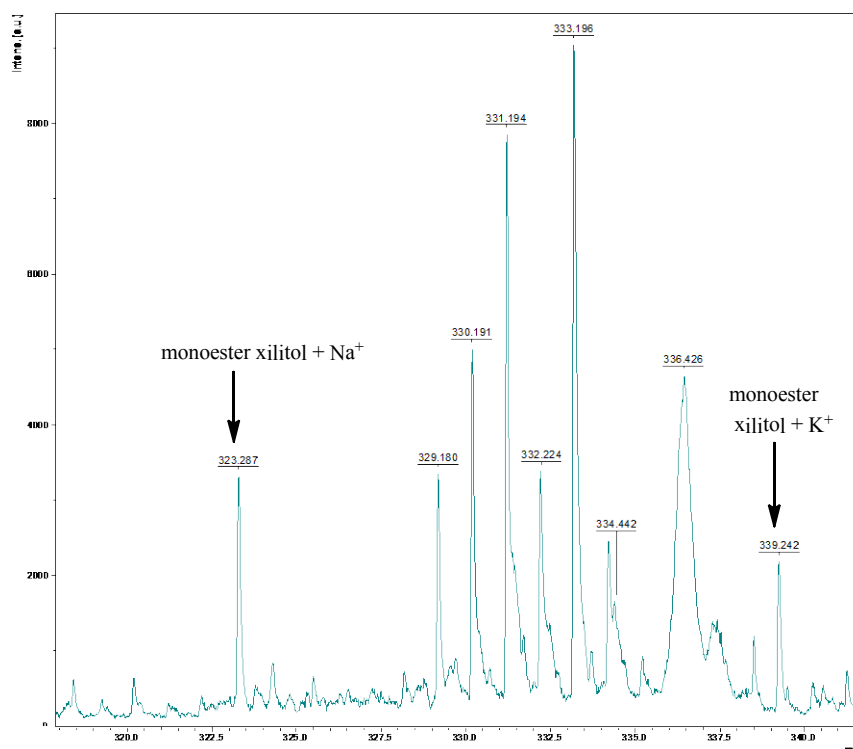


Figura 2.20. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea xilitolului cu HPPME, după 72 ore de reacție (cf. Cap. 3.4.7).

#### 2.4.2. Studiul acilării alditolilor cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic

În acest studiu a fost investigat efectul diferiților parametri de reacție asupra eficienței sintezei esterilor aromatici ai alditolilor utilizând acidul 3-(4-hidroxifenil)-propionic ca donor de acil și lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată pe rășină acrilică macroporoasă (Novozyme 435) ca și biocatalizator. Au fost determinate conversiile, vitezele inițiale de reacție și distribuția mono- și diesterilor obținuți. Selecția preparatului comercial Novozyme 435 pentru această reacție s-a făcut pe baza studiului anterior descris în subcapitolul II.4.1., în care această enzimă a demonstrat cea mai mare eficiență catalitică, dar și pe experimente anterioare realizate în grupul nostru, care au dus la concluzia că această enzimă este cea mai potrivită pentru reacții de esterificare directă. Lipaza din *Candida*

*antarctica* B este o lipază care prezintă activitate catalitică chiar și în solvenți mai polari cum sunt *terț*-butanolul sau dimetilsulfoxidul. Această lipază a fost raportată în numeroase publicații ca fiind eficientă în special în sintezele regio- și enantioselective [6, 196 – 198].

Sinteza enzimatică a esterilor aromatici a patru alditoli (xilitol, arabitol, manitol și sorbitol) a fost realizată în mediu de *terț*-butanol pur și în amestecuri binare de *terț*-butanol și dimetilsulfoxid. Deoarece studiile preliminare au arătat că esterificarea directă a avut loc cu conversii mai mari decât transesterificarea, la același timp de reacție (72 de ore), aceasta a fost studiată mai detaliat. A fost investigată influența unor parametri de reacție precum timpul de reacție, temperatura, raportul molar, cantitatea de enzimă și cantitatea de site moleculare asupra conversiei și distribuției produșilor de reacție.

Evoluția reacției de esterificare a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei de lichide, iar identificarea și caracterizarea produșilor de reacție s-au realizat utilizând spectrometria de masă (metoda MALDI TOF), spectroscopia de infraroșu și spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară [205].

#### **2.4.2.1. Influența mediului de reacție**

Reacțiile inverse hidrolizei, la o concentrație redusă a apei, necesită utilizarea solvenților organici ca mediu de reacție. În ceea ce privește sinteza esterilor alditolilor, solventul trebuie să solubilizeze atât alditolul hidrofil cât și acidul cu componentă aromatică hidrofob, cu menținerea simultană a activității enzimei. Mai mult decât atât, activitatea și specificitatea enzimelor este influențată considerabil de solventul folosit, astfel că alegerea solventului este esențială pentru eficiența procesului [118].

În acest studiu, esterii alditolilor au fost sintetizați pornind de la alditoli cu cinci respectiv șase grupări hidroxil cu orientare sterică diferită și un acid cu componentă aromatică, în mediu binar de *terț*-butanol și diferite concentrații de dimetilsulfoxid. Nu au fost detectați produși de reacție la incubarea substraturilor cu sitele moleculare în absența enzimei, ceea ce arată că formarea tuturor produșilor de reacție a fost rezultatul activității catalitice a lipazei din *Candida antarctica* B. Randamentele în ester pentru fiecare din cei patru alditoli studiați, calculate din analizele HPLC, precum și conținutul de mono- și diester al produsului sunt reprezentate în funcție de compoziția mediului de reacție și sunt ilustrate în Figura 2.21.

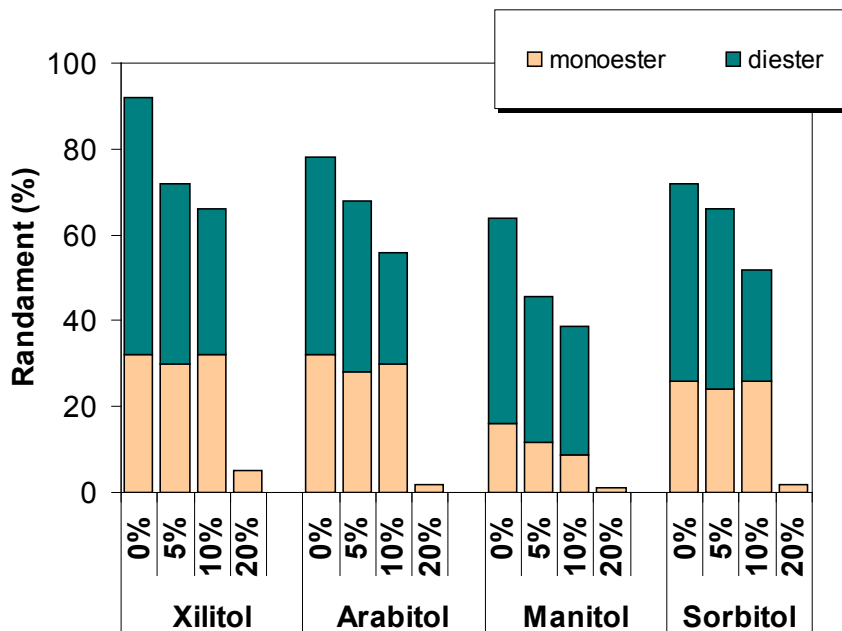


Figura 2.21. Influența conținutului de dimetilsulfoxid asupra randamentului de acilare a alditolilor cu HPPA, la 72 ore de reacție. Reacțiile au fost realizate la o concentrație de alditol de 50 mM, raport molar alditol/acid 0,3, Novozyme 435 (0,5 g/mol alditol), la 50°C.

Rezultatele arată că pentru toți alditolii studiați, cele mai mari conversii totale au fost obținute în *terț*-butanol pur, iar odată cu creșterea procentului de dimetilsulfoxid în mediul de reacție conversiile au scăzut. Activitatea enzimei a fost aproape total inhibată la un conținut de dimetilsulfoxid de 20%. Acest comportament poate fi datorat interacțiunilor dintre apă și dimetilsulfoxid, peste o anumită concentrație a apei. A fost demonstrat că solvenții polari leagă apa din enzimă impunând o rigiditate mai mare a structurii enzimei datorită incapacității de a forma legături de hidrogen flexibile la suprafața proteinei – abilitatea catalitică este deci diminuată sau complet pierdută [199]. Pe baza acestor rezultate următoarele investigații au fost realizate în *terț*-butanol.

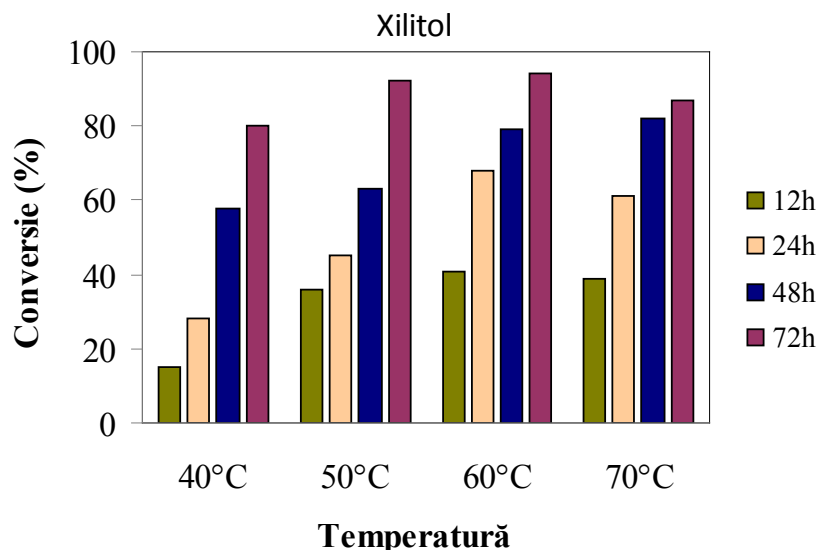
Cele mai ridicate conversii totale după 72 ore de reacție au fost cuprinse între 92% pentru xilitol și 64% pentru manitol. În aceleași condiții de reacție, pentitolii au fost esterificați cu conversii mai ridicate decât hexitolii. Utilizând exces de HPPA, selectivitatea a fost observată față de esterificarea grupărilor hidroxil primare, cu formarea mono- și diesterilor în cantități comparabile. Doar cu manitol ca și substrat, produsul format conține un procent mai mare de diester (cel puțin 70%). Formarea triesterilor a fost detectată prin analiza MALDI TOF MS dar nu a putut fi cuantificată în cromatograma HPLC a produșilor de reacție, deci aceștia nu sunt prezentați în diagramele care urmează.

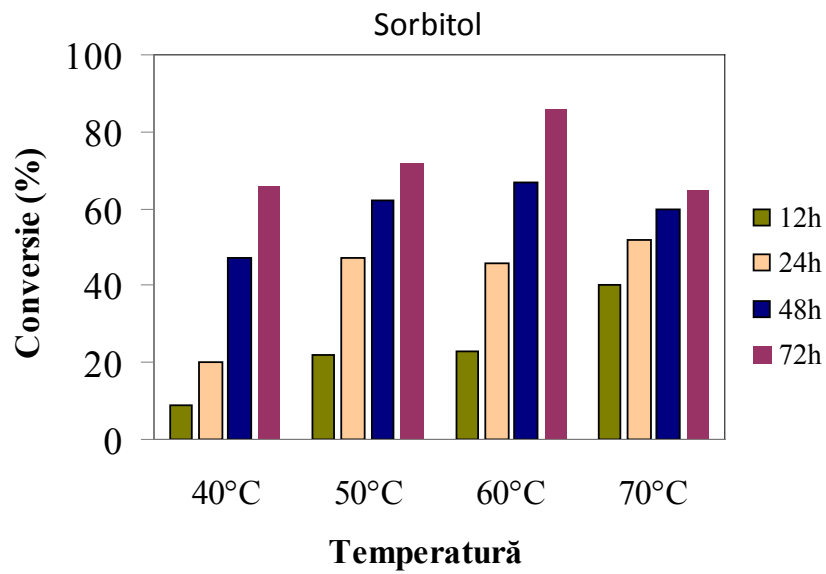
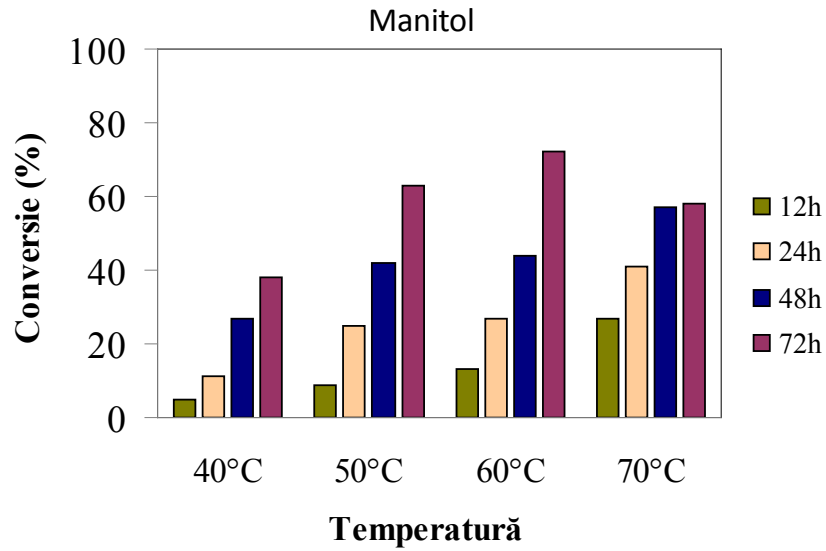
Analizele RMN au arătat că monoesterii și diesterii alditolilor au fost substituiți doar la grupările hidroxil primare. Monosubstituiția grupărilor hidroxil primare ale sorbitolului și arabitolului poate da doi diastereoizomeri, dar investigația stereochemică a monoesterilor formați nu a fost efectuată în acest studiu.

### 2.4.2.2. Influența temperaturii

Temperatura de reacție are un efect important asupra reacțiilor enzimaticе influențând atât solubilitatea reactanților cât și viteza de reacție. Deoarece acizii cu componentă aromatică sunt de obicei substraturi mai dificile pentru lipaze, s-a presupus că vor fi necesare temperaturi mai ridicate și timp de reacție mai îndelungat pentru a obține conversii comparabile cu cele raportate pentru esterii alditolilor cu acizii grași alifatici. Pentru optimizarea conversiilor a fost investigată influența temperaturii de reacție asupra esterificării directe a alditolilor cu HPPA, între 40°C și 70°C, în *terț*-butanol. Reacțiile au fost monitorizate în timp, până la 72 ore.

Figura 2.22 arată că la creșterea temperaturii de reacție se obțin conversii mai ridicate datorită scăderii energiei de activare, creșterii solubilității alditolului în *terț*-butanol, reducerii vâscozității și reducerii limitării transferului de masă. În acest studiu, temperatura optimă pentru sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor a fost de 60°C. La 70°C conversia a scăzut, probabil datorită unei inactivări termice parțiale a enzimei. Indiferent de temperatura de reacție și de natura alditolilor, randamentele de esterificare au crescut în timp, în perioada de incubare studiată (până la 72 ore), dar la 70°C la un timp de reacție prelungit (de la 48 la 72 ore) se observă doar o creștere mică a conversiilor. Conversiile cele mai ridicate obținute pentru pentitoli (98% pentru arabitol și 94% pentru xilitol), în condițiile optime de reacție, pot fi explicate prin difuzia facilă a moleculelor mici de substrat la centrul catalitic activ al enzimei. Chiar dacă timpul de reacție necesar pentru atingerea conversiei maxime a fost mai mare, aceste rezultate sunt comparabile cu valorile raportate pentru esterificarea alditolilor cu acizii grași alifatici. Cao și colaboratorii au obținut randament de 90% la esterificarea sorbitolului cu acidul palmitic la 60°C, după 24 ore de reacție în sistem în fază solidă conținând cantități mici de *terț*-butanol, utilizând lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată pe polipropilenă [200].







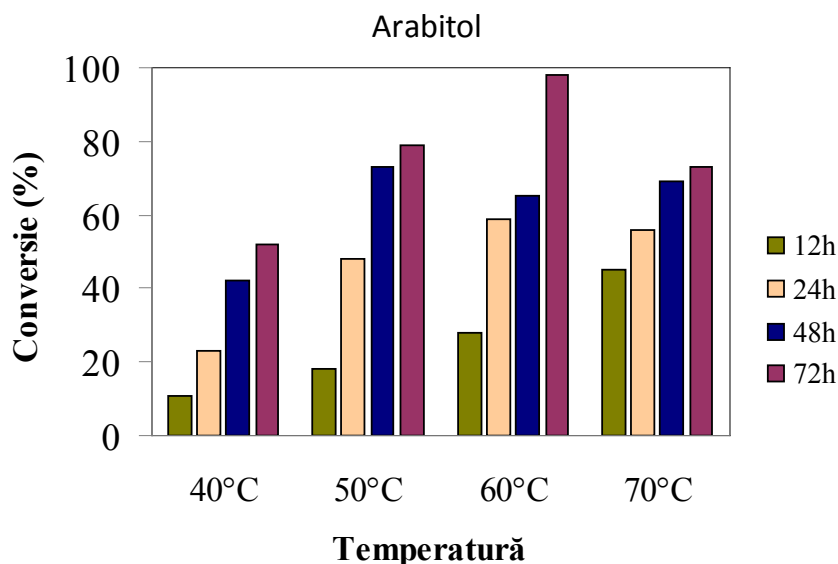


Figura 2.22. Evoluția în timp a reacției de esterificare a alditolilor cu HPPA în *tert*-butanol, la concentrație de alditol de 50 mM, raport molar alditol/acid 0,3, catalizată de Novozyme 435 (0,5 g/mol alditol), la diferite temperaturi. Conversiile au fost calculate pe baza analizelor HPLC, la 12, 24, 48 și 72 ore de reacție.

#### 2.4.2.3. Influența raportului molar alditol/HPPA

Deoarece esterificarea directă a alditolilor cu HPPA este o reacție de echilibru, raportul molar al reactanților are o influență importantă asupra conversiei și asupra compoziției produsului obținut. Cantități echimolare de reactivi ar simplifica prelucrarea amestecului de reacție pentru separarea produsului, deși excesul de acid sau alditol conduce la conversii îmbunătățite și poate genera un conținut dorit de mono- sau diester în produsul de reacție. În acest studiu a fost utilizat atât exces de HPPA cât și de alditol, în condițiile de reacție optime determinate anterior, la 60°C în *tert*-butanol. Concentrația reactantului limitativ a fost setată la 50 mM și aceeași cantitate de enzimă s-a folosit în toate investigațiile și anume 0,5 g/mol reactant limitativ. Randamentele au fost raportate la reactantul limitativ, la acid în cazul excesului molar de alditol și la alditol în cazul excesului molar de acid.

În Figura 2.23 este prezentată influența diferitelor rapoarte molare alditol/acid asupra sintezei esterilor aromatici ai alditolilor, după 72 ore de reacție. Pentru toți alditolii studiați, cele mai ridicate conversii totale au fost obținute la un exces molar de HPPA de trei ori. Creșterea excesului de HPPA de la două la trei ori a dus la îmbunătățirea conversiei totale fără formarea triesterului. Atât excesul molar de acid cât și de alditol (până la trei ori) a fost benefic pentru conversia totală, aceasta fiind mai mare decât în cazul raportului molar de 1:1. La utilizarea excesului de HPPA, produsul principal de reacție format a fost diesterul, în timp ce utilizarea excesului de alditol a dus la randamente ridicate de monoester și conversii totale mai mici. Conversia la monoester a fost mai puțin dependentă de raportul molar al reactanților decât conversia la diester, care a fost mai mică de 10% în cazul

excesului de alditol și mai mare de 60% la utilizarea unui exces de acid. Evoluția în timp a formării mono- și diesterului a fost investigată în studiul cinetic.

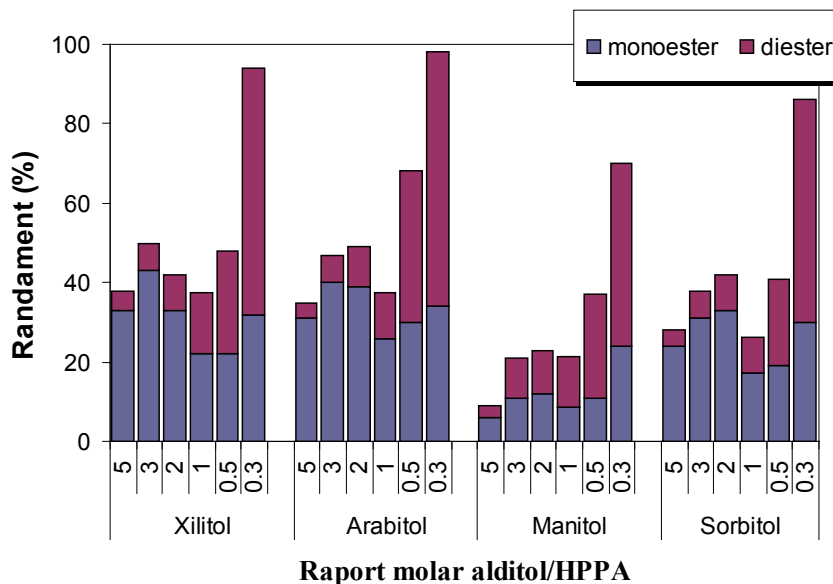


Figura 2.23. Influența raportului molar de alditol/HPPA (5 – 0,3) asupra randamentului de mono- și diester, la 60°C, după 72 ore de reacție, în *terț*-butanol, cu Novozyme 435 (0,5 g/mol reactant limitativ).

#### 2.4.2.4. Influența raportului enzimă/substrat

Utilizarea unui raport optim enzimă/substrat este întotdeauna importantă în reacțiile enzimaticе, pentru minimizarea consumului de enzimă, asigurând în același timp eficiența maximă a procesului. Concentrația de enzimă a fost raportată la reactantul limitativ (în acest studiu fiind alditolul) și a fost exprimată ca g/mol alditol. Figura 2.24 arată că în cazul pentitolilor (arabitol și xilitol), conversia a crescut cu creșterea încărcării cu enzimă, până la 1 g/mol alditol, deși jumătate din cantitatea de enzimă (0,5 g/mol) a fost suficientă pentru atingerea unei conversii de 90% în intervalul de timp studiat. Prezența unei cantități mai mari de enzimă furnizează mai multe situsuri active pentru formarea complexului acil-enzimă, ceea ce duce la conversii mai ridicate. Pentru sinteza esterilor hexitolilor (manitol și sorbitol), a fost observată o scădere foarte mică a conversiei prin creșterea cantității de enzimă peste 0,5 g/mol alditol. După cum s-a menționat anterior, moleculele de pentitoli pot difuza mai ușor la centrul activ al enzimei decât hexitolii și echilibrul reacției este atins mai repede. Creșterea concentrației de enzimă peste o anumită valoare a avut ca rezultat conversii mai mici, probabil datorită limitării transferului de masă.

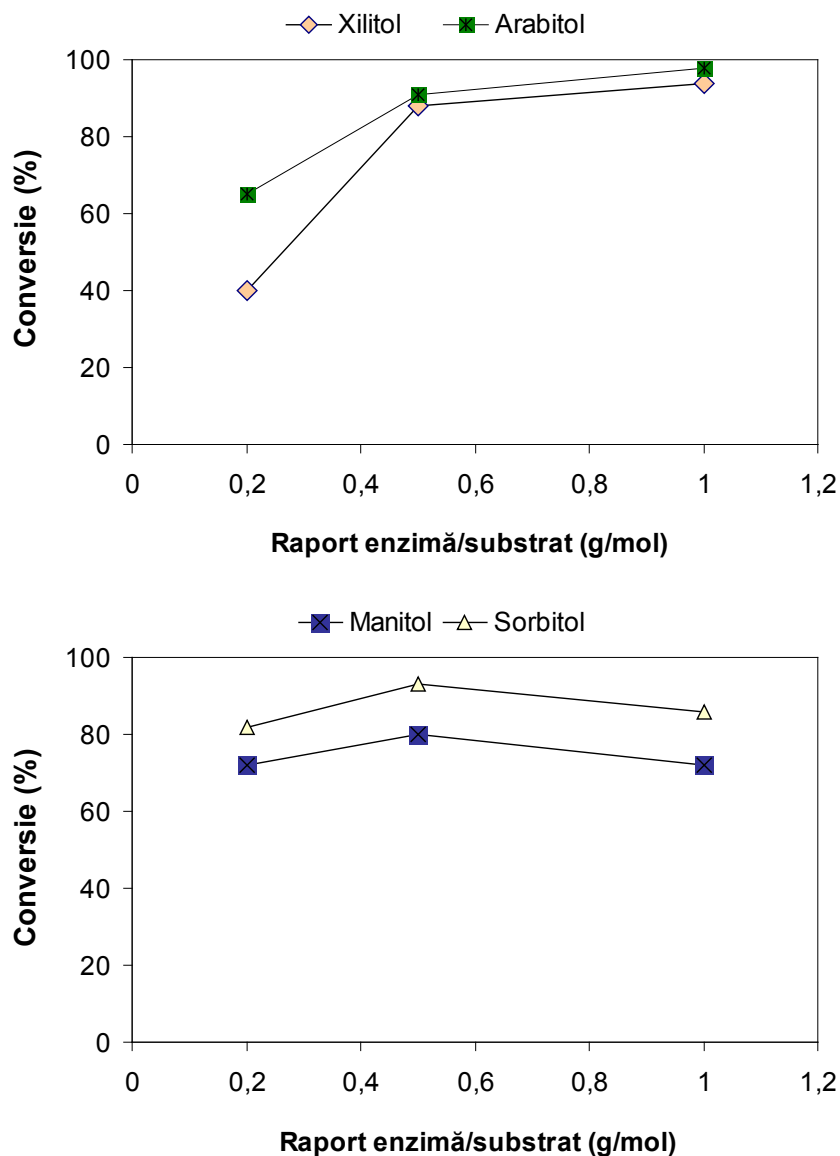


Figura 2.24. Conversia totală ca funcție de raportul enzimă/substrat (0,2 – 1 g/mol), după 72 ore de reacție, în *terț*-butanol, la o concentrație de alditol de 50 mM, raport molar alditol/HPPA de 0,3, la 60°C.

#### 2.4.2.5. Influența cantității de site moleculare

În Figura 2.25 este ilustrat efectul cantității de site moleculare în reacția de esterificare a alditolilor cu acidul aromatic, în condițiile de reacție optime determinate anterior. Rezultatele arată că în cazul reacțiilor fără adaos de site

moleculare au fost înregistrate cele mai mici randamente, fiind cunoscut faptul că reacția de esterificare este favorizată termodinamic de un conținut redus de apă. Creșterea cantității de site moleculare până la 0,04 g a avut ca rezultat creșterea randamentelor de reacție, iar la cantități mai mari de 0,04 g randamentele au scăzut. În general, scăderea conversiei prin adăugarea unei cantități de site moleculare peste o anumită limită se poate datora unei eliminări excesive a apei, fiind astfel îndepărtată și o parte din apa necesară pentru menținerea conformației active a enzimei.

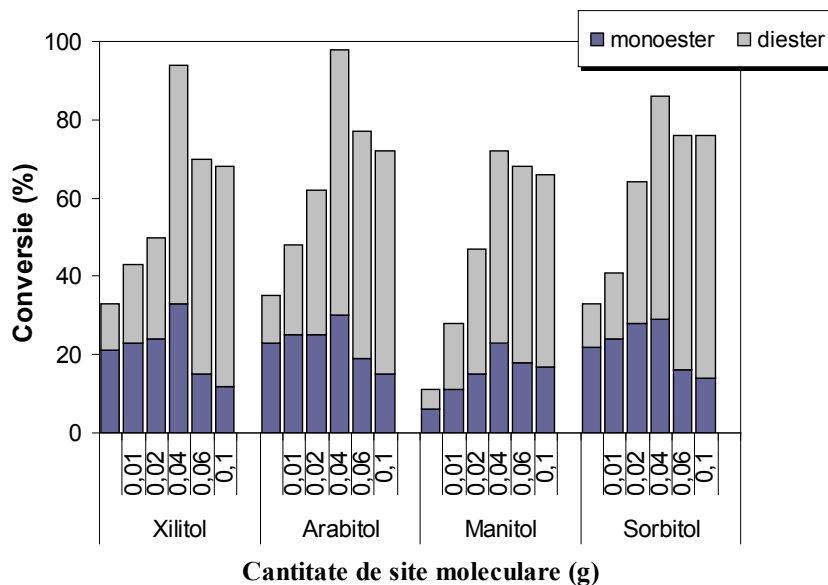


Figura 2.25. Influența cantității de site moleculare (0 – 0,1 g) asupra conversiei totale, după 72 ore de reacție, în *terț*-butanol, raport molar alditol/HPPA de 0,3, la o concentrație de alditol de 50 mM, cu Novozyme 435 (0,5 g/mol reactant limitativ) la 60°C.

#### 2.4.2.6. Studii cinetice

Evoluția în timp a sintezei mono- și diesterilor de alditoli cu HPPA ca donor acil, la o concentrație de alditol de 50 mM, este ilustrată în Figura 2.26. În primele ore, viteza de reacție pentru sinteza monoesterilor a fost mult mai mare decât cea pentru sinteza diesterilor. Apoi, conținutul de monoester a rămas constant, de la timpul de 24 ore până la sfârșitul monitorizării reacției. În ceea ce privește concentrația de diester, creșterea lentă din primele 8 ore a fost urmată de îmbunătățiri semnificative în intervalul de timp 8 – 24 ore de reacție și o creștere aproape liniară până la 72 ore.



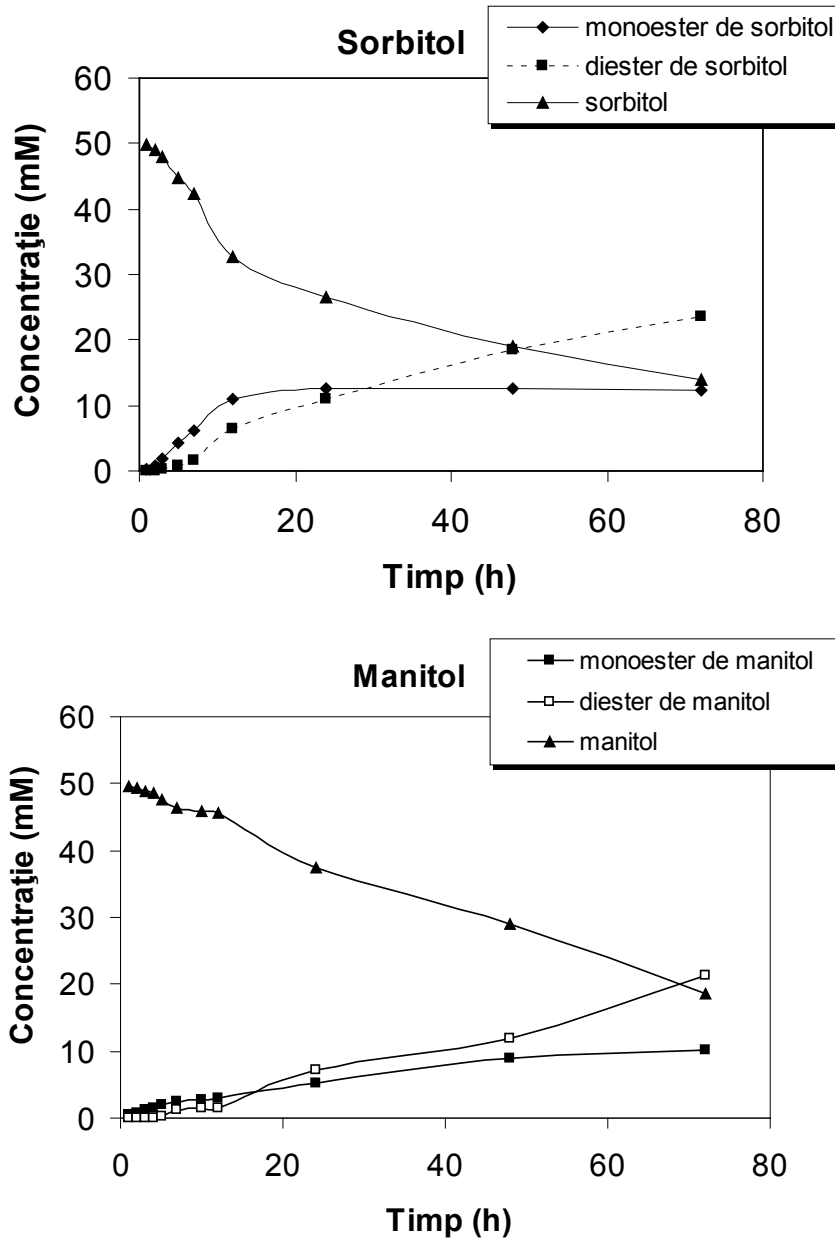


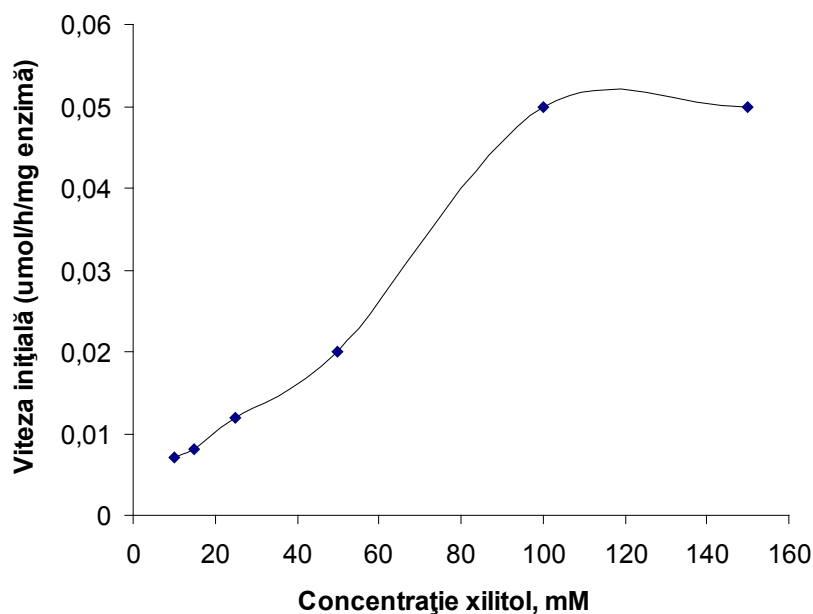
Figura 2.26. Evoluția în timp a sintezei esterilor aromatici de xilitol, arabitol, sorbitol și manitol; la o concentrație de alditol de 50 mM, raport molar alditol/HPPA de 0,3, raport enzimă/alditol de 0,5 g/mol, la 50°C.

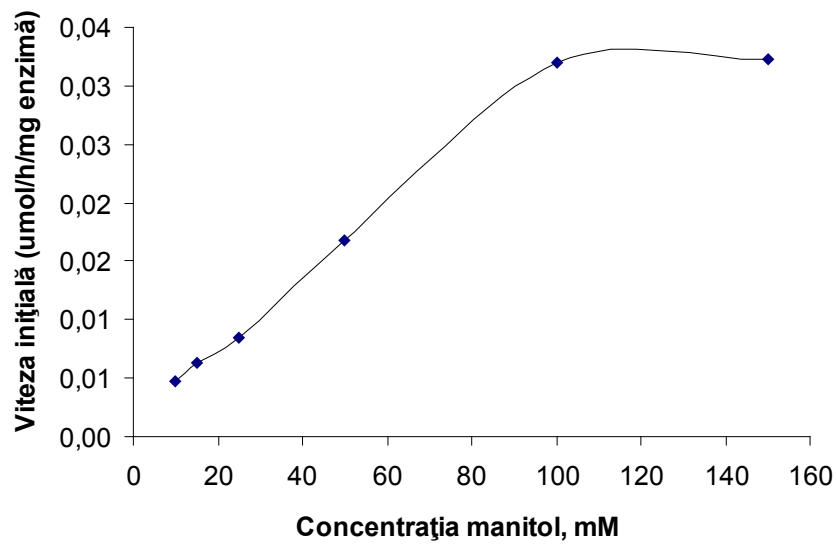
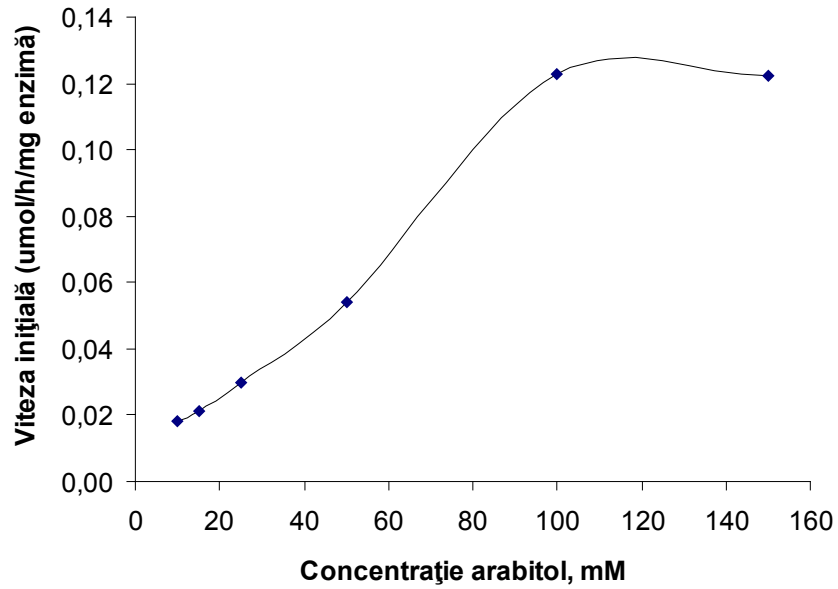
Studiile cinetice au fost efectuate pentru acilarea xilitolului, arabitolului, manitolului și sorbitolului cu acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic în mediu de *terț*-butanol, la 50°C, la diferite concentrații de alditol (10 – 150 mM) menținând constantă concentrația de biocatalizator la 1 g/mol alditol. Valorile constantei

Michaelis – Menten ( $K_M$ ) și vitezei maxime ( $V_{max}$ ) au fost obținute pe baza diagramelor Lineweaver – Burk și au fost utilizate pentru calculul constantelor cinetice  $k_{cat}$  și eficienței catalitice ( $k_{cat}/K_M$ ).

Parametri cinetici au fost analizați pentru formarea monoesterului. Vitezele inițiale de reacție, calculate pentru fiecare concentrație de substrat, au permis determinarea constantelor  $K_M$  și  $V_{max}$ , prezentate în Tabelul 2.10. Valorile  $K_M$  au crescut de la 83 la 93 indicând o ușoară scădere a afinității enzimei pentru alditoli, în ordinea: arabitol > xilitol > sorbitol > manitol. Eficiența catalitică a enzimei a crescut în aceeași ordine fiind de peste 2,5 ori mai ridicată pentru arabitol decât pentru manitol.

În Figura 2.27 sunt prezentate vitezele inițiale de reacție ca funcție de concentrația de alditol pentru reacțiile de esterificare ale xilitolului, arabitolului, manitolului și sorbitolului cu HPPA, catalizate de Novozyme 435.







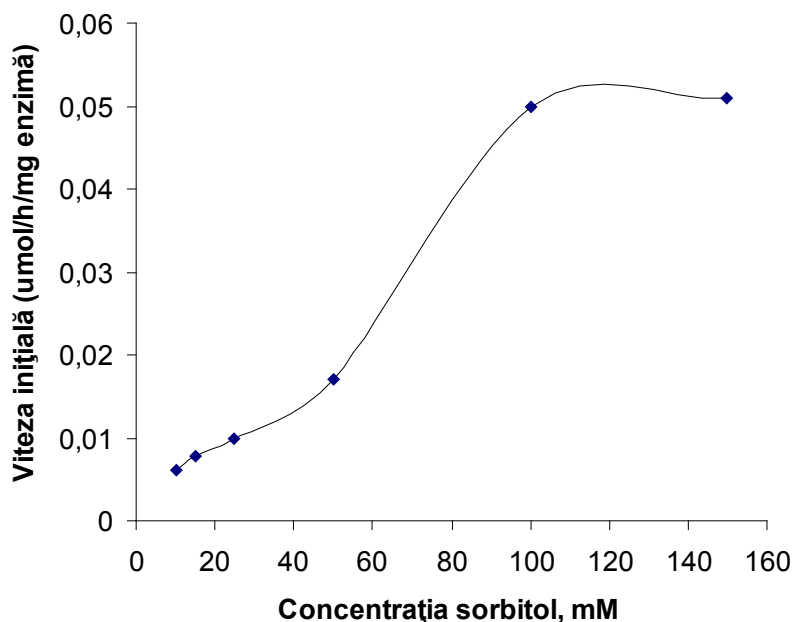


Figura 2.27. Curbele de cinetică Michaelis – Menten ale lipazei Novozyme 435 în reacțiile de esterificare ale xilitolului, arabitolului, manitolului și sorbitolului cu HPPA.

Tabelul 2.10. Valorile parametrilor cinetici pentru monoacilarea alditolilor cu HPPA catalizată de Novozyme 435.

Alditol	$K_M^a$ (mM)	$V_{max}^b$ (μmol/h/mg enzimă)	$k_{cat}/K_M^c$ (mM <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
xilitol	83	0,060	$7,2 \times 10^{-7}$
arabitol	76	0,097	$12,7 \times 10^{-7}$
manitol	93	0,047	$5,1 \times 10^{-7}$
sorbitol	87	0,055	$6,3 \times 10^{-7}$

<sup>a</sup>  $K_M$ : constanta Michaelis-Menten

<sup>b</sup>  $V_{max}$ : viteza maximă a reacției catalizată enzimatic

<sup>c</sup>  $k_{cat}/K_M$ : eficiența catalitică a enzimei

### 2.4.3. Caracterizarea esterilor aromatici ai alditolilor

Prođușii de reacție obținuți au fost separați folosind cromatografia în strat subțire, cromatografia de lichide (HPLC), și caracterizați folosind spectrometria de masă (MALDI TOF), spectroscopia FT – IR și RMN.

Cromatogramele HPLC ale mono- și diesterului aromatic al sorbitolului puri, sunt prezentate, spre exemplificare, în Figurile 1 și 2 (Anexe).

Analizele MALDI TOF MS au arătat formarea monoesterilor, diesterilor și cantități mici de triesteri pentru toți alcoolii de zaharuri studiați. Picurile pseudomoleculare corespunzătoare aducțiilor cu sodiu și aducțiilor cu potasiu ale produșilor de reacție, identificate în spectrele de masă sunt prezentate în Tabelul 2.11.

În Figura 2.28 este prezentat spectrul de masă al amestecului de reacție de la acilarea sorbitolului cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de

reacție, iar spectrele de masă corespunzătoare xilitolului, arabitolului și manitolului sunt redată în Figurile 3 – 5 (Anexe).

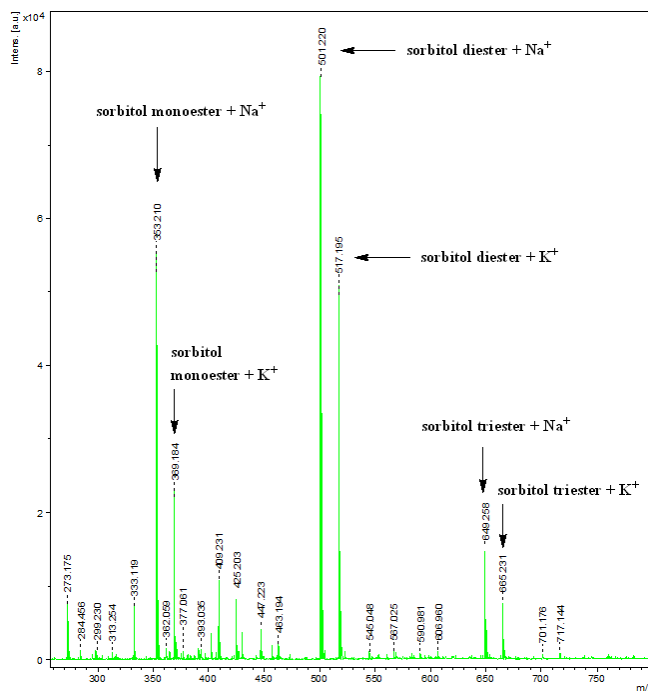
*Tabelul 2.11.* Identificarea mono-, di- și triesterilor prin metoda MALDI TOF MS, după 72 ore de incubare a xilitolului, arabitolului, manitolului și sorbitolului cu HPPA, în mediu de *tert*-butanol, la 60°C, în prezența Novozyme 435 ca și biocatalizator.

Acceptor	m/z					
	[ME <sup>a</sup> + Na] <sup>+</sup>	[ME + K] <sup>+</sup>	[DE <sup>b</sup> + Na] <sup>+</sup>	[DE + K] <sup>+</sup>	[TE <sup>c</sup> + Na] <sup>+</sup>	[TE + K] <sup>+</sup>
Xilitol	323	339	471	487	619	635
Arabitol	323	339	471	487	619	635
Manitol	353	369	501	517	649	665
Sorbitol	353	369	501	517	649	665

<sup>a</sup> ME = monoester

<sup>b</sup> DE = diester

<sup>c</sup> TE = triester



*Figura 2.28.* Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea sorbitolului cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

În vederea identificării și confirmării structurilor esterilor aromatici ai alditolilor, s-au efectuat analizele <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN și DEPT 135 pentru produșii de reacție obținuți în urma separării pe coloană cromatografică. În Figura 2.29 sunt prezentate structurile esterilor aromatici ai alditolilor stabilite în urma interpretării spectrelor <sup>13</sup>C- și <sup>1</sup>H-RMN.

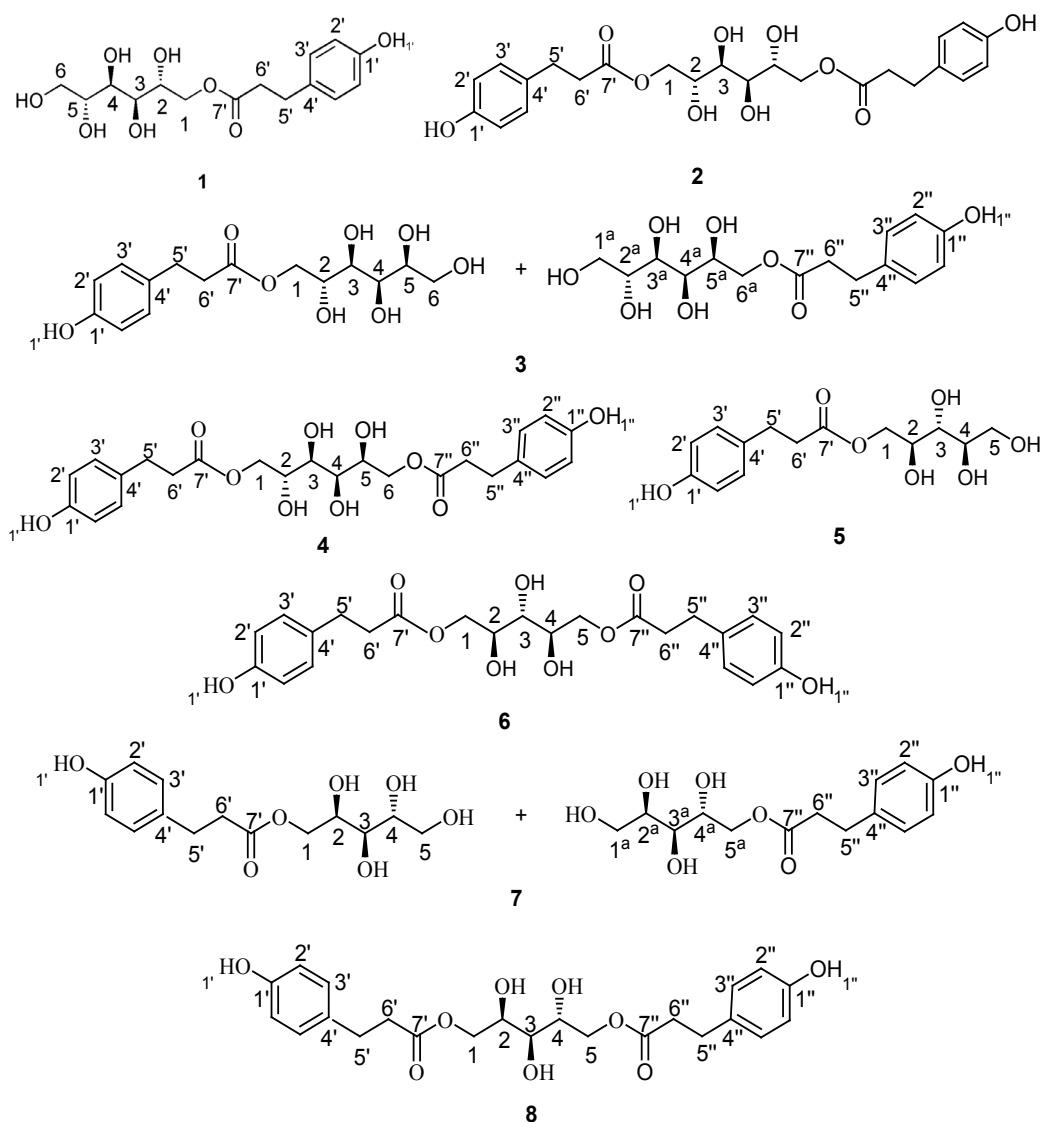


Figura 2.29. Structura 1-manitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat (1); 1,6-manitol di-3-(4-hidroxifenil)-propionat (2); 1-sorbitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat și 6-sorbitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat (3); 1,6-sorbitol di-3-(4-hidroxifenil)-propionat (4); 1-xilitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat (5); 1,5-xilitol di-3-(4-hidroxifenil)-propionat (6); 1-arabitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat și 5-arabitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat (7); 1,5-arabitol di-3-(4-hidroxifenil)-propionat (8).

Astfel spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al monoesterului cu manitolul (compusul 1) (Figura 2.30) prezintă 6 semnale corespunzătoare scheletului de manitol și 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic și anume:  $\delta$  (ppm) 172,49 (C-7') al grupării carbonil; 155,57 (C-1') al C-OH din inelul aromatic; 130,64 (C-4'), 129,04 (C-3') și 115,10 (C-2') ai grupărilor CH din inelul aromatic; 71,15 + 69,49 + 69,30 + 68,25 (C-2 + C-3 + C-4 + C-5) ai grupărilor CH din manitol; 67,08 și 63,09 (C-1,

C-6) al metilenilor din manitol; 35,68 (C-6') și 29,48 (C-5') al metilenilor din propionat.

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al compusului 1 (Figura 2.31) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 9,22 (br s, 1H, H-1'); 7,01 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, H-3'); 6,66 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, H-2'); 4,6 – 3,3 (13 multipleteți, 13H, H-1 + H-2 + H-3 + HJ-4 + H-5 + H-6 + OH din manitol); 2,75 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, H-4'); 2,55 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, H-5').

Spectrul DEPT 135 pentru compusul 1 este redat în Figura 6 (Anexe).

Datorită simetriei pe care o prezintă molecula diesterului manitolului (compusul 2), în spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al acestuia redat în Figura 7 (Anexe) se regăesc doar 3 semnale corespunzătoare restului de manitol și cele 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic:  $\delta$  (ppm) 172,45 (C-7') al grupării carbonil; 155,51 (C-1') al C-OH din inelul aromatic; 130,65 (C-4'), 129,03 (C-3') și 115,01 (C-2') ai grupărilor CH din inelul aromatic; 69,10 (C-3) și 68,19 (C-2) ai grupărilor CH din manitol; 67,00 (C-1) al metilenului din manitol; 35,65 (C-6') și 29,45 (C-5') al metilenilor din propionat.

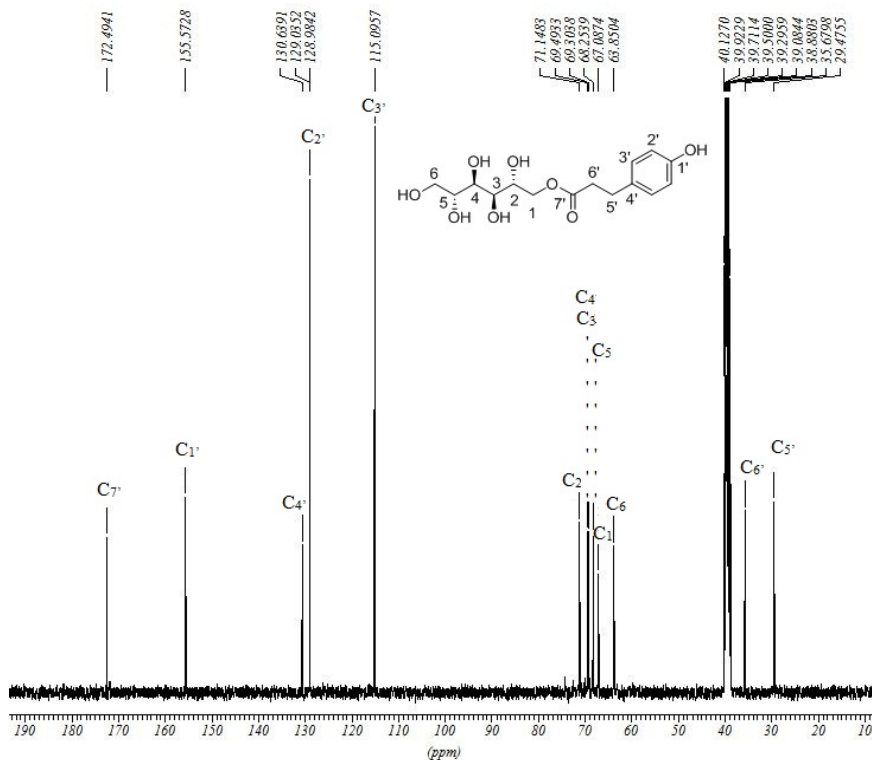


Figura 2.30. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 1-manitol-3-(4-hidroxifenil)-propionatului (DMSO- $d_6$ ).

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al compusului 2 redat în Figura 8 (Anexe) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 9,2 (br s, 2H, H-1'); 7,01 (d, 4H,  $J = 8,5$  Hz, H-3'); 6,67 (d, 4H,  $J = 8,5$  Hz, H-2'); 4,6 – 3,3 (12 multipleteți, 12H, H-1 + H-2 + H-3 + OH din manitol); 2,75 (t, 4H,  $J = 7,6$  Hz, H-4'); 2,55 (t, 4H,  $J = 7,6$  Hz, H-5').

Spectrul DEPT 135 al compusului 2 este prezentat în Figura 9 (Anexe).

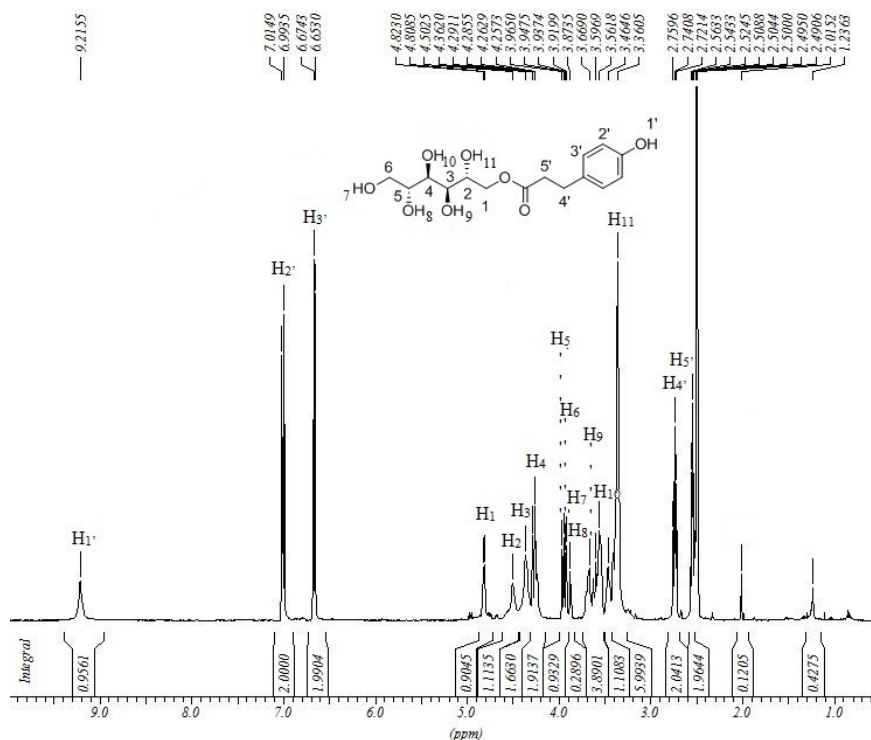


Figura 2.31. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 1-manitol-3-(4-hidroxifenil)-propionatului (DMSO-d<sub>6</sub>).

În cazul monoesterului de sorbitol (compusul 3), spectrele RMN arată că monosubstituția grupării hidroxil primare poate apărea atât la poziția OH-1 cât și la OH-6 ceea ce are ca rezultat doi derivați de sorbitol monosubstituiți posibili. Astfel, spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN redat în Figura 10 (Anexe) prezintă 12 semnale corespunzătoare restului de sorbitol și 10 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic (unele semnale coincid):  $\delta$  (ppm) 172,50 și 172,38 (C-7', C-7'') ai grupărilor carbonil; 155,55 (C-1', C-1'') ai C-OH din inelul aromatic; 130,72 și 130,66 (C-4', C-4''); 129,09 (C-3', C-3'') și 115,112 (C-2', C-2'') ai grupărilor CH din inelul aromatic; 73,60 + 72,21 + 71,47 + 71,27 + 70,72 + 69,38 + 68,61 + 68,56 (C-2 + C-3 + C-4 + C-5 + C-2<sup>a</sup> + C-3<sup>a</sup> + C-4<sup>a</sup> + C-5<sup>a</sup>) ai grupărilor CH din sorbitol; 66,60 + 65,86 + 63,38 + 62,49 (C-1 + C-6 + C-1<sup>a</sup> + C-6<sup>a</sup>) ai metilenilor din sorbitol; 35,68 + 35,64 (C-6', C-6'') și 29,49 (C-5', C-5'') ai metilenilor din propionat.

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al compusului 3 redat în Figura 11 (Anexe) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 9,14 (br s, 1H, H-1', H-1''); 7,01 și 7,00 (2 x d, 2H, J = 8,5 Hz, H-3' și H-3''); 6,66 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-2', H-2''); 5,0 - 3,3 (13 multipleteți, 13H, H-1 + H-2 + H-3 + H-4 + H-5 + H-6 + H-1<sup>a</sup> + H-2<sup>a</sup> + H-3<sup>a</sup> + H-4<sup>a</sup> + H-5<sup>a</sup> + H-6<sup>a</sup> + OH din sorbitol); 2,74 și 2,73 (2 x t, 2H, J = 7,6 Hz, H-4', H-4''); 2,55 și 2,54 (2 x t, 2H, J = 7,6 Hz, H-5', H5'').

Spectrul DEPT 135 al compusului 3 este redat în Figura 12 (Anexe).

Datorită orientării sterice a grupărilor hidroxil, molecula diesterului sorbitolului (compusul 4) nu este simetrică, astfel că spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN redat în Figura 13 (Anexe) prezintă 6 semnale corespunzătoare sorbitolului și 10 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic:  $\delta$  (ppm) 172,47 și 172,34 (C-7', C-7'') ai grupării carbonil; 155,54 (C-1', C-1'') ai C-OH din inelul aromatic); 130,68 și 130,62 (C-4', C-4''), 129,06 (C-3', C-3'') ai grupărilor CH din inelul aromatic; 115,09 (C-2', C-2'') ai grupărilor CH din inelul aromatic; 71,10 + 70,61 + 69,12 + 68,55 (C-2 + C-3 + C-4 + C-5) ai grupărilor CH din sorbitol; 66,52 și 65,78 (C-1, C-6) ai metilenilor din sorbitol; 35,66 și 35,62 (C-6', C-6'') ai metilenilor din propionat; 29,46 (C-5', C-5'') ai metilenilor din propionat. În principiu, ar trebui să apară 14 semnale caracteristice acidului cu componentă aromatică dar unele semnale (de exemplu semnalele pentru C-1' și C-1'') coincid.

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al compusului 4 redat în Figura 14 (Anexe) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 9,15 (br s, 2H, H-1', H-1''); 7,01 și 7,00 (2 x d, 4H, J = 8,5 Hz, H-3', H-3''); 6,67 (d, 4H, J = 8,5 Hz, H-2', H-2''); 5,2 – 3,3 (12 multipleteți, 12H, H-1 + H-2 + H-3 + H-4 + H-5 + H-6 + OH din sorbitol); 2,75 și 2,74 (2 x t, 4H, J = 7,8 Hz, H-4', H-4''); 2,55 și 2,54 (2 x t, 4H, J = 7,8 Hz, H-5', H-5'').

Spectrul DEPT 135 pentru compusul 4 este prezentat în Figura 15 (Anexe).

Datorită monosubstituției compusul 5 nu este simetric și astfel prezintă în spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 16, Anexe) 5 semnale pentru restul de xilitol și 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic:  $\delta$  (ppm) 172,34 (C-7') al grupării carbonil, 155,54 (C-1' al C-OH din inelul aromatic); 130,62 (C-4') și 129,06 (C-3') ai CH din inelul aromatic; 115,08 (C-2') al CH din inelul aromatic; 71,70 + 70,51 + 69,57 (C-2 + C-3 + C-4) ai CH din restul de xilitol; 65,87 și 62,58 (C-1 + C-5) ai  $\text{CH}_2$  din xilitol; 35,61 (C-6') și 29,47 (C-5') al  $\text{CH}_2$  din gruparea propionat.

Spectrul  $^1\text{H}$  – RMN al compusului 5 (Figura 17, Anexe) prezintă următoarele semnale:  $\delta$  (ppm) 9,14 (br s, 1H, H-1'); 7,00 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-3'); 6,66 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-2'); 4,8 – 3,3 (11 multipleteți, 11H, H-1 + H-2 + H-3 + H-4 + H-5 + OH din restul de xilitol); [4,79, d, 1H; 4,47, t, 1H; 4,41, d, 1H; 4,36, d, 1H; 4,07-3,99, m, 2H; 3,75, m, 1H; 3,54, m, 1H; 3,44, m, 2H; 3,37, m, 1H]; 2,74 (t, 2H, J = 7,5 Hz, H-4'); 2,54 (t, 2H, J = 7,5 Hz, H-5').

Spectrul DEPT 135 al compusului 5 este redat în Figura 18 (Anexe).

Compusul 6 este simetric astfel că în spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 19, Anexe) se disting doar 3 semnale pentru restul de xilitol și 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic:  $\delta$  (ppm) 172,29 (C-7') al grupării carbonil; 155,55 (C-1') al C-OH din inelul aromatic; 130,59 (C-4') și 129,04 (C-3') din CH ai grupării fenil; 115,07 (C-2') al CH din inelul aromatic; 70,76 (C-3) al CH din restul de xilitol; 68,91 (C-2) al CH din restul de xilitol; 65,67 (C-1) al  $\text{CH}_2$  din xilitol; 35,59 (C-6') al  $\text{CH}_2$  al grupării propionat; 29,45 (C-5') al  $\text{CH}_2$  din propionat.

Spectrul  $^1\text{H}$  – RMN al compusului 6 (Figura 20, Anexe): ( $\delta$  ppm) 9,14 (br s, 2H, H-1'); 6,99 (d, 4H, J = 8,3 Hz, H-3'); 6,67 (d, 4H, J = 8,3 Hz, H-2'); 4,9 – 3,4 (10 multipleteți, 10H, H-1 + H-2 + H-3 + OH din restul de xilitol); [4,84, d, 2H; 4,67, d, 1H; 4,0, m, 4H; 3,75, m, 2H; 3,41, m, 1H]; 2,73 (t, 4H, J = 7,5 Hz, H-4'); 2,54 (t, 4H, J = 7,5 Hz, H-5').

Spectrul DEPT 135 al compusului 6 este prezentat în Figura 21 (Anexe).

Monosubstituția la gruparea hidroxil primară a arabitolului poate apărea la ambele grupări ceea ce are ca rezultat doi derivați de arabitol monosubstituiți posibili. Astfel, în spectrul  $^{13}\text{C}$  – RMN al compusului 7 (Figura 22, Anexe) apar 10 semnale pentru restul de arabitol și 11 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic:  $\delta$  (ppm) 172,49 și 172,30 (C-7' și C-7' ai grupării carbonil); 155,55 și

155,54 (C-1' și C-1'') ai C-OH din gruparea fenil; 130,71 și 130,62 (C-4' și C-4''); 129,08 (C-3' și C-3'') ai CH ai grupării fenil; 115,10 (C-2' și C-2'') ai CH din inelul aromatic; 71,05 + 70,68 + 70,33 + 69,76 + 68,47 + 67,34 (C-2 + C-3 + C-4 + C-2<sup>a</sup> + C-3<sup>a</sup> + C-4<sup>a</sup>, CH din restul de arabitol; 66,88 + 65,87 + 63,56 + 62,79 (C-1 + C-5 + C-1<sup>a</sup> + C-5<sup>a</sup>), CH<sub>2</sub> din restul de arabitol; 35,67 și 35,61 (C-6' și C-6'') ai CH<sub>2</sub> din gruparea propionat; 29,48 (C-5' și C-5'') ai CH<sub>2</sub> din gruparea propionat.

Spectrul <sup>1</sup>H – RMN al compusului 7 (Figura 23, Anexe): (δ ppm) 9,13 (br s, 2x1H, H-1' și H-1''); 7,01 și 7,00 (2 x d, 2x2H, J = 8,5 Hz, H-3' și H-3''); 6,66 (d, 2x2H, J = 8,5 Hz, H-2' și H-2''); 4,9 – 3,2 (2x11 multipleți, 2x11H, H-1 + H-2 + H-3 + H-4 + H-5 + H-1<sup>a</sup> + H-2<sup>a</sup> + H-3<sup>a</sup> + H-4<sup>a</sup> + H-5<sup>a</sup> + OH din restul de arabitol [4,81, d, 1H; 4,55, d, 1H; 4,5-4,4, m, 3H; 4,33, t, 1H; 4,28-4,25, m, 2H; 4,21, d, 1H; 4,02-3,88, m, 4H; 3,69, m, 2H; 3,59, m, 1H; 3,47, m, 1H; 3,42-3,28, m, 4H; 3,26, t, 1H]); 2,75 și 2,74 (2 x t, 2x2H, J = 7,8 Hz, H-4' și H-4''); 2,55 și 2,54 (2 x t, 2x2H, J = 7,8 Hz, H-5' și H-5'').

Spectrul DEPT 135 al compusului 7 este redat în Figura 24 (Anexe).

Compusul 8 nu este simetric datorită orientării grupărilor OH și astfel spectrul <sup>13</sup>C – RMN al compusului 8 (Figura 25, Anexe) prezintă 5 semnale pentru restul de arabitol și 12 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic: (δ ppm) 172,44 și 172,26 (C-7' și C-7'') ai grupării carbonil; 155,54 și 155,52 (C-1' și C-1'') ai C-OH din inelul aromatic; 130,67 și 130,58 (C-4' și C-4''); 129,04 (C-3' și C-3'') ai CH din inelul aromatic; 115,07 și 115,02 (C-2' și C-2'') ai CH din inelul aromatic; 70,54 + 68,12 + 66,93 (C-2 + C-3 + C-4) ai CH din restul de arabitol; 66,69 și 65,72 (C-1 și C-5) ai CH<sub>2</sub> din restul de arabitol; 35,64 și 35,59 (C-6' și C-6'') ai CH<sub>2</sub> din propionat; 29,45 (C-5' și C-5'') ai CH<sub>2</sub> din propionat.

Spectrul <sup>1</sup>H – RMN al compusului 8 (Figura 26, Anexe): (δ ppm) 9,14 (br s, 2H, H-1' și H-1''); 7,00 și 6,99 (2 x d, 4H, J = 8,5 Hz, H-3' și H-3''); 6,65 (d, 4H, J = 8,5 Hz, H-2' și 2''); 4,9 – 3,2 (10 multipleți, 10H, H-1 + H-2 + H-3 + H-4 + H-5 + OH din arabitol [4,87, d, 1H; 4,62, t, 2H; 4,26, dd, 1H; 4,03-3,90, m, 4H; 3,70, m, 1H; 3,28, t, 1H]); 2,75 și 2,74 (2 x t, 4H, J = 7,5 Hz, H-4' și H-4''); 2,55 și 2,54 (2 x t, 4H, J = 7,5 Hz, H-5' și H-5'').

Spectrul DEPT 135 al compusului 8 este redat în Figura 27 (Anexe).

Spectroscopia de infraroșu a fost de asemenea utilizată pentru caracterizarea monesterilor și diesterilor aromatici ai alditolilor obținuți în urma separării pe coloană gravitațională cu silicagel. Figurile 2.32 – 2.35 prezintă comparativ spectrele FT – IR ale substraturilor (alditoli și acidul cu componentă aromatică) și ale esterilor aromatici ai alditolilor. Spectrele IR ale alditolilor, acidului cu componentă aromatică, mono- și diesterilor aromatici ai arabitolului, manitolului, xilitolului precum și al monoesterului aromatic al sorbitolului au fost realizate folosind tehnica ATR, iar spectrul diesterului aromatic al sorbitolului a fost realizat prin tehnica de transmisie, în pastilă de KBr.

Spectrele FT – IR confirmă structura esterilor obținuți, regăsindu-se semnalele caracteristice ale alditolului și respectiv acidului cu componentă aromatică dar mai ales ale legăturii esterice formate. În Figurile 28 și 29 (Anexe) sunt redate, pentru exemplificare, spectrele FT – IR ale mono- și diesterului aromatic al arabitolului. Tabelul 2.12 prezintă sintetic semnalele caracteristice pentru esterii obținuți prin comparație cu substraturile de la care s-a pornit.

Semnalele cele mai semnificative pentru grupările funcționale ale esterilor aromatici ai alditolilor sunt cele ale vibrației de valență ale grupărilor hidroxil provenite din polioli dar și din compusul fenolic (aproximativ 3400), grupările metilenice, care prezintă benzi de valență între 2800 și 3000 cm<sup>-1</sup> și grupările carbonil provenind din legătura esterică (1700-1730).

Tabelul 2.12. Semnalele FT – IR caracteristice esterilor aromatici ai alditolilor.

Compus	$\nu$ O-H	$\nu$ C-H	$\nu$ C=O (ester)	$\nu$ C=O (HPPA)
acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic	3391	2952	-	1697
xilitol	3321	2939	-	-
1-xilitol 3(4-hidroxifenil)-propionat	3366	2942	1727	-
1,6-xilitol di-3(4-hidroxifenil)-propionat	3527	2984	1730	-
arabitol	3228	2935	-	-
1-arabitol 3(4-hidroxifenil)-propionat	3308	2935	1715	-
1,6-arabitol di-3(4-hidroxifenil)-propionat	3371	2945	1714	-
manitol	3281	2901	-	-
1-manitol 3(4-hidroxifenil)-propionat	3270	2921	1705	-
1,6-manitol di-3(4-hidroxifenil)-propionat	3306	2926	1701	-
sorbitol	3230	2917	-	-
1-sorbitol 3(4-hidroxifenil)-propionat	3378	2922	1733	-
1,6-sorbitol di-3(4-hidroxifenil)-propionat	3433	2920	1717	-

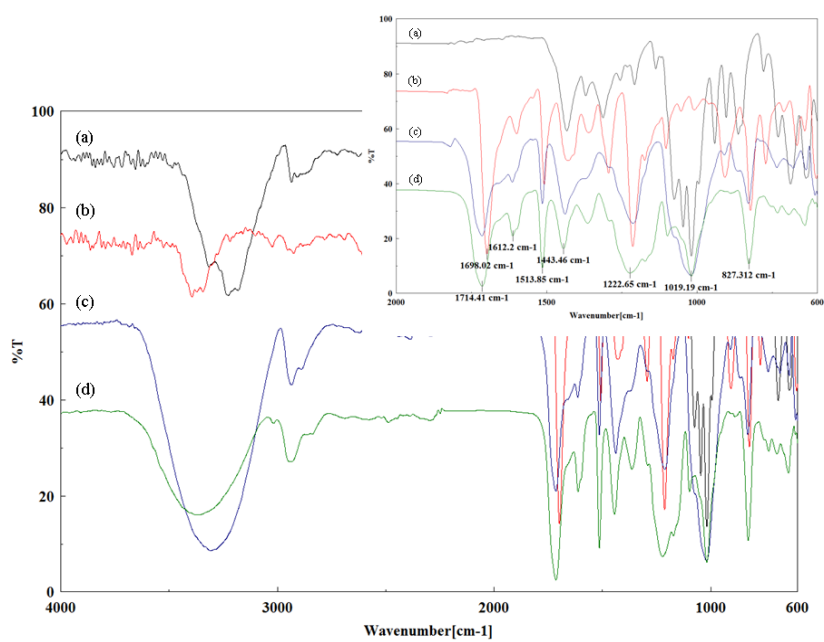


Figura 2.32. Spectrele FT – IR pentru a) arabitol; b) HPPA; c) 1-arabitol-3-(4-hidroxifenil)-propionat; d) 1,6-arabitol-di-3-(4-hidroxifenil)-propionat.



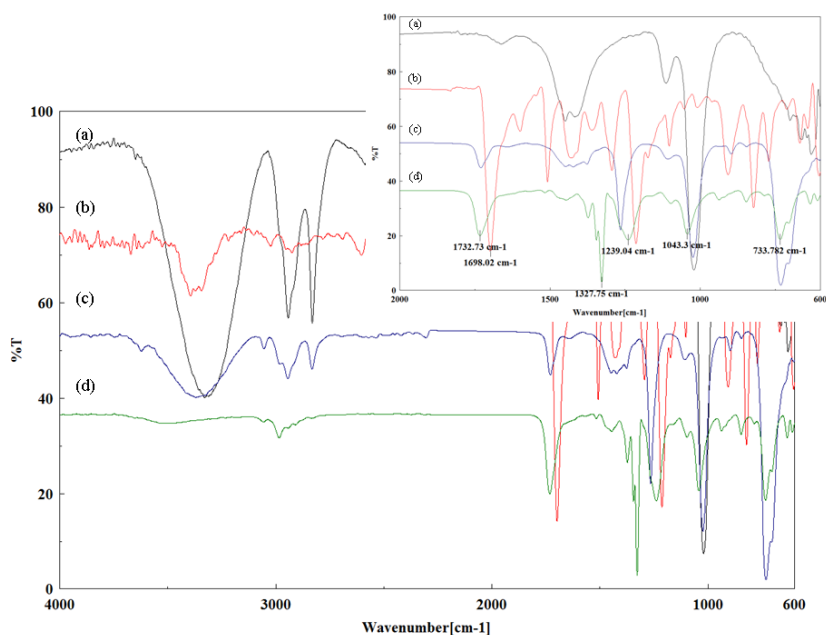


Figura 2.33. Spectrele FT – IR pentru a) xilitol; b) HPPA; c) 1-xilitil-3-(4-hidroxifenil)-propionat; d) 1,6-xilitil-di-3-(4-hidroxifenil)-propionat.

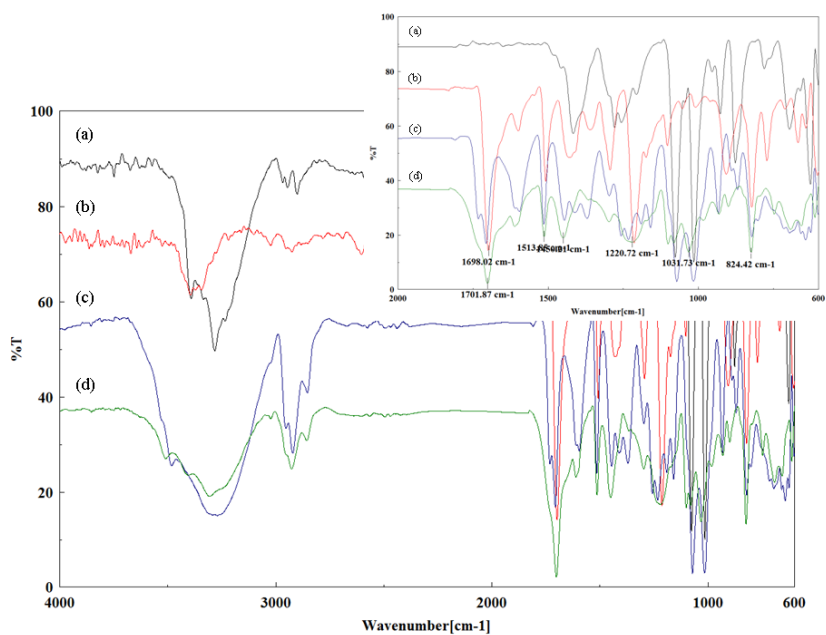


Figura 2.34. Spectrele FT – IR pentru a) manitol; b) HPPA; c) 1-manitil-3-(4-hidroxifenil)-propionat; d) 1,6-manitil-di-3-(4-hidroxifenil)-propionat.

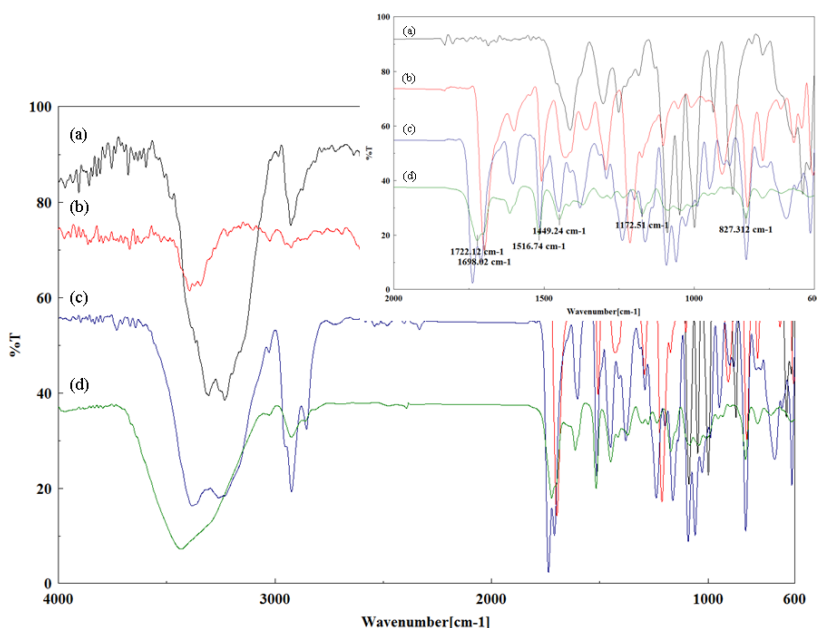


Figura 2.35. Spectrele FT – IR pentru a) sorbitol; b) HPPA; c) 1-sorbitol 3-(4-hidroxfenil)-propionat; d) 1,6-sorbitil di-3-(4-hidroxfenil)-propionat.

#### 2.4.4. Concluzii

- În reacția de transesterificare a alditolilor cu HPPME lipaza din *Candida antarctica* B a demonstrat cea mai mare eficiență catalitică, în special preparatul comercial Novozyme 435.

- Preparatele imobilizate prin entrapare în sol – gel s-au dovedit a fi biocatalizatori mai eficienți catalitic decât enzima nativă, demonstrând eficiența ridicată a metodei de entrapare în matrici hibride organice/anorganice.

- Pentru lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată prin metoda sol-gel, prezența grupării izobutil nehidrolizabilă în matricea de silice a fost cea mai favorabilă, obținându-se o activitate apropiată de cea a preparatului comercial Novozyme 435.

- Mono- și diesterii aromatici ai xilitolului, arabitolului, sorbitolului și manitolului au fost sintetizați utilizând Novozyme 435 în mediu de solvent organic, cu conversii ridicate.

- S-a realizat optimizarea parametrilor care influențează reacția: temperatura, timpul de reacție, raportul enzimă/substrat, raportul molar alditol/HPPA, cantitatea de site moleculare, obținându-se conversii aproape totale în condițiile de reacție cele mai favorabile.

- Studiile cinetice efectuate au arătat că în primele ore, viteza de reacție pentru formarea monoesterului este mai mare decât viteza de reacție pentru producerea diesterului, iar după acest interval de timp concentrația diesterului crește liniar în timp iar concentrația monoesterului rămâne aproximativ constantă.

- Parametri cinetici ai reacției de acilare arată că enzima prezintă afinitatea cea mai mare pentru arabitol, urmată de xilitol, sorbitol iar afinitatea cea mai mică față de manitol.

- Spectrele de masă au demonstrat formarea mono-, di- și chiar triesterilor la un timp prelungit de reacție pentru toți alditolii studiați, iar spectrele RMN au arătat că substituția a avut loc numai la grupările hidroxil primare ale alditolilor.
- Controlul parametrilor reacției permite producerea de monoesteri sau diesteri ca produși principali.

## 2.5. Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri

Deși numeroase publicații au descris prepararea esterilor de monozaharide și de alchilglucozide, sinteza esterilor de dizaharide rămâne o mare provocare. Aceasta se datorează solubilității reduse a dizaharidelor în solvenții organici care sunt în general utilizați în biocataliză. Doar puține enzime sunt cunoscute care își mențin activitatea catalitică în piridină sau dimetilsulfoxid, care pot solubiliza aceste zaharuri în concentrații mari. Pentru a surmonta această problemă se poate adopta o metodă alternativă și anume acetalizarea dizaharidelor pentru îmbunătățirea solubilității și miscibilității acestora în mediul de reacție evitând astfel utilizarea solvenților foarte polari [201]. Protejarea și deprotejarea grupărilor hidroxil reprezintă o procedură importantă în chimia carbohidraților. Acetalii de zaharuri, cum sunt derivații izopropilidenici, sunt intermediari utili pentru sinteza moleculelor biologice active [202].

Reacția de izopropilidenare este cel mai des utilizată ca prima etapă de derivatizare a carbohidraților și sunt cunoscute mai multe metode pentru realizarea acestei reacții. Transferul de acetal utilizând 2,2-dimetoxipropan, 2,3-dimetoxipropan sau 2-metoxipropan în prezența unui catalizator acid sunt utilizate frecvent pentru introducerea unei grupări izopropilidenice [203].

Importanța introducerii selective și îndepărtării grupărilor protectoare în sinteza organică este bine cunoscută și alegerea unei metode corespunzătoare depinde de stabilitatea grupărilor protectoare în diferitele condiții de reacție pentru o linie de sinteză dată. Protejarea grupărilor hidroxil cu grupări eterice este recunoscută ca o alternativă de mare utilitate [204].

Printr-o astfel de abordare, au fost sintetizați și caracterizați esterii aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri utilizând diferite linii de sinteză ce vor fi discutate în subcapitolele următoare.

### 2.5.1. Sinteza esterilor aromatici ai alchilglucozidelor

Sintezele 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză și 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză sunt prezentate în Figurile 2.36 și 2.37. Alchil glucozidele au fost supuse reacției de esterificare cu acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic în prezența lipazei Novozyme 435, cu formarea esterilor aromatici corespunzători. Aceste reacții au avut loc cu randamente de 63% în cazul  $\alpha$ -metil glucozei și de 77% în cazul  $\beta$ -octil glucozei după 72 ore de reacție, iar după 5 zile de reacție conversia a fost aproape totală (91% și respectiv 93%). Solubilitatea alchilglucozidelor în mediul de reacție (*tert*-butanol) este mai ridicată comparativ cu cea a glucozei, datorită grupărilor alchil hidrofobe din moleculă, astfel că reactivitatea acestora crește considerabil.

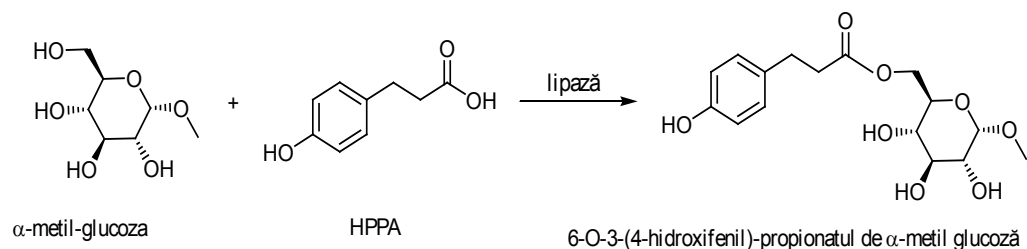


Figura 2.36. Sinteza enzimatică a 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză.

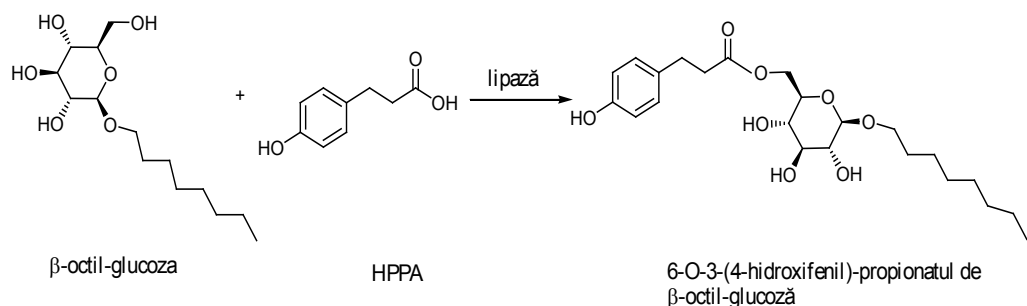


Figura 2.37. Sinteza enzimatică a 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză.

Timpul de reacție necesar pentru atingerea conversiei maxime a fost mai îndelungat comparativ cu cel necesar în reacțiile de esterificare a alditolilor, studiate în această lucrare, aceștia din urmă având o structură liniară, mai accesibilă pentru enzimă decât structura ciclică a alchilglucozidelor. Reacțiile au fost monitorizate prin cromatografie în strat subțire și cromatografie de lichide (HPLC). Producții de reacție au fost identificați cu ajutorul spectrometriei de masă (MALDI TOF) și caracterizați prin spectroscopie IR și RMN, după purificarea prin separare pe coloană cu silicagel. Spectrele RMN au arătat că reacțiile au avut loc cu regioselectivitate mare, deoarece substituția a avut loc exclusiv la gruparea hidroxil primară a alchilglucozidelor testate. Randamentele au fost determinate din analizele HPLC, pe baza dreptelor de etalonare ale produșilor puri. Cromatogramele HPLC ale monoesterilor aromatici ai alchilglucozidelor purificați sunt redată în Figurile 30 și 31 (Anexe).

### 2.5.2. Caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor

Spectrele de masă MALDI TOF au arătat formarea monoesterilor aromatici a celor două alchilglucozide. În Figurile 2.38 și 2.39 sunt prezentate spectrele de masă ale amestecurilor de reacție de la reacțiile de acilare a  $\alpha$ -metil-glucozei și  $\beta$ -octil-glucozei cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, catalizate de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

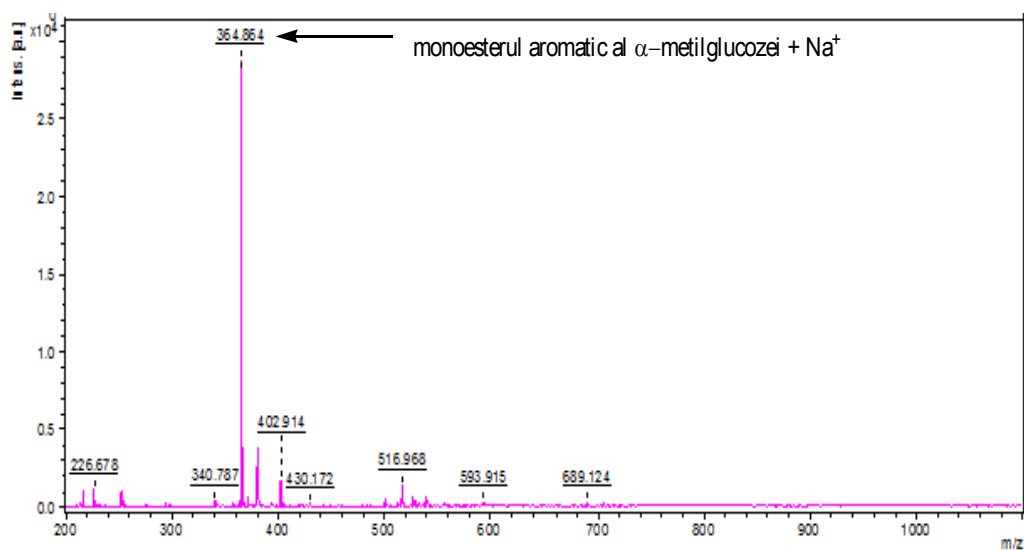


Figura 2.38. Spectrul MALDI TOF MS, în mod ion pozitiv, al amestecului de reacție de la acilarea α-metil-glucozei cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

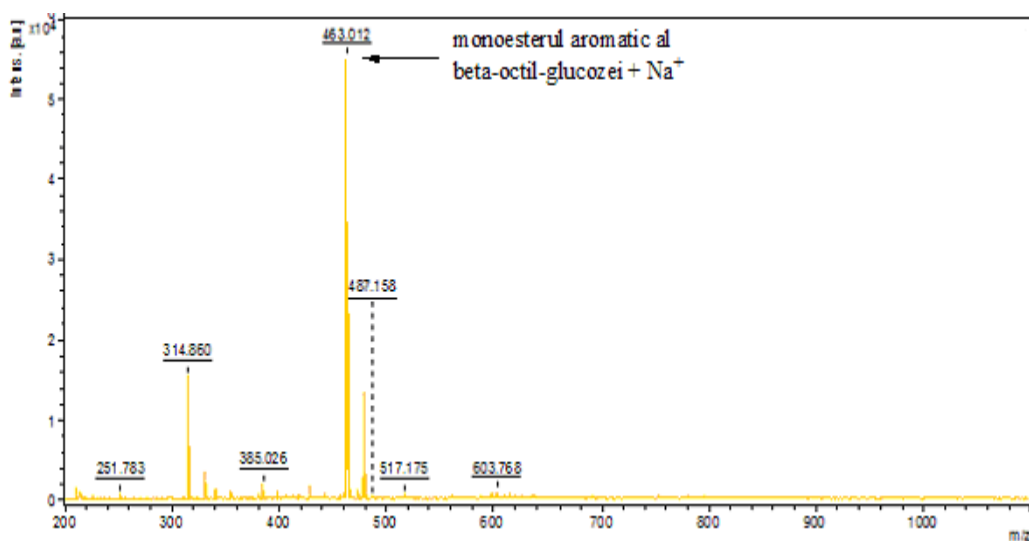


Figura 2.39. Spectrul MALDI TOF MS, în mod ion pozitiv, al amestecului de reacție de la acilarea β-octil-glucozei cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

Spectroscopia în infraroșu a fost utilizată pentru caracterizarea monoesterilor aromatici ai alchilglucozidelor obținuți în urma separării pe coloană gravitațională cu silicagel. Spectrele FT – IR confirmă structura esterilor obținuți, regăsindu-se benzile caracteristice ale alchilglucozei și acidului aromatic, dar și ale legăturii esterice formate (Figurile 32 și 33, Anexe). Tabelul 2.13 prezintă sintetic

semnalele caracteristice pentru esterii obținuți, prin comparație cu substraturile de la care s-a pornit.

Tabelul 2.13. Benzile FT – IR caracteristice esterilor aromatici ai alchilglucozidelor.

Compus	$\nu$ O-H	$\nu$ C-H	$\nu$ C=O (ester)	$\nu$ C=O (HPPA)
acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	3391	2952	-	1698
$\alpha$ -metil-glucoză	3289	2911	-	-
6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionat de $\alpha$ -metil-glucoză	3348	2924	1715	-
$\beta$ -octil-glucoză	3420	2926	-	-
6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionat de $\beta$ -octil -glucoză	3479	2921	1719	-

Figurile 2.40 și 2.41 prezintă comparativ spectrele FT – IR ale HPPA, zaharurilor alchilate și monoesterilor aromatici ale acestora. Spectrele IR au fost realizate în pastilă de KBr.

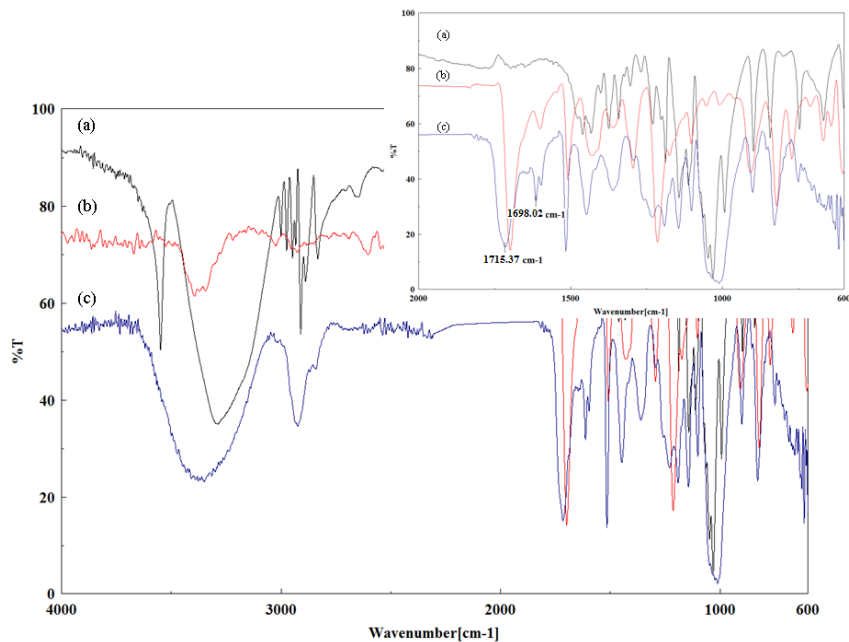


Figura 2.40. Spectrele FT – IR pentru a)  $\alpha$ -metil-glucoză; b) HPPA, c) 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză.

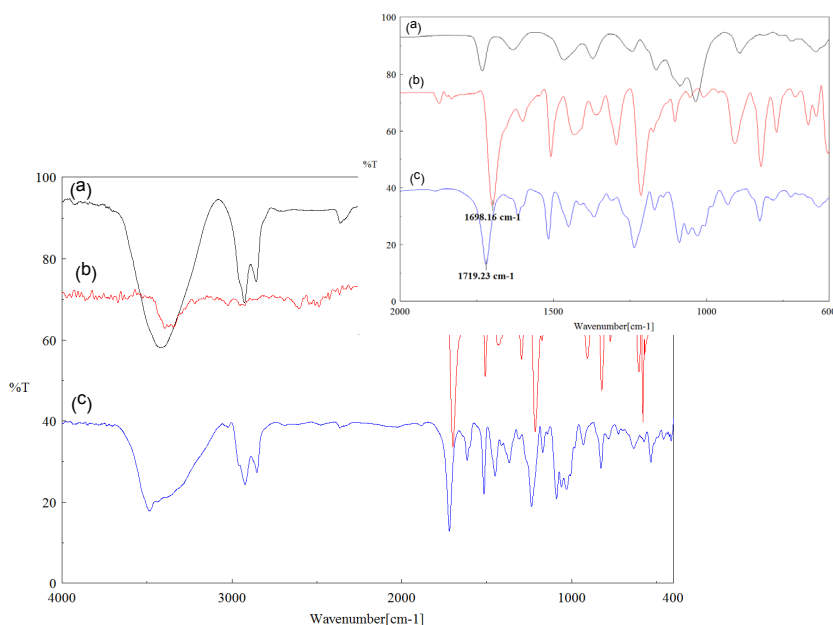


Figura 2.41. Spectrele FT – IR pentru a)  $\beta$ -octil-glucoză; b) HPPA, c) 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză.

Benzile care confirmă prezența grupărilor funcționale semnificative din structura esterilor aromatici ai alchilglucozidelor sunt cele ale vibrațiilor de valență ale grupărilor hidroxil, provenite din molecula glucozei dar și din compusul fenolic ( $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ ), ale grupărilor metilen la aproximativ  $2900\text{ cm}^{-1}$  și ale grupărilor carbonil esterice ( $1715$  și  $1719\text{ cm}^{-1}$ ).

În vederea identificării și confirmării structurilor esterilor aromatici ai alchilglucozidelor, s-au efectuat analizele  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$  și DEPT 135 pentru produșii de reacție obținuți în urma separării pe coloană cromatografică.

Monosubstituția la  $\alpha$ -metilglucoză a avut loc la gruparea OH-6 astfel spectrul  $^{13}\text{C-RMN}$  al monoesterului cu  $\alpha$ -metil-glucoza (Figura 2.42) prezintă 6 semnale pentru alchilglucozidă, 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic și 1 semnal pentru gruparea metoxi: ( $\delta$  ppm) 172,31 (C-7') al grupării carbonil; 155,66 (C-1') al C-OH din inelul aromatic; 130,68 (C-4'); 129,17 (C-3') ai CH din inelul aromatic; 115,20 (C-2') al CH din inelul aromatic; 99,75 (C-1) al C anomic; 73,34 și 71,91 + 70,52 + 69,62 (C-2 + C-3 + C-4 + C-5) din ciclul piranozic; 63,80 (C-6) ai  $\text{CH}_2$  din carbohidrat; 54,42 (C-a) al  $\text{CH}_3$  din gruparea metoxi; 35,64 (C-6') ai  $\text{CH}_2$  din propionat; 29,55 (C-5') al  $\text{CH}_2$  din propionat.

Spectrul  $^1\text{H-RMN}$  al 6-O-(3,4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză (Figura 2.43) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 9,15 (br s, 1H, H-1'); 7,00 (d, 2H,  $J = 8,5\text{ Hz}$ , H-3'); 6,66 (d, 2H,  $J = 8,5\text{ Hz}$ , H-2'); 5,2 – 3,3 (10 multipleteți, 10H, H-1 + H-2 + H-3 + H-4 + H-5 + H-6 + OH din carbohidrat [5,12, d, 1H; 4,87, br s, 1H; 4,77, br d, 1H; 4,54, d, 1H; 4,30, d, 1H; 4,02, dd, 1H; 3,53, t, 1H; 3,46, br s, 1H; 3,40, t, 1H; 3,08, m, 1H]); 3,24, (s, 3H,  $\text{CH}_3$  al grupării metoxi), 2,74 (t, 2H,  $J = 7,5\text{ Hz}$ , H-4'); 2,54 (t, 2H,  $J = 7,5\text{ Hz}$ , H-5').

Spectrul DEPT 135 pentru 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatul de  $\alpha$ -metil-glucoză este redat în Figura 34 (Anexe).

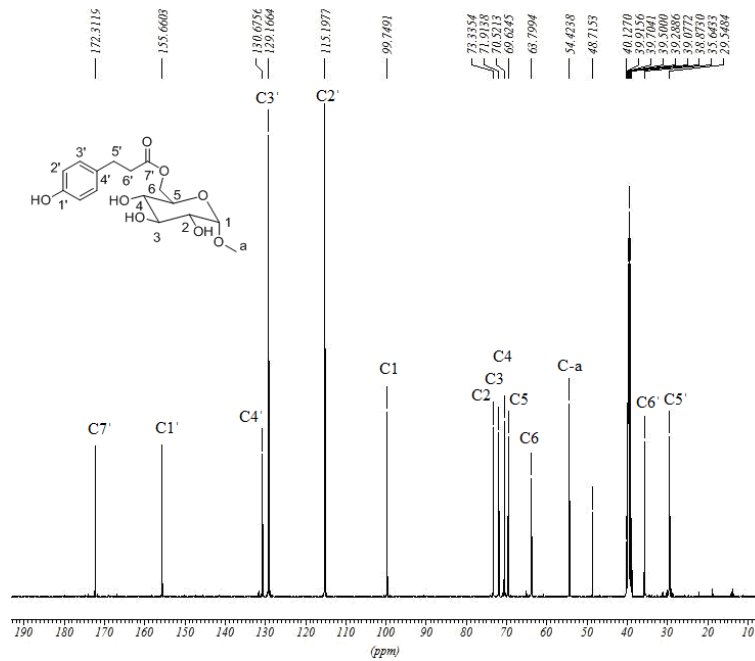


Figura 2.42. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză (DMSO- $d_6$ ).

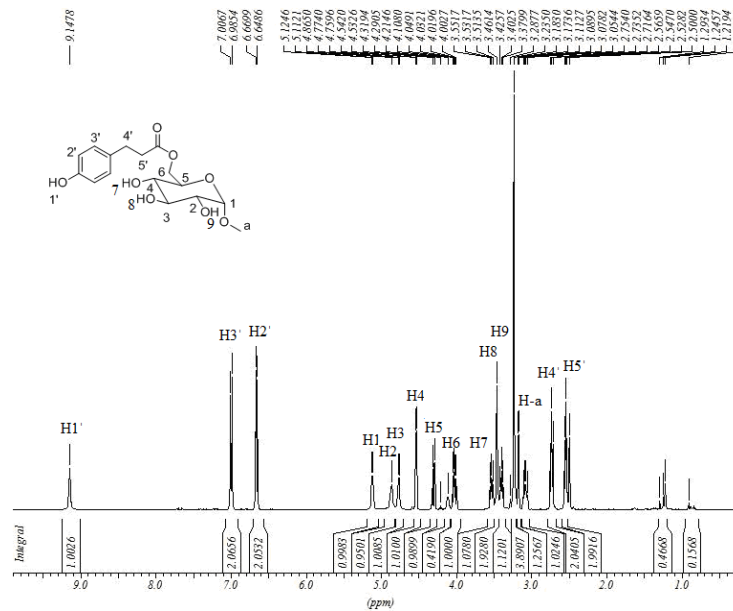


Figura 2.43. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză (DMSO- $d_6$ ).



Monosubstituția la  $\beta$ -octil-glucoză a avut loc la gruparea OH-6, astfel că spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al monoesterului cu  $\beta$ -octil-glucoza (Figura 2.44) prezintă 14 semnale pentru alchilglucozidă și 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic:  $\delta$ (ppm) 172,11 (C-7') al grupării carbonil; 155,58 (C-1') al C-OH din gruparea fenil; 130,48 + 128,98 + 115,04 (C-4' + C-3' + C-2') ai CH din gruparea fenil; 102,85 + 76,47 + 73,55 + 73,30 + 70,17 (C-1 + C-3 + C-5 + C-2 + C-4) ai CH din molecula zaharului; 68,68 (C-8'') al  $\text{CH}_2$  din lanțul octil; 63,73 (C-6) al  $\text{CH}_2$  din molecula zaharului; 35,60 + 29,53 (C-6' + C-5') ai metilenilor din propionat; 31,21 + 29,29 + 28,78 + 28,66 + 25,46 + 22,04 (C-7'' + C-6'' + C-5'' + C-4'' + C-3'' + C-2'') ai metilenilor din lanțul octil; 13,89 (C-1'') ai grupării  $\text{CH}_3$  din lanțul octil.

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al monoesterului cu  $\beta$ -octil-glucoza (Figura 2.45a) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 9,13 (br s, 1H, H-1'); 6,99 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-3'); 6,65 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H-2'); 5,12 (d, 1H, J = 5,3 Hz, H-anomeric); 5,00 + 4,99 (d + s [suprapunere], 2H, H-a + H-b); 4,30 (dd, 1H, J1 = 11,8 Hz, J2 = 2,0 Hz, H-6,7); 4,13 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-1) 4,02 (dd, 1H, J1 = 11,8 Hz, J2 = 7,0 Hz, H-6,7) 3,66 (dt, 1H, J1 = 9,8 Hz, J2 = 6,8 Hz, H-8''a,b); 3,42 (dt, 1H, J1 = 9,8 Hz, J2 = 6,8 Hz, H-8''a,b); 3,32 (m, 1H, H-5); 3,15 (m, 1H, H-3); 3,06 (m, 1H, H-4); 2,96 (m, 1H, H-2); 2,74 (t, 2H, J = 7,5 Hz, H-4'); 2,54 (t, 2H, J = 7,5 Hz, H-5'); 1,50 (m, 2H, H-7''); 1,22 (br m, 10H, H-6'', H-5'', H-4'', H-3'', H-2''); 0,84 (t, 3H, J = 7,0 Hz, H-1'').

Spectrul DEPT 135 pentru 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatul de  $\beta$ -octil-glucoză este redat în Figura 35 (Anexe). Atribuirea semnalelor în spectrele  $^{13}\text{C}$ -RMN și  $^1\text{H}$ -RMN ale 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză a fost efectuată și pe baza experimentelor 2D-COSY și 2D-HSQC (Figura 2.45b).

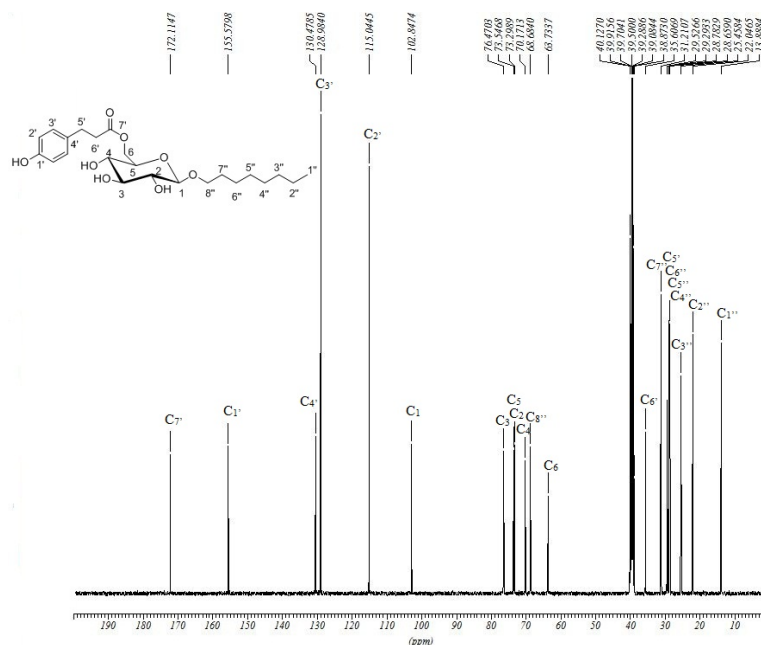


Figura 2.44. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză (DMSO- $d_6$ ).

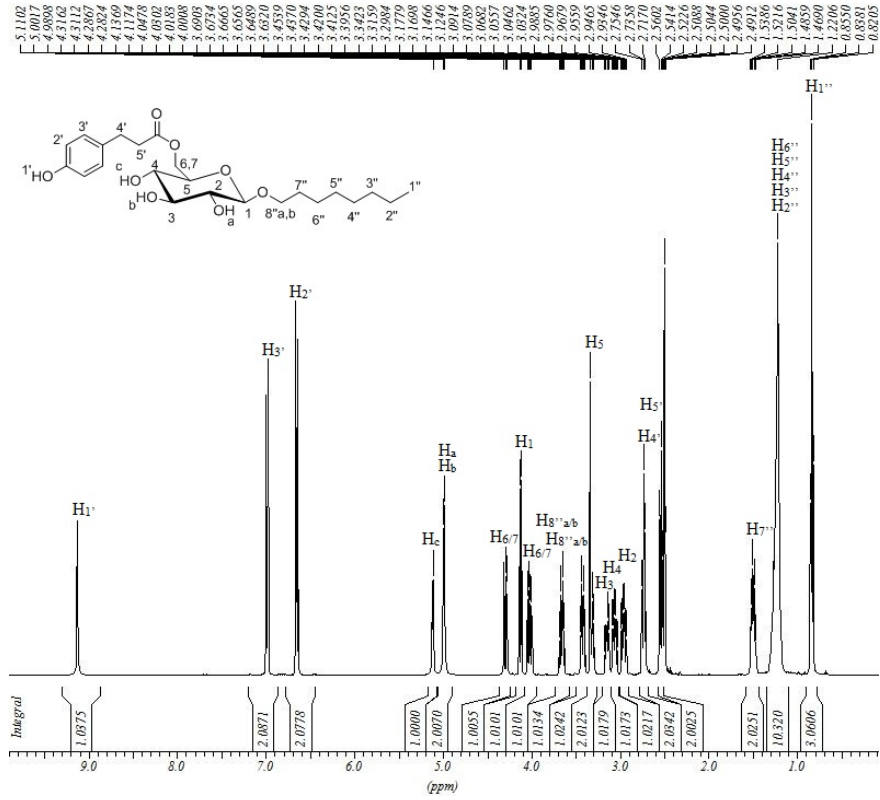


Figura 2.45a. Spectrul  $^1\text{H-RMN}$  al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză (DMSO- $d_6$ ).

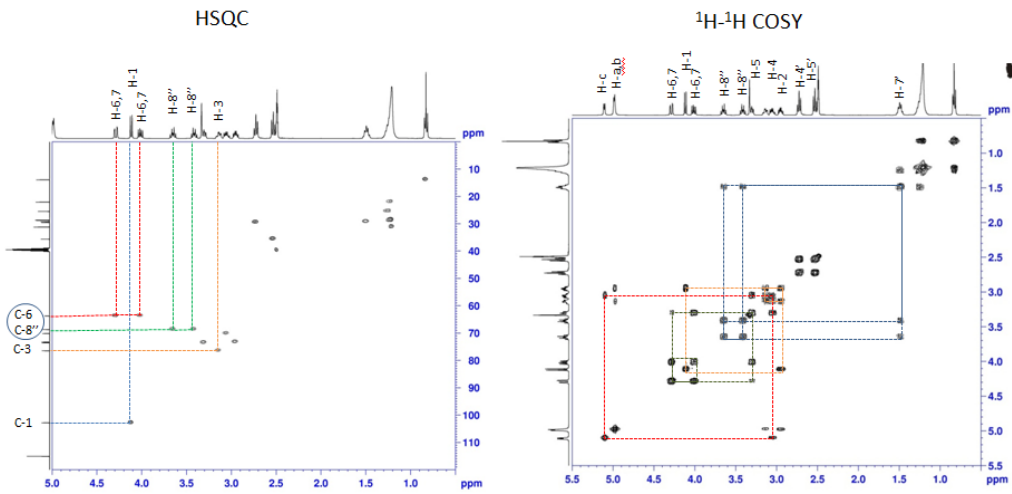


Figura 2.45b. Spectrele 2D-HSQC și 2D-COSY pentru 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză (DMSO- $d_6$ ).

### 2.5.3. Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai acetalilor de zaharuri

#### 2.5.3.1. Sinteza și caracterizarea 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză

Strategia de sinteză ce s-a avut în vedere pornește de la D-glucoză și presupune diacetonarea în cataliză acidă (cu acid sulfuric concentrat) pentru a obține derivatul di-izopropilidenic al glucozei. Hidroliza în mediu acid a acestuia, urmată de neutralizare, a dus la deprotejarea selectivă a grupărilor hidroxil din pozițiile 5 și 6, obținându-se astfel derivatul mono-izopropilidenic al glucozei, cu randament de 56%. Gruparea hidroxil primară din poziția 6 a fost astfel eliberată în vederea esterificării cu acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic, în *tert*-butanol, catalizată de lipaza Novozyme 435, obținându-se esterul aromatic al monoacetalului de glucoză (Figura 2.46). Analizele cantitative prin HPLC au arătat un randament de monoester la reacția de esterificare enzimatică de 60% după 72h, iar după 5 zile o conversie aproape totală (92%). Randamentul de esterificare a fost calculat pe baza analizelor HPLC, cu ajutorul dreptei de etalonare pentru esterul pur. Cromatograma HPLC a esterului aromatic de monoacetonglucoză purificat este redată în Figura 36 (Anexe).

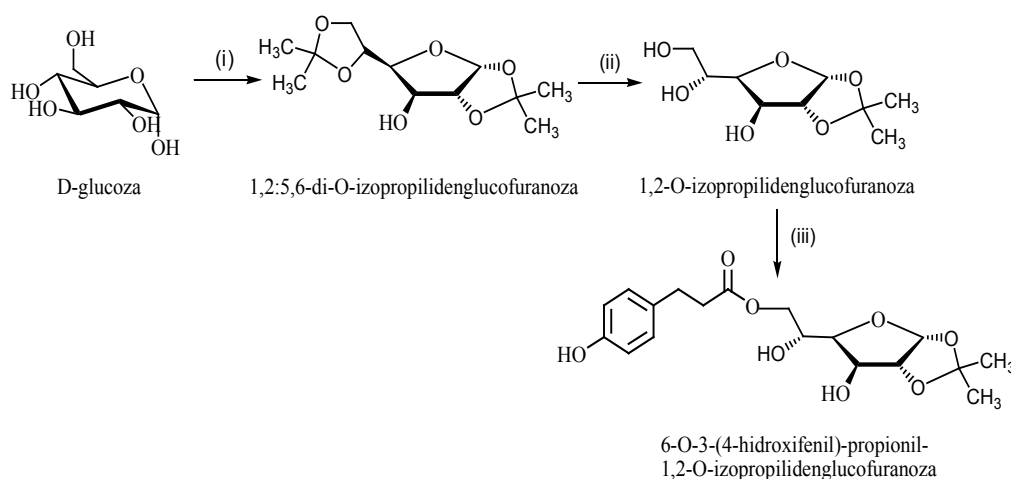


Figura 2.46. Obținerea 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei i) acetonă, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0°C - *t*<sub>cam</sub>, 5h; ii) HCl 1N, 3h, 40°C, NaOH 50%; iii) HPPA, 60°C, 5 zile, Novozyme 435.

Etapa de izopropilidenare a glucozei și cea de hidroliză selectivă a grupării acetal din pozițiile 5,6 au fost monitorizate cu ajutorul cromatografiei în strat subțire. Spectrele <sup>13</sup>C-RMN, <sup>1</sup>H-RMN și DEPT 135 (Figurile 37 – 39, Anexe) au confirmat structura 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei. În Figura 2.47 sunt prezentate comparativ spectrele FT – IR ale glucozei, 1,2-O-izopropilidenglucozei și 1,2:5,6-di-O-izopropilidenglucozei. Se observă diminuarea considerabilă a intensității benzii corespunzătoare grupărilor hidroxil (la aproximativ 3400 cm<sup>-1</sup>) în urma izopropilidenării acestora în pozițiile 1,2 și 5,6, concomitent cu intensificarea semnalelor caracteristice legăturii eterice de la 1377 cm<sup>-1</sup>.

Etapa de esterificare enzimatică a 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei a fost monitorizată atât prin cromatografie în strat subțire cât și prin cromatografie de lichide (HPLC). Produsul final al reacției a fost purificat prin separare pe coloană cu silicagel, identificat prin spectrometrie de masă (MALDI TOF) (Figura 2.48) și caracterizat prin spectrofotometrie în infraroșu (Figura 40, Anexe) și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (Figurile 2.50 și 2.51). Spectrul DEPT 135 pentru monoesterul aromatic al 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei este redat în Figura 41 (Anexe).

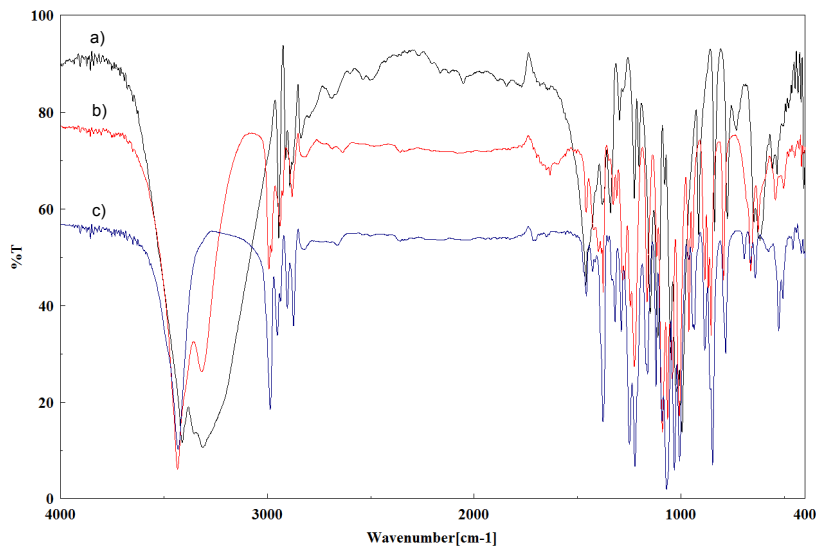


Figura 2.47. Spectrele FT – IR pentru a) glucoză; b) 1,2-O-izopropilidenglucoza și c) 1,2:5,6-di-O-izopropilidenglucoza.

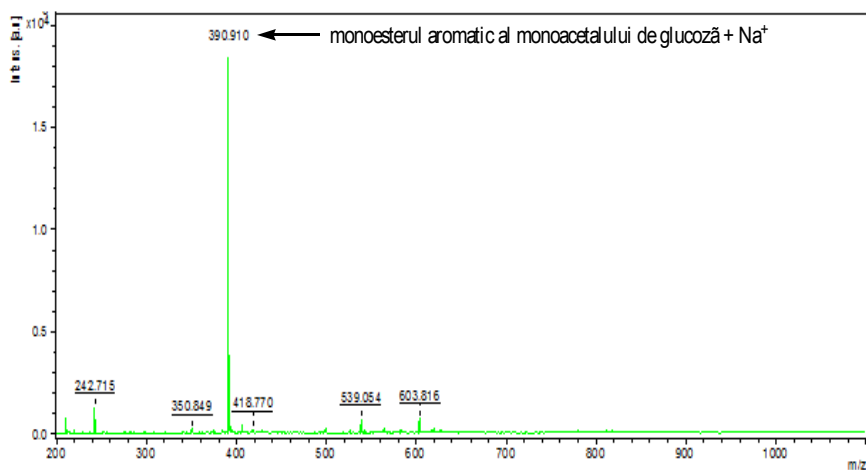


Figura 2.48. Spectrul (+) MALDI TOF MS, al amestecului de reacție de la acilarea 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

În Figura 2.49 sunt prezentate spectrele FT – IR comparative ale 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei, acidului 3-(4-hidroxifenil) propionic și 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză. Spectrul FT – IR (c) confirmă structura esterului aromatic al monoacetonglucozei, regăsindu-se benzile caracteristice pentru monoacetonglucoză și pentru acidul aromatic, cât și cele ale legăturii esterice formate. Benzile semnificative corespund vibrațiilor de valență ale grupărilor hidroxil din molecula glucozei și din HPPA (aproximativ  $3400\text{ cm}^{-1}$ ), grupărilor metilen (între  $2800$  și  $3000\text{ cm}^{-1}$ ) și grupării carbonil esterice ( $1707\text{ cm}^{-1}$ ).

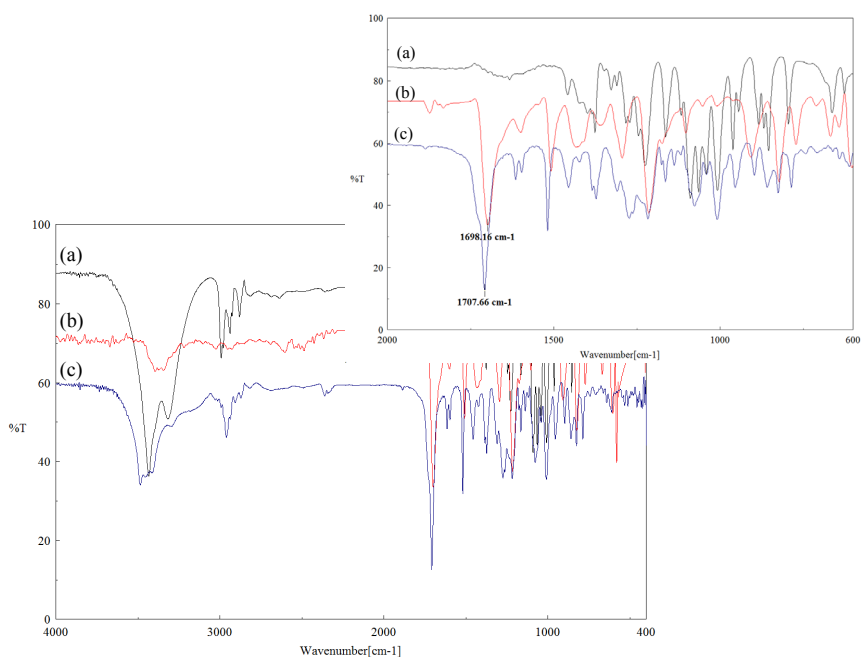


Figura 2.49. Spectrele FT-IR pentru a) 1,2-O-izopropiliden-glucofuranoză, b) HPPA, c) 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatul de 1,2-O-izopropiliden-glucofuranoză.

Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză prezintă 7 semnale pentru restul acil ce conține nucleul aromatic, 6 semnale pentru carbohidrat și 2 semnale pentru gruparea izopropilidenică:  $\delta$  (ppm) 172,24 (C-7') a grupării carbonil; 155,52 (C-1') al grupării C-OH din restul aromatic; 130,58 (C-4') din restul aromatic; 129,02 + 115,07 (C-3' + C-2') al grupărilor CH din restul aromatic; 104,47 + 84,61 + 80,20 + 72,88 + 65,18 (C-1 + C-2 + C-4 + C-3 + C-5) al grupărilor CH din carbohidrat; 66,65 (C-6) al grupării  $\text{CH}_2$  din carbohidrat; 35,67 + 29,45 (C-6' + C-5') al  $\text{CH}_2$  din propionat; 26,65 + 26,09 (C-8 și C-9) al grupării  $\text{CH}_3$  din restul izopropilidenic.

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză prezintă următoarele semnale:  $\delta$  (ppm) 9,14 (br s, 1H, H-1'); 7,00 (d, 2H,  $J = 8,5\text{ Hz}$ , H-3'); 6,65 (d, 2H,  $J = 8,5\text{ Hz}$ , H-2'); 5,80 (d, 1H,  $J = 3,5\text{ Hz}$ , H-1); 5,21 (br s, 1H, OH din carbohidrat); 5,00 (br s, 1H, OH din carbohidrat); 4,39 (d, 1H,  $J = 3,5\text{ Hz}$ , H-2); 4,21 (d, 1H,  $J = 9,5\text{ Hz}$ , H-6,7); 4,05 (br s, 1H, H-3); 3,95-3,88 (3 multipleteți, 3H, H-4 + H-5 + H-6,7); 2,75 (t, 2H,  $J =$

7,5 Hz, H-4'); 2,55 (t, 2H, J = 7,5 Hz, H-5'); 1,37 + 1,23 (2x s, 2x 3H, 2x CH<sub>3</sub> din acetal, H-8,9).

Atribuirea semnalelor în spectrele <sup>13</sup>C-RMN și <sup>1</sup>H-RMN ale 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză a fost efectuată și pe baza experimentelor 2D-COSY și 2D-HSQC.

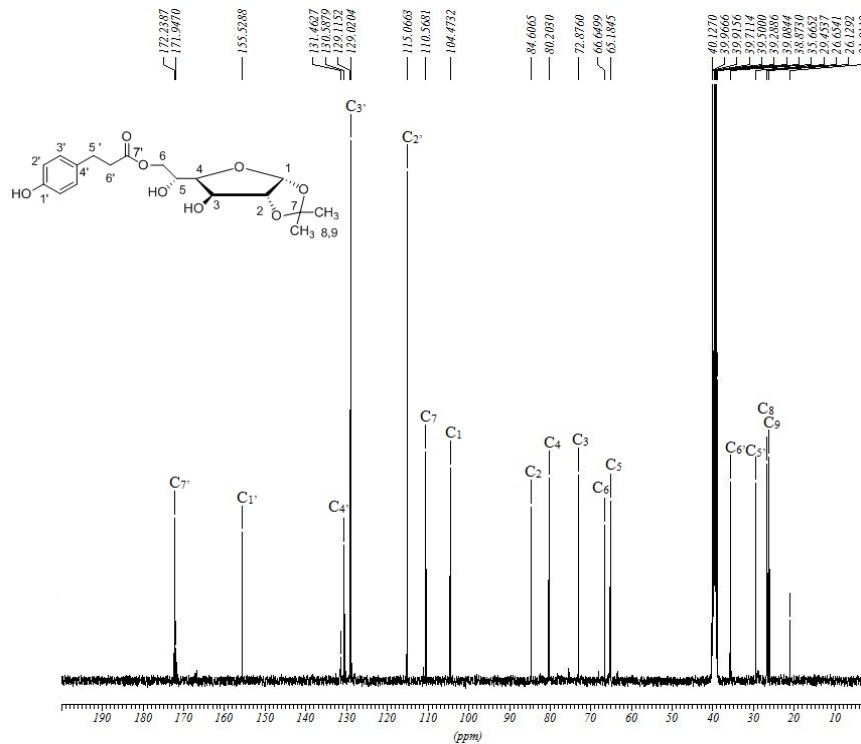


Figura 2.50. Spectrul <sup>13</sup>C-RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză (DMSO-d<sub>6</sub>).

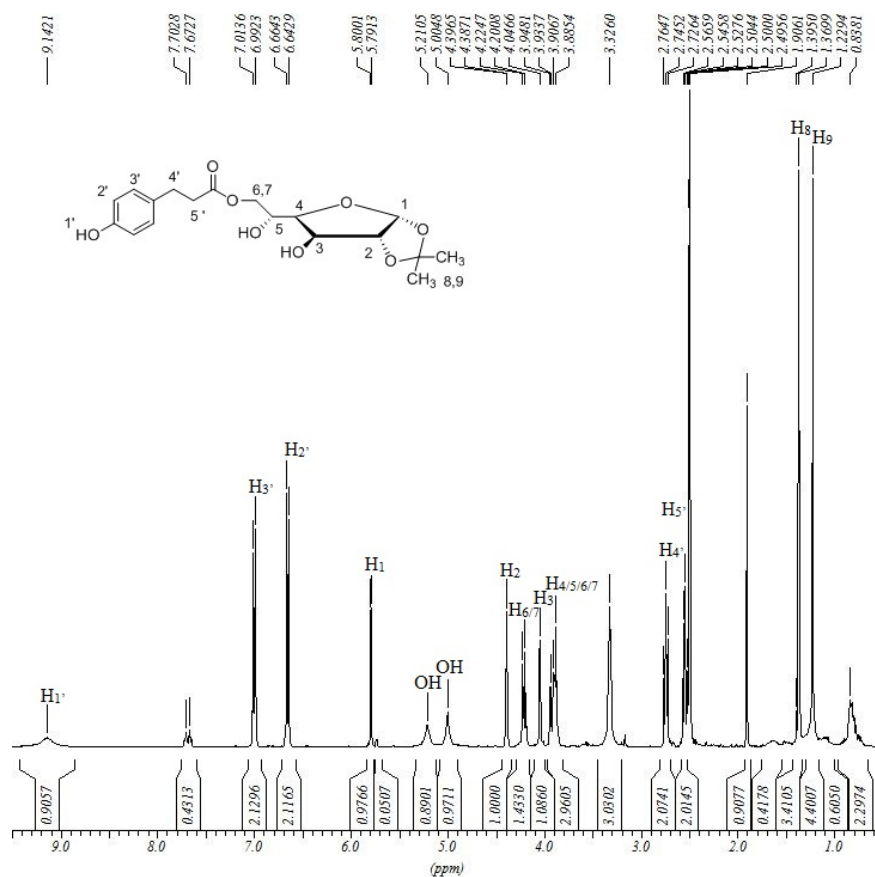


Figura 2.51. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză (DMSO- $d_6$ ).

### 2.5.3.2. Sinteza și caracterizarea 3-(4-hidroxifenil)-propionatului de mono-O-izopropilidenzaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză

Schema de reacții pentru sinteza esterului aromatic al acetalilor de zaharoză este prezentată în Figura 2.52. Conform acestei scheme, zaharoza a fost derivatizată prin izopropilidenare în cataliză acidă (acid p-toluensulfonic) cu 2,2-dimetoxipropan, cu obținerea unui amestec format din derivatul mono-izopropilidenic și di-izopropilidenic al acesteia (2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză). Conversia totală a zaharozei în această etapă a fost de 64%. În a doua etapă, amestecul format din derivații izopropilidenici ai zaharozei a fost supus esterificării enzimatică cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, în prezența lipazei Novozyme 435, în *tert*-butanol, cu formarea monoesterului aromatic de mono-O-izopropilidenzaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză, conversia totală în această etapă fiind de 27%, după 4 zile de reacție. Conversia totală în etapa de esterificare enzimatică a fost determinată cu ajutorul cromatografiei de lichide (HPLC), pe baza consumării HPPA. Structura

derivatului mono-izopropilidenic al zaharozei nu a fost confirmată prin spectroscopie RMN, deoarece acest compus nu a putut fi purificat corespunzător. Având în vedere structura zaharozei, acetalizarea ar fi putut avea loc fie în pozițiile 3,4, fie în pozițiile 4,6 iar esterificarea enzimatică cel mai probabil a avut loc la gruparea hidroxil primară din poziția 6 sau 6'. În schema de reacție este redată prima variantă, pentru exemplificare.

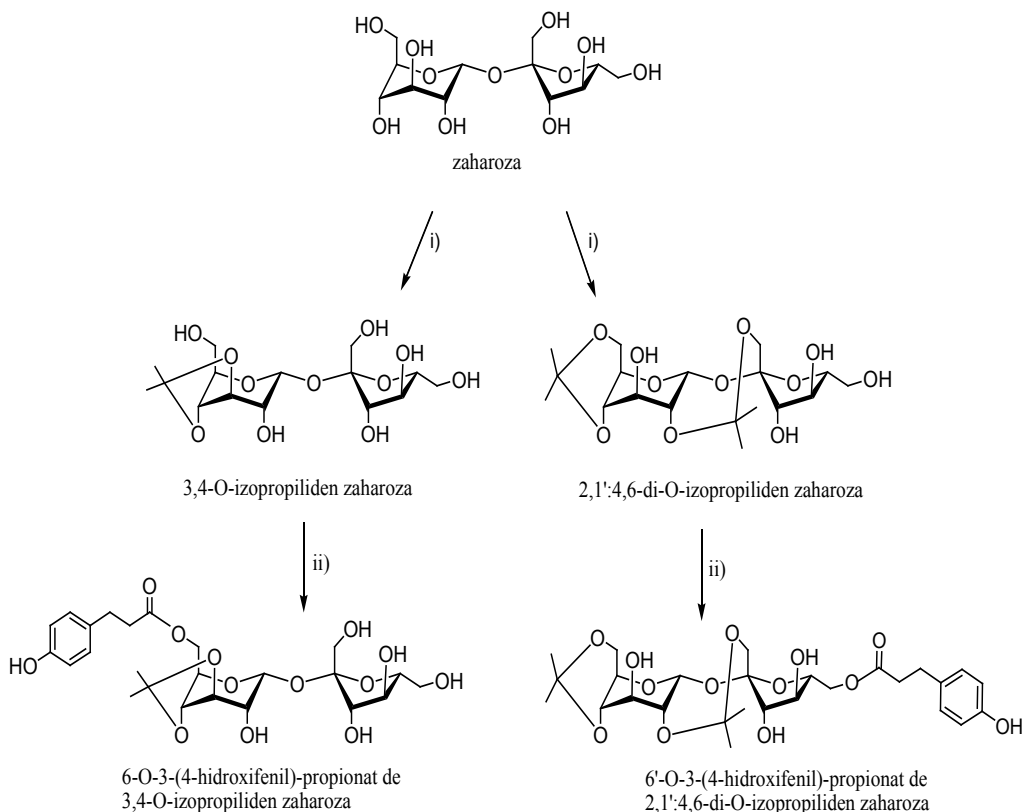


Figura 2.52. Obținerea 6-O-3-(4-hidroxiifenil)-propionatului de 3,4-O-izopropiliden zaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxiifenil)-propionatului de 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză i) 2,2-dimetoxipropan, acid p-toluensulfonic, DMF,  $t_{cam}$ , 2h; ii) HPPA, 60°C, 72h, Novozyme 435.

Reacția de acetalizare a zaharozei a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei în strat subțire, iar reacția enzimatică prin cromatografie de lichide (HPLC). Spectrometria de masă (MALDI TOF) a fost utilizată pentru identificarea intermediarilor de reacție și produșilor finali (Figura 2.53).



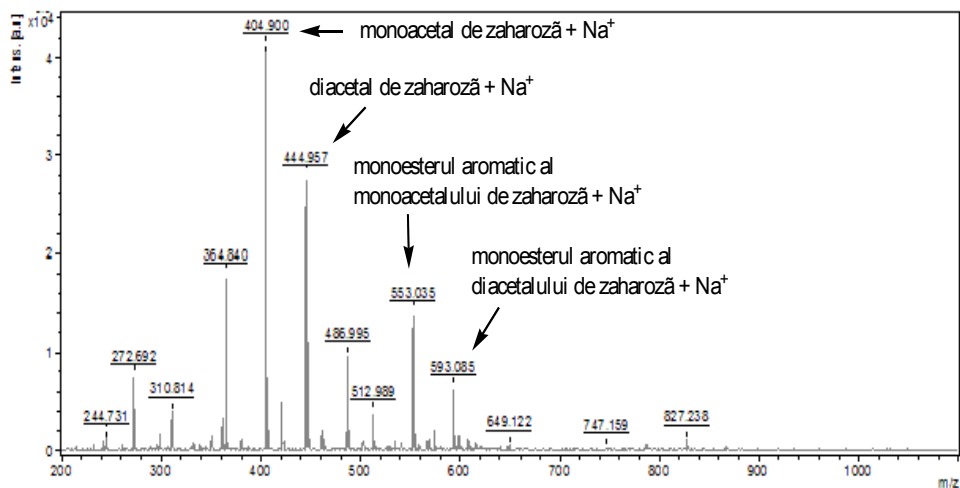


Figura 2.53. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea amestecului de mono-izopropilidenzaharoză și 2,1',4,6-di-O-izopropiliden zaharoză cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

Derivatul di-izopropilidenic al zaharozei a fost purificat prin separare pe coloană și apoi caracterizat prin spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară. În Figura 2.54 sunt redat comparativ spectrele FT - IR ale zaharozei și 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharozei.

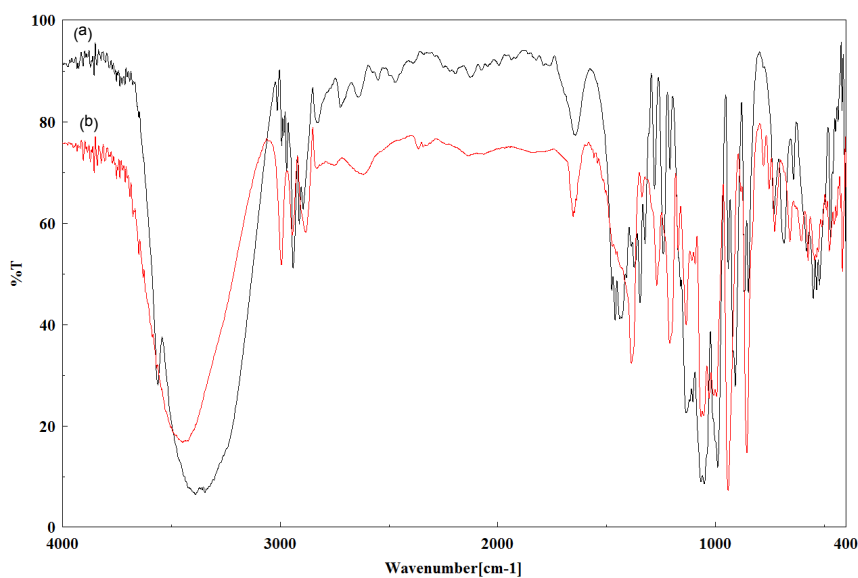


Figura 2.54. Spectrele FT - IR pentru a) zaharoză; b) 2,1':4,6-di-O-izopropiliden zaharoză.

Diacetalizarea zaharozei a avut loc la grupările hidroxil din pozițiile 2, 1', 4 și 6, astfel că spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al derivatului di-izopropilidenic al zaharozei (Figura 2.55) prezintă 12 semnale pentru zaharoză și 6 semnale pentru cele două resturi izopropilidenice: ( $\delta$  ppm) 19,3 + 29,5 + 24,5 + 25,4 (C-8 + C-9 + C-8' + C-9') ai grupărilor metil din acetal; 62,7 + 64,1 + 70,1 (C-1' + C-6' + C-6) ai metilenilor din zaharoză; 66,9 + 74,2 + 74,3 + 74,5 + 74,8 + 80,1 + 84,1 + 91,9 (C-4 + C-3' + C-4' + C-2 + C-3 + C-5 + C-5' + C-1) ai grupărilor CH din zaharoză; 99,9 + 102,1 (C-7 + C-7') din acetal; 104,1 (C-2').

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al derivatului di-izopropilidenic al zaharozei (Figura 2.56) prezintă următoarele semnale caracteristice:  $\delta$  (ppm) 1,21 + 1,27 + 1,37 + 1,49 (12 H, 3s, 8- $\text{CH}_3$ , 9- $\text{CH}_3$ , 8'- $\text{CH}_3$  și 9'- $\text{CH}_3$ ); 3,2 – 4,3 (13 H, m, protonii zaharozei); 6,1 (1 H, d, 1-H). Spectrul DEPT 135 al diacetalului de zaharoză este redat în Figura 42 (Anexe).

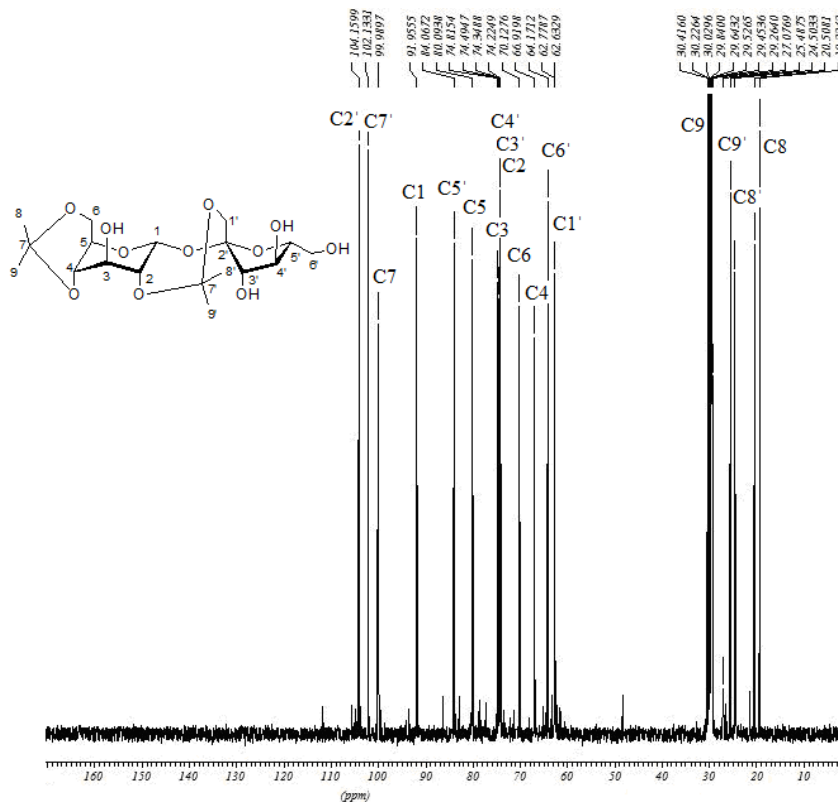


Figura 2.55. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharozei (DMSO- $d_6$ ).

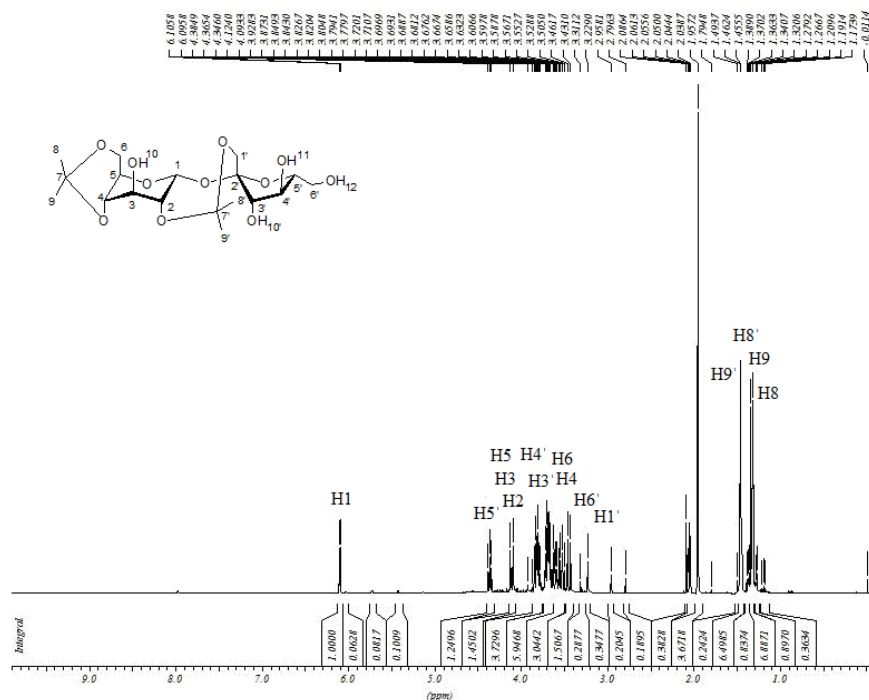


Figura 2.56. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharozei (DMSO- $d_6$ ).

### 2.5.3.3. Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai inulinei

Schema de reacții avută în vedere a pornit de la inulină (amestec de oligozaharide cu DP = 2 – 7, cele mai abundente fiind cele cu DP = 3, 4 și 5) și a presupus izopropilidenarea acestora în cataliză acidă (acid p-toluensulfonic) cu 2,2-dimetoxipropan obținându-se un amestec de derivați izopropilidenici ai inulinei. Amestecul brut a fost supus mai departe esterificării enzimatică cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, în *tert*-butanol, în prezența Novozyme 435. Spectrele de masă au arătat formarea derivaților mono-, di- și tri-izopropilidenici la DP = 2 – 5 precum și a mono- și diesterului aromatic al monoacetalului de inulină la gradul de polymerizare 2 și monoesterului aromatic al monoacetalului de inulină la gradul de polymerizare 3. Conversia totală în etapa de acetalizare a inulinei a fost de 52%, iar în etapa de esterificare enzimatică a fost de 24% după 4 zile de reacție. Reacția de acetalizare a inulinei a fost monitorizată în timp cu ajutorul cromatografiei în strat subțire, iar reacția de esterificare enzimatică a acetalilor de inulină a fost monitorizată prin cromatografie de lichide (HPLC). Conversia totală în etapa enzimatică a fost determinată pe baza analizelor HPLC, pe baza consumării HPPA. În Figura 2.57 sunt redate structurile chimice ale inulinei și derivaților de inulină, ținând cont de posibilitățile de acetalizare a inulinei și de esterificare a acetalilor de inulină, în literatura de specialitate nefiind descriși până în prezent acest tip de derivați ai inulinei.

Pentru identificarea intermediarilor de reacție și a produșilor finali a fost utilizată spectrometria de masă (MALDI TOF). În Figura 2.58 este prezentat spectrul

de masă (MALDI TOF) al amestecului de reacție de la acetalizarea inulinei, în care au fost identificate valorile  $m/z$  corespunzătoare aducțiilor cu sodiu ai acetalilor de inulină la diferite grade de polimerizare, enumerate în Tabelul 2.14.

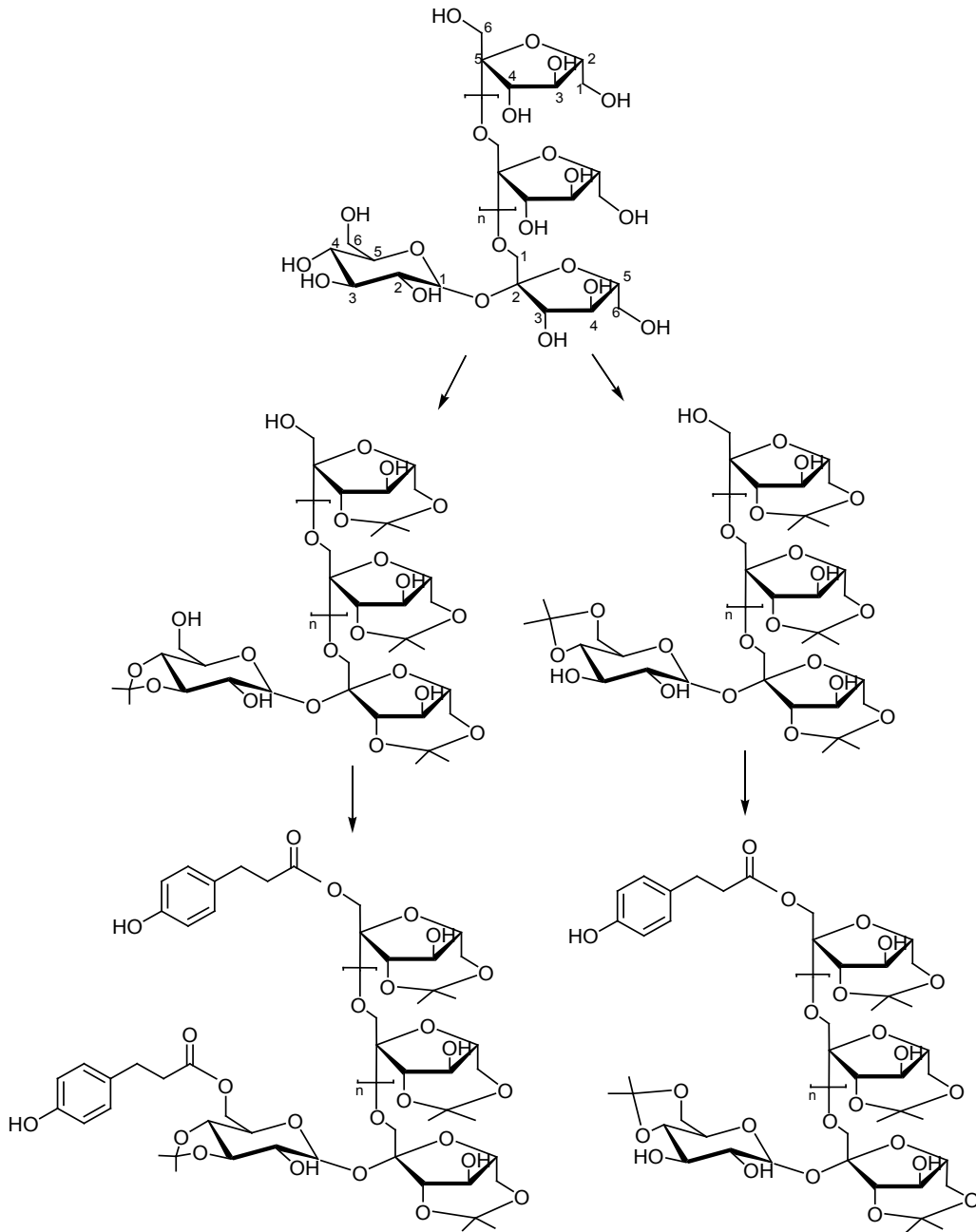


Figura 2.57. Structura inulinei și structurile posibile ale acetalilor de inulină și esterilor aromatici ai acetalilor de inulină.

Tabelul 2.14. Valorile  $m/z$  corespunzătoare aducțiilor cu sodiu ai acetalilor de inulină, identificate în spectrul de masă al amestecului de reacție de la acetalizarea inulinei.

Grad de polimerizare	$m/z$					
	Monoacetal + Na <sup>+</sup>	Nr.*	Diacetal + Na <sup>+</sup>	Nr.*	Triacetal + Na <sup>+</sup>	Nr.*
2	405	1	445	2	-	-
3	567	3	607	4	647	5
4	729	6	769	7	809	8
5	891	9	931	10	971	11
6	1053	12	1093	13	-	-

\*Cod în spectrul de masă

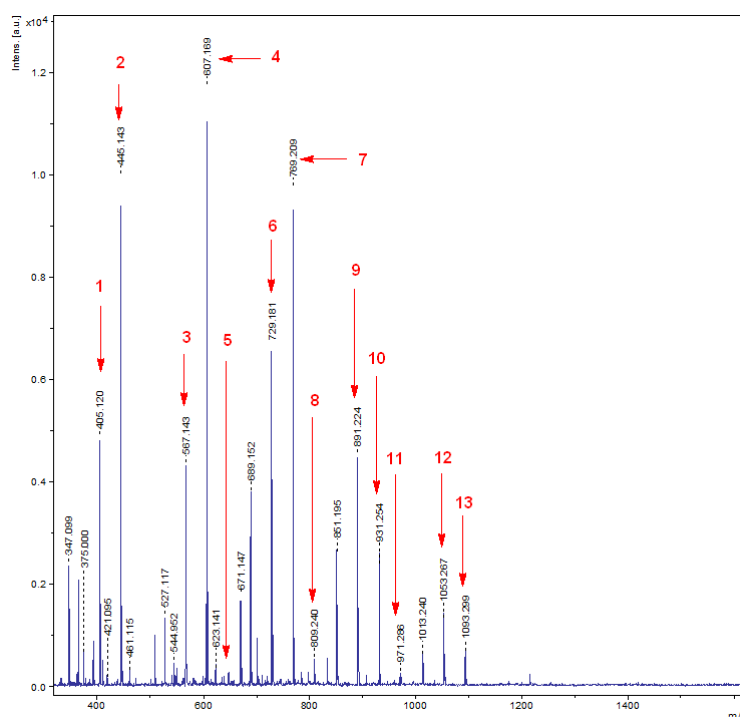


Figura 2.58. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acetalizarea inulinei.

În spectrul de masă al amestecului de reacție de la acilarea enzimatică a acetalilor de inulină cu HPPA (Figura 2.59) au fost identificate valorile  $m/z$  corespunzătoare aducțiilor cu sodiu ai esterilor aromatici formați cu derivații izopropilidenici de inulină și anume la gradul de polimerizare 2 au fost identificați aducții cu sodiu ai monoesterului și diesterului aromatic cu monoacetalul (compusul 1 cu  $m/z = 553$ , compusul 3 cu  $m/z = 701$ ), monoesterului aromatic cu diacetalul (compusul 2 cu  $m/z = 593$ ) iar la gradul de polimerizare 3 a fost identificat aductul cu sodiu al monoesterului aromatic cu monoacetalul (compusul 3 cu  $m/z = 717$ ).

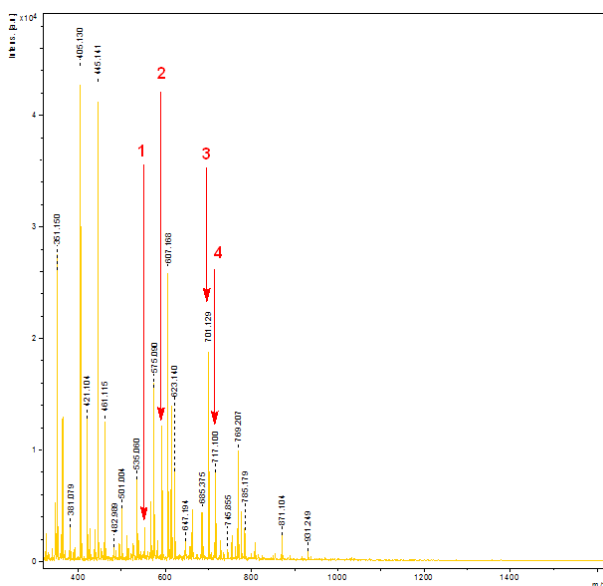


Figura 2.59. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea acetalilor de inulină cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

#### 2.5.3.4. Sinteza și caracterizarea 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei și 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei

S-a propus derivatizarea lactozei prin izopropilidenare în mediu acid (acid p-toluensulfonic) cu 2,2-dimetoxipropan, la reflux, cu obținerea unui amestec format din doi derivați tri-izopropilidenici și anume 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza și 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza (Figura 2.60). Acești compuși au fost purificați prin cromatografie pe coloană cu silica gel, iar 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza a fost supusă mai departe esterificării enzimatică cu HPPA, în *tert*-butanol, la 60C, în prezența Novozyme 435. Reacția de acetalizare a lactozei a fost monitorizată prin cromatografie în strat subțire iar reacția de esterificare enzimatică a fost monitorizată atât prin cromatografie în strat subțire cât și prin cromatografie de lichide (HPLC) și spectrometrie de masă (MALDI TOF). Pe baza analizei HPLC și a spectrului de masă (Figura 2.61) s-a concluzionat că esterificarea enzimatică a grupării hidroxil primare a derivatului tri-O-izopropilidenic nu a avut loc, probabil datorită unor fenomene de împiedicare sterică având în vedere prezența grupării acetal în pozițiile 3',4' și structura mai voluminoasă a acidului cu componentă aromatică. Acetalii de lactoză purificați au fost caracterizați prin spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.

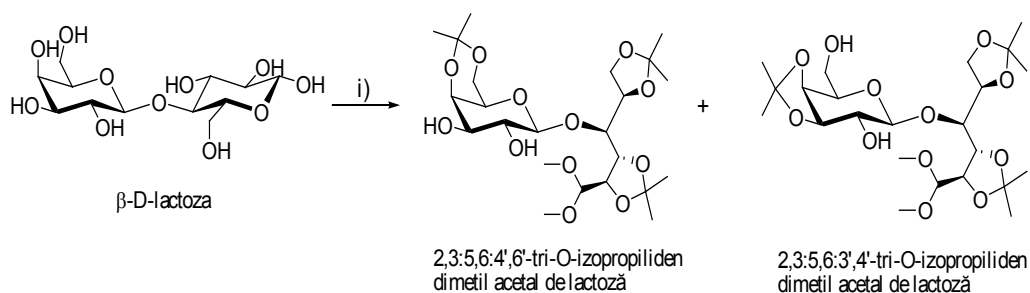


Figura 2.60. Obținerea 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei și 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei prin acetalizarea lactozei cu 2,2-dimetoxipropan, în prezența acidului p-toluensulfonic, la reflux, 24h.

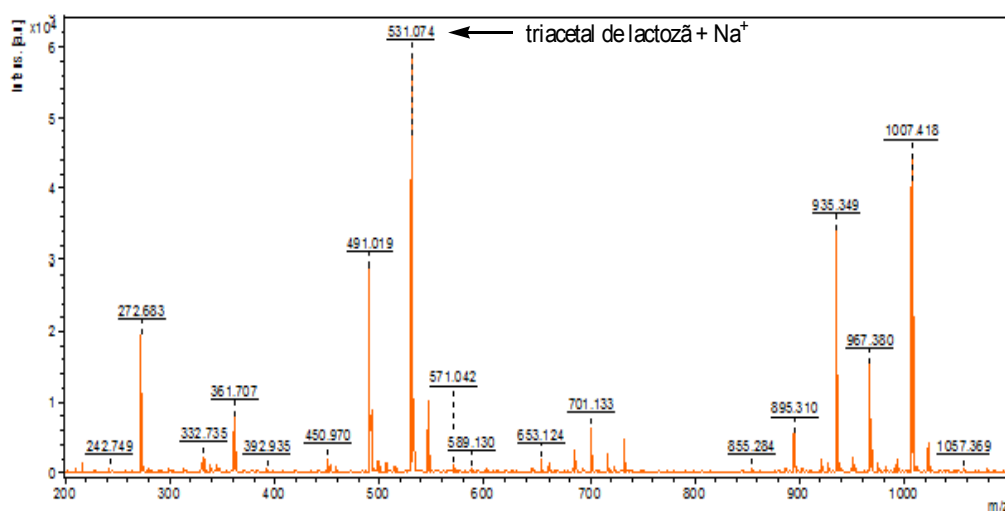


Figura 2.61. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la esterificarea 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei cu HPPA, în *terț*-butanol, la 60C, în prezența Novozyme 435.

În Figura 2.62 sunt ilustrate comparativ spectrele FT - IR ale lactozei și 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză. Dacă lactoza prezintă un semnal intens la aproximativ 3400 cm<sup>-1</sup> corespunzând grupărilor hidroxil libere, la izopropilidenarea grupărilor hidroxil din diferite poziții se remarcă diminuarea considerabilă a acestei benzi concomitent cu intensificarea semnalelor caracteristice legăturii eterice de la aproximativ 1370 cm<sup>-1</sup>.

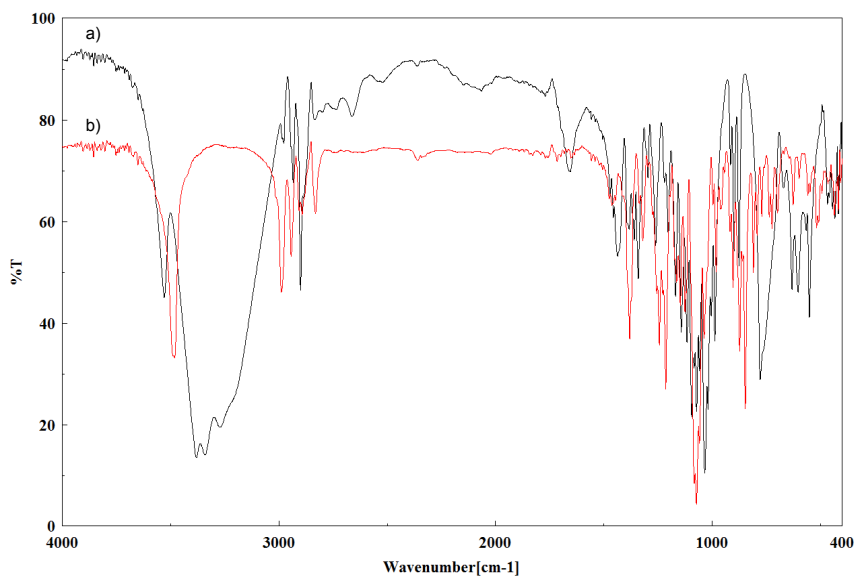


Figura 2.62. Spectrele FT – IR pentru a) lactoză și b) 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză.

Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză (Figura 2.63) prezintă următoarele semnale caracteristice: ( $\delta$  ppm) 107,6 + 76,39 + 78,8 + 76,78 + 78,1 + 104,6 + 74,8 + 80,8 + 74,56 + 75,34 (C-1 + C-2 + C-3 + C-4 + C-5 + C-1' + C-2' + C-3' + C-4' + C-5') ai grupărilor CH din lactoză; 62,58 + 65,9 (C-6 + C-6') ai metilenilor din lactoză; 25,3 + 26,5 + 26,7 + 26,8 + 27,5 + 28,5 (C-11 + C-12 + C-13 + C-14 + C-15 + C-16 + C-17) ai grupărilor metil din acetali; 54,5 + 57,01 (C-7 + C-8) ai grupărilor metoxi; 108,8 + 110,06 + 110,11 (C-9 + C-10 + C-15) ai  $\text{CMe}_2$  din acetali.

Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză (Figura 2.64) prezintă următoarele semnale caracteristice: ( $\delta$  ppm) 1,32 (s, 3H, H-11); 1,33 (s, 3H, H-12); 1,39 (s, 6H, H-13 și H-14); 2,00 (s, 6H, H-16 și H-17); 3,46 + 3,48 (2s, 3H, 2 x OMe); 3,62 – 4,58 (14H, m, protonii lactozei).

Spectrul DEPT 135 al 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză este prezentat în Figura 43 (Anexe).

Spectrele  $^{13}\text{C}$ -RMN,  $^1\text{H}$ -RMN și DEPT 135 al 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei sunt prezentate în Figurile 44 – 46 (Anexe).



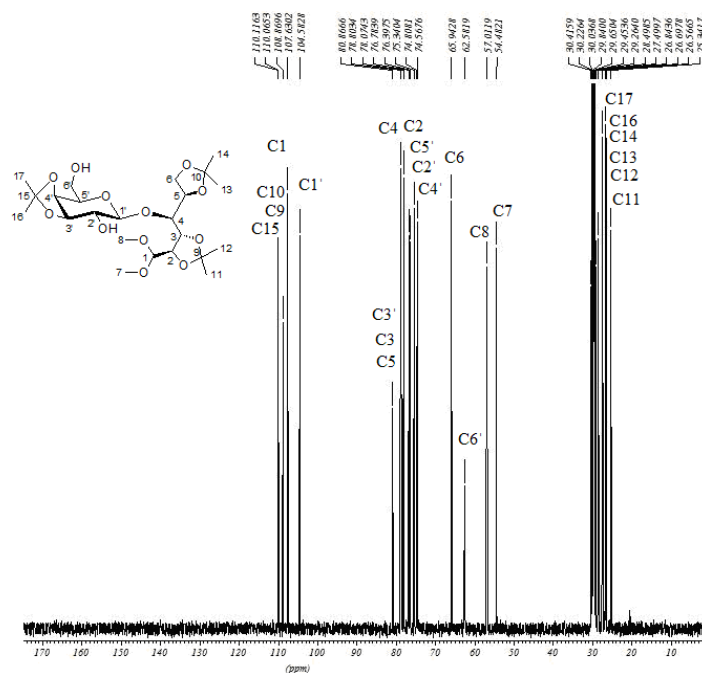


Figura 2.63. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei (acetona-d<sub>6</sub>).

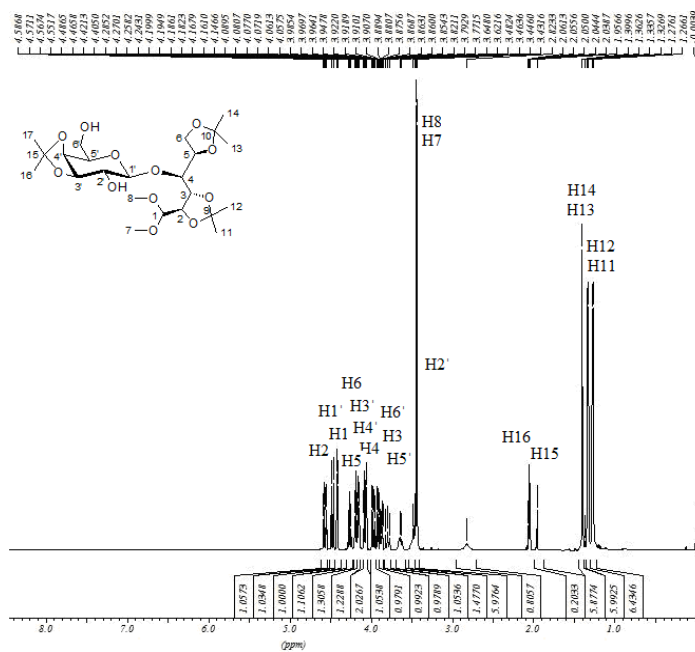


Figura 2.64. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei (acetona-d<sub>6</sub>).

#### 2.5.4. Concluzii

- Prezența grupărilor alchil și respectiv izopropilidenice în structura zaharurilor a dus la creșterea solubilității lor în mediul de reacție și astfel la creșterea reactivității lor, comparativ cu zaharurile neprotejate.
- Monoesterii aromatici ai  $\alpha$ -metil-glucozei și  $\beta$ -octil-glucozei au fost sintetizați enzimatic în mediu de solvent organic, cu randamente ridicate.
- Derivatizarea zaharurilor cu grupări izopropilidenice a avut loc cu randamente de peste 50%, iar grupările hidroxil primare (din poziția 6 în cazul glucozei și din poziția 6' în cazul lactozei și zaharozei) au rămas neprotejate, în vederea esterificării enzimatic.
- Prin spectroscopie RMN s-a demonstrat că acilarea cu acidul cu componentă aromatică a avut loc numai la grupările hidroxil primare.
- Monoesterul aromatic al monoacetonglucozei a fost obținut enzimatic cu randament de peste 90%, după 5 zile de reacție.
- În cazul zaharozei, spectrele de masă au arătat formarea monoesterilor aromatici ai derivaților mono- și di-izopropilidenați.
- Spectrometria de masă a arătat formarea derivaților mono- și di-izopropilidenici ai inulinei la grade de polimerizare cuprinse între 2 și 6, a derivaților tri-izopropilidenici la grade de polimerizare între 3 și 5 precum și esterii aromatici ai mono- și diacetalilor de inulină, la grad de polimerizare 2 și esterul aromatic al monoacetalului, la grad de polimerizare 3.
- Confirmarea structurii esterilor aromatici sintetizați, prin spectrometrie de masă, spectroscopie de FT – IR și spectroscopie RMN, demonstrează valabilitatea metodei chemo-enzimatică elaborate pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor.

## 3. PARTEA EXPERIMENTALĂ

### 3.1. Materiale

În reacțiile de esterificare, transesterificare și acetalizare s-au folosit: 1-octanol (Aldrich), laurat de vinil (Fluka), n-hexan (Merck), n-hexadecan (Merck), lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (Sigma Aldrich), *Pseudomonas cepacia* (Fluka), *Candida antarctica B* (Novozymes), *Candida rugosa* (Fluka), *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes), *Aspergillus niger* (Fluka), *Rhizopus oryzae* (Fluka), pancreas de porc (Fluka), germeni de grâu (Fluka), laurat de butil (Fluka), acid 3-(4-hidroxifenil) propionic (Aldrich), 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil (Aldrich), acid ferulic (Aldrich), acid cafeic (Aldrich), acid p-cumaric (Aldrich), acid galic (Aldrich), acid vanilic (Aldrich), ferulat de etil (Aldrich), galat de propil (Aldrich), esterul etilic al acidului 3,4-dihidroxibenzoic (Aldrich), *tert*-butanol (Sigma Aldrich), n-decan (Acros Organics),  $\alpha$ -D-glucoză (Sigma), zaharoză (Acros Organics), lactoză monohidrat (Acros Organics), inulină cu grad de polimerizare între 2 – 9 (Orafti), maltodextrine cu DE8 (Roquette, Franța), dimetilsulfoxid (Fluka), site moleculare (Sigma Aldrich), acid 2,5-dihidroxibenzoic (Aldrich), acetonitril (Merck), alcool *tert*-amilic (Merck), metil-*tert*-butil-eter (Acros Organics), 2-butanonă (Acros Organics), polietilenglicol (PEG M=20000 de concentrație 20% de la Sigma Aldrich), fluorură de sodiu (Sigma Aldrich), alcool izopropilic 99,7% (Sigma Aldrich), fenil-trimetoxisilan PhTMOS 99% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), tetrametoxisilan TMOS 98% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), metil-trimetoxisilan MeTMOS 98% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), izobutil-trimetoxisilan iBuTMOS 99% (Brunswig), propil-trimetoxisilan PrTMOS 97% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), octil-trimetoxisilan OcTMOS 95% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), vinil-trimetoxisilan VTMO 98% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), dimetil-dimetoxisilan DMeDMOS 97% (Fluka), fenil-metil-dimetoxisilan PhMeDMOS 97% (Aldrich), 3-aminopropil-trimetoxisilan 3-NH<sub>2</sub>Pr TMOS 98% (Alfa Aesar, Brunswig Chemie, NL), xilitol (Sigma Aldrich), manitol, sorbitol, arabitol (Acros Organics), Novozyme 435 (Novozymes), Lipozyme TL IM (Novozymes), tetrafluoroborat de octil-metil-imidazoliu OmimBF<sub>4</sub> (Fluka), tetrafluoroborat de etil-metil-imidazoliu EmimBF<sub>4</sub> (Merck), tetrafluoroborat de propil-metil-imidazoliu PmimBF<sub>4</sub> (Merck), tetrafluoroborat de butil-metil-imidazoliu BmimBF<sub>4</sub> (Merck), tetrafluoroborat de hexil-metil-imidazoliu HmimBF<sub>4</sub> (Merck), hexafluorofosfat de butil-metil-imidazoliu BmimPF<sub>6</sub> (Merck), hexafluorofosfat de octil-metil-imidazoliu OmimPF<sub>6</sub> (Merck), bis(trifluorometil-sulfonil)imida de butil-metil-imidazoliu BmimNTf<sub>2</sub> (Merck), acetat de etil-metil-imidazoliu EmimOOCCH<sub>3</sub> (Merck), trifluoracetat de etil-metil-imidazoliu EmimOOCF<sub>3</sub> (Merck), acetat de etil (Reactivul), metanol (Merck), diclorometan (Reactivul), acetonă (Chimopar București), acid sulfuric 95% (UCB, Belgia), hidroxid de sodiu (Merck), cloroform (Merck), ciclohexan (Merck), N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), 2,2-dimetoxipropan (Merck), acid p-toluensulfonic monohidrat 99% (Merck), carbonat de sodiu anhidru (reactivul București), reactiv Bradford (Sigma Aldrich).

### 3.2. Aparatură

Pentru efectuarea reacțiilor chimice studiate precum și pentru analizele cantitative, identificarea și caracterizarea compuşilor au fost utilizate următoarele echipamente de laborator:

1. incubator Memmert Modell 500 cu control de temperatură, prevăzut cu un rotator Stuart SB2 pentru reacțiile în paralel
2. incubator ILW 115 STD, Pol-Eko-Aparatura, Polonia, echipat cu agitator orbital MIR-S100, Sanyo, Japonia
3. cromatograf de gaze Trace GC Ultra (Thermo Scientific), echipat cu detector de ionizare în flacără, autosampler și coloană Restek Rxi-5ms, 30m x 0,25 mm x 0,25 µm.
4. spectrofotometru Safire (Tecan Benelux BVBA, Giessen, the Netherlands)
5. carusel cu 24 de poziții (GreenHouse Plus™ Parallel Synthesizer; Radleys Discovery Technologies), prevăzut cu control de temperatură, sistem de răcire și agitare magnetică
6. titrator Karl Fischer 720 KFS Titrino (Metrohm, Switzerland)
7. spectrometru de masă (MALDI TOF MS) Ultraflex Workstation (Bruker Daltonics, Bremen, Germania)
8. spectrometru de masă cuplat cu cromatograf de lichide Waters Alliance 2695 HPLC, echipat cu detector de UV (Waters 2996), detector MS (Waters ZQ-4000) și coloană Waters BEH C18 (cu fază inversă)
9. cromatograf de lichide Waters, echipat cu un detector UV cu șir de diode, autosampler și o coloană Atlantis T3 (Waters) cu fază inversă, cu dimensiunile 3 µm, 2,1 mm x 100 mm, termostată
10. cromatograf de lichide Jasco, echipat cu o pompă PU-2089 Plus cuaternară, o coloană cu fază inversă Synergy 4u Hydro – RP 80A, 250 x 4,6 mm (Phenomenex), cu un detector UV-2070 Plus și cu un dispozitiv de injectare automată
11. spectrometrul Jasco FT/IR-430
12. spectrometrul Bruker Avance III

### 3.3. Rețete de lucru

Determinarea activității catalitice a lipazelor native, a preparatelor imobilizate comercial și a celor imobilizate prin entrapare în sol-gel, precum și sintetizarea derivaților aromatici ai zaharurilor au fost realizate prin reacții de esterificare și transesterificare, în mediu de solvenți organici.

#### 3.3.1. Reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil

La o soluție de 0,05 mmoli 1-octanol, 0,15 mmoli laurat de vinil, 30 µL n-hexadecan ca standard intern și 1 mL n-hexan s-au adăugat 1 mg lipază nativă (*Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, pancreas de porc, germeni de grâu) sau imobilizată. Fiola conținând amestecul de reacție a fost introdusă în incinta termostată la 40°C a incubatorului Memmert Modell 500 și supusă agitării la 250 rotații/min. În paralel, în aceleași condiții s-a efectuat o reacție fără adaos de

enzimă (blanc) Toate reacțiile s-au efectuat în duplicat. La diferite intervale de timp s-au prelevat probe, enzima a fost îndepărtată prin centrifugare (10 minute, 14000 rpm) în cazul enzimelor solide sau inactivată prin fierbere (10 minute), în cazul celor lichide.

Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, s-au calculat prin metoda standardului intern la diferiți timpi de reacție cantitatea de ester obținută, randamentul în ester, activitatea specifică de transesterificare și activitatea totală de transesterificare. Calculele s-au efectuat pe baza curbei de etalonare a lauratului de butil (Figura 47, Anexe). Activitatea specifică a fost calculată pe baza conținutului de proteine, determinat cu metoda Bradford (conform capitolului 3.4.3). Relațiile matematice utilizate pentru calculul activității totale și specifice sunt:

$$\text{Activitate totală} = \frac{\mu\text{moli ester format}}{t \cdot m_1} \quad (\text{U/mg enzimă})$$

$$\text{Activitate specifică} = \frac{\mu\text{moli ester format}}{t \cdot m_2} \quad (\text{U/mg proteină})$$

unde:

t - timp (min)

m<sub>1</sub> - cantitatea de enzimă introdusă în reacție (mg)

m<sub>2</sub> - cantitatea de proteină introdusă în reacție (mg)

### 3.3.2. Reacția de acilare a 1-octanolului cu compuși aromatici

La o soluție de 0,05 mmoli 1-octanol, 0,15 mmoli compus aromatic (acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, esterul metilic al acidului 3-(4-hidroxifenil) propionic, acid ferulic, acid cafeic, acid p-cumaric, acid galic, acid vanilic, ferulat de etil, galat de propil, esterul etilic al acidului protocatecuic), 1 mg n-decosan ca standard intern și 1 mL *terț*-butanol s-au adăugat 10 mg lipază nativă (*Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, pancreas de porc, germeni de grâu) și respectiv 20 mg lipază imobilizată. Fiola conținând amestecul de reacție a fost introdusă în incinta termostată la 40°C a incubatorului Memmert Modell 500 și supusă agitării la 250 rotații/min. În paralel, în aceleași condiții s-a efectuat o reacție fără adaos de enzimă (blanc) și reacțiile s-au efectuat în duplicat. La diferite intervale de timp s-au prelevat probe, enzima a fost îndepărtată prin centrifugare (10 minute, 14000 rpm) în cazul enzimelor solide și respectiv prin fierbere (10 minute) în cazul celor lichide.

Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, s-au calculat prin metoda standardului intern, la diferiți timpi de reacție, cantitatea de ester obținută, randamentul în ester, activitatea specifică de transesterificare și activitatea totală de transesterificare. Calculele s-au efectuat pe baza curbei de etalonare a 3-(4-hidroxifenil) propionatului de metil (Figura 48, Anexe). Activitatea specifică a fost calculată pe baza conținutului de proteine, determinat cu metoda Bradford.

### 3.3.3. Reacția de acilare a zaharurilor cu laurat de vinil

Amestecul de reacție a fost compus din 10 mg zahar ( $\alpha$ -D-glucoză, zaharoză, lactoză, inulină și maltodextrine), laurat de vinil (3:1 raport molar față de zahar), lipază din *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica B* și *Thermomyces lanuginosus* (50 unități de activitate totală, calculate pe baza reacției dintre 1-octanol și laurat de vinil), 20 mg site moleculare (4Å, 4-8 mesh) și 1 mL amestec de 10% dimetilsulfoxid/*tert*-butanol. Reacțiile au fost efectuate în caruselul de reacții în paralel Radleys. Enzima solidă a fost îndepărtată prin centrifugare (10 minute, 14000 rpm) iar cea lichidă a fost inactivată prin fierbere timp de 10 minute. Zaharurile au fost în prealabil uscate timp de 24h în etuva de vid la 50°C iar solvenții au fost ținuți pe site moleculare. Conținutul de apă din zaharuri și din solvenți a fost determinat prin titrare Karl Fischer ca fiind sub 1%. În paralel, în aceleași condiții și fără adaos de enzimă s-a efectuat o reacție control (blanc). Reacțiile au fost efectuate în duplicat.

Pe baza spectrelor de masă MALDI TOF MS obținute la analiza probelor după 72h de reacție au fost calculate conversiile iar pe baza acestora s-a calculat activitatea specifică. Conversiile au fost calculate prin însumarea intensităților semnalelor cauzate de aducții cu sodiul ai substratului și produsului corespunzător, din același spectru de masă, setarea acestei valori la 100% și determinarea procentului corespunzător produsului de reacție care reprezintă conversia. O procedură similară a fost folosită la determinarea compoziției amestecului de reacție de la sinteza esterilor oligomerilor de fructoză cu acizi grași [81]. Pentru reacția cu glucoza, conversiile au fost determinate din analizele gaz-cromatografice, pe baza consumului lauratului de vinil.

### 3.3.4. Reacția de acilare a zaharurilor cu compuși aromatici

Amestecul de reacție a fost compus din diferite cantități (10, 20, 30, 50, 70 mg) de zahar ( $\alpha$ -D-glucoză, zaharoză, lactoză, inulină și maltodextrine), compus aromatic (acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic și esterul metilic al acestuia) în raport molar 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 față de zahar, lipază din *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica B* și *Thermomyces lanuginosus* (2, 5, 8, 10 unități de activitate calculate pe baza reacției dintre 1-octanol și compusul fenolic corespunzător), site moleculare (20 mg, 4Å, 4-8 mesh) și diferite medii de reacție: 10% *tert*-butanol/dimetilsulfoxid, 10%, 20%, 30% apă/alcool *tert*-amilic, alcool *tert*-amilic, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% DMSO/*tert*-butanol, tampon fosfat (pH = 7), 10% tampon fosfat/metil-*tert*-butil-eter, 10% tampon fosfat/2-butanonă, 10%, 20%, 30% apă/alcool *tert*-amilic, amestec soluție tampon/hexan/*tert*-butanol (1 mL). Reacțiile au fost efectuate în caruselul de reacții în paralel Radleys. Enzima solidă a fost îndepărtată prin centrifugare (10 minute, 14000 rpm) iar cea lichidă a fost inactivată prin fierbere timp de 10 minute. Zaharurile au fost în prealabil uscate timp de 24h în etuva de vid la 50°C iar solvenții au fost ținuți pe site moleculare. Conținutul de apă din zaharuri și din solvenți a fost determinat prin titrare Karl Fischer ca fiind sub 1%. În paralel, în aceleași condiții dar fără enzimă s-a efectuat o reacție control (blanc). Reacțiile au fost efectuate în duplicat.

Identificarea produșilor de reacție s-a făcut pe baza spectrelor de masă utilizând echipamentul UPLC – MS Waters Alliance 2695 HPLC. Pe baza analizelor cromatografice (cromatograful de lichide Waters) efectuate s-a calculat conversia compusului fenolic. Calculele s-au efectuat pe baza curbei de etalonare pentru acidul

3-(4-hidroxifenil) propionic (Figura 49, Anexe) și respectiv pentru esterul metilic al acestuia (Figura 50, Anexe).

### 3.3.5. Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel

Într-un flacon de sticlă de 4 mL s-au amestecat: 780  $\mu$ L soluție de lipază din *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens*, 200  $\mu$ L soluție PEG 20000 de concentrație 4% sau lichid ionic, 100  $\mu$ L soluție fluorură de sodiu 1M și 200  $\mu$ L alcool izopropilic. Sub agitare continuă s-au adăugat 6 mmoli amestec de silani precursori. Amestecul rezultat a fost supus agitării la temperatura camerei până la începerea gelifierii. Gelul format a fost păstrat timp de 24 de ore la temperatura camerei pentru o polimerizare completă. Apoi, gelul a fost spălat cu 5 mL alcool izopropilic, 5 mL apă distilată, 5 mL alcool izopropilic și 5 mL n-hexan și uscat timp de 48 de ore la temperatura camerei. Înainte de a fi depozitat la frigider materialul obținut a fost mojarat fin.

Din filtratul rezultat după spălarea gelului cu apă distilată a fost determinată cantitatea de proteină și pe baza acesteia s-a calculat randamentul de imobilizare pentru fiecare preparat. Metoda Bradford a fost utilizată pentru determinarea concentrației de proteine în apa de spălare iar ca standard s-a folosit soluție de albumină serică de bovină 2%. Cantitatea de proteină imobilizată a fost determinată indirect prin diferența dintre cantitatea totală de proteină supusă imobilizării și cantitatea de proteină regăsită în apa de spălare după imobilizare. Randamentele de imobilizare au fost calculate ca fiind raportul dintre cantitatea de proteină imobilizată și cantitatea de proteină supusă imobilizării. Randamentul de regăsire al activității enzimatică după imobilizare s-a calculat prin raportarea activității totale a enzimei imobilizate (egală cu produsul dintre activitatea de esterificare a enzimei și cantitatea de preparat obținut după imobilizare) la activitatea de esterificare a enzimei native (egală cu produsul dintre activitatea de esterificare a enzimei native și cantitatea de enzimă supusă imobilizării).

### 3.3.6. Reacția de transesterificare a alditolilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil

Amestecul de reacție a fost format din: 0,05 mmoli alditol (xilitol, arabitol, manitol și sorbitol), 0,15 mmoli ester metilic al acidului 3-(4-hidroxifenil) propionic, lipază nativă din *Candida antarctica* B și *Thermomyces lanuginosus*, imobilizată comercial (Novozyme 435 și Lipozyme TL IM) și respectiv prin entrapare în sol-gel (o unitate activitate totală, calculată pe baza reacției dintre 1-octanol și HPPME), 20 mg site moleculare și 1 mL amestec de 10% DMSO/*tert*-butanol. La 50°C alditolul a fost solubilizat în dimetilsulfoxid la care s-a adăugat esterul fenolic dizolvat în *tert*-butanol. Reacțiile au fost efectuate în incubatorul Memmert Modell 500. Au fost prelevate probe la diferite intervale de timp, enzima a fost îndepărtată prin centrifugare (10 minute la 14000 rpm) respectiv prin fierbere timp de 10 minute pentru inactivarea enzimei lichide. În aceleași condiții s-au efectuat reacții control dar fără adaos de enzimă și toate experimentele au fost realizate în duplicat.

Pe baza curbei de etalonare pentru compusul aromatic (Figura 51, Anexe), realizată prin analiză cromatografică (cromatograf de lichide Waters), s-a calculat conversia substratului aromatic.

### 3.3.7. Reacția de esterificare a alditolilor cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic

Diferite concentrații de alditol (xilitol, arabitol, manitol și sorbitol) cuprinse între 0,05 și 0,15 mmoli/mL, la diferite rapoarte molare alditol/acid aromatic (5 – 0,3), diferite cantități de site moleculare de 4 Å (0 – 0,1 g) și 1 mL amestec binar de *tert*-butanol și dimetilsulfoxid în diferite proporții (100:0, 95:5, 90:10 și 80:20% (v/v) au fost introduse într-un flacon de sticlă de 4 mL. Au fost adăugate apoi diferite cantități de Novozyme 435 (0,01 – 0,05 g). Reacțiile au fost efectuate într-un incubator (ILW 115 STD, Pol-Eko-Aparatura, Polonia) echipat cu un agitator orbital (MIR-S100, Sanyo, Japonia) la 250 rpm, la diferite temperaturi de reacție (40, 50, 60, 70°C). Au fost prelevate probe la diferite intervale de timp cuprinse între 30 minute și 72 ore de reacție.

Evoluția reacției de esterificare a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei de lichide (cromatograf Jasco). Probele prelevate pentru analiza cromatografică au fost diluate cu metanol. Toate experimentele și analizele cromatografice au fost realizate în duplicat. Conversiile au fost calculate pe baza curbei de etalonare a acidului aromatic (Figura 52, Anexe) iar randamentele de ester au fost calculate pe baza curbelor de calibrare ale esterilor puri, izolați și purificați (Figurile 53 – 60, Anexe). Identificarea produșilor de reacție a fost realizată prin metoda MALDI TOF MS, pe baza similarității dintre valorile  $m/z$  identificate în spectrele de masă și valorile calculate pentru mono-, di- și triesterii corespunzători.

Pentru studiile cinetice au fost utilizate diferite concentrații inițiale de alditol (10 – 150 mM) la raport molar alditol/acid aromatic 0,3, la o cantitate de Novozyme 435 constantă (1g/mol alditol), 1 mL *tert*-butanol, la 50°C. Valorile constantei Michaelis – Menten ( $K_M$ ) și vitezei maxime ( $V_M$ ) au fost calculate pe baza diagramelor Lineweaver-Burk și utilizate pentru calculul constantei cinetice  $k_{cat}$  și eficienței catalitice ( $k_{cat}/K_M$ ).

Pentru separarea esterilor aromatici ai alditolilor din amestecul de reacție, biocatalizatorul și sitele moleculare au fost separate prin filtrare, *tert*-butanolul a fost evaporat iar siropul rezultat a fost eluat pe coloană cromatografică cu silicagel. Pentru separarea diesterului s-a utilizat un sistem de eluenți format din acetat de etil:diclormetan = 1:1 continuând cu diclormetan:metanol = 8:1 pentru eluarea monoesterului. Mono- și diesterii purificați au fost obținuți sub forma unor solide albe și au fost utilizați ca standarde pentru analiza HPLC. Caracterizarea esterilor separați a fost realizată prin  $^{13}\text{C}$  și  $^1\text{H}$  NMR și spectroscopie FT-IR.

### 3.3.8. Reacția de acetalizare a glucozei

Într-un balon cu trei gâturi, se introduc 5 g D-glucoză care se agită puternic cu 100 mL acetonă într-o baie de gheață. Acidul sulfuric (96%, 4 mL) este adăugat în proporție de 0,5 mL la interval de 10 – 15 minute, în timp ce temperatura este menținută între 5 – 10°C. După adăugarea  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , amestecul este lăsat 5 ore la temperatura camerei, la agitare puternică, permițând creșterea temperaturii până la 20 – 25°C. Soluția este apoi răcită din nou într-o baie de gheață și se adaugă soluția apoasă de NaOH 50% (24,5 g NaOH în 30 mL apă) menținând agitarea puternică până ce se atinge un pH aproape neutru (pH  $\approx$  7). Adăugarea soluției de NaOH se face lent pentru a evita încălzirea (datorată reacției de neutralizare). După stabilirea pH-ului, o mică cantitate de  $\text{NaHCO}_3$  este adăugată pentru a menține soluția aproape de neutralitate. Se lasă peste noapte, iar a doua zi, sărurile sunt îndepărtate prin filtrare; soluția de acetonă este concentrată la presiune redusă,



obținându-se un sirop gros care, dacă este lăsat în repaus se solidifică. Siropul este dizolvat în cloroform, pe baie de apă. Soluția de cloroform conține derivatul de di-O-izopropilidenic iar soluția apoasă conține derivatul mono-O-izopropilidenic. Soluțiile sunt concentrate la presiune redusă până la obținerea unui sirop, care lăsat în repaus se solidifică. Derivatul mono-O-izopropilidenic este recristalizat din AcEt ( $\eta = 23\%$ ), iar cel di-O-izopropilidenic din ciclohexan ( $\eta = 56\%$ ).

Derivatul di-O-izopropilidenic a fost solubilizat în 10 mL apă și soluția a fost adusă la pH = 2 cu sol. HCl 1N după care a fost lăsată sub agitare magnetică la 40°C timp de 3h. S-a adus apoi la pH = 8 cu soluție NaOH 50%, soluția a fost filtrată la vid, evaporată la vid, cu formarea unui precipitat alb care reprezintă derivatul mono-O-izopropilidenic.

### 3.3.9. Reacția de acetalizare a zaharozei

Într-un vas Erlenmayer de 100 mL s-au introdus 1 g zaharoză și 39,5 mL dimetilformamidă uscată în prealabil pe site moleculare, care au fost supuse agitării magnetice până la obținerea unei soluții limpezi. Apoi s-au adăugat 4 mL 2,2-dimetoxipropan și 31,5 mg acid p-toluensulfonic. Amestecul de reacție a fost supus agitării magnetice la temperatura camerei timp de 4h. Reacția a fost oprită prin neutralizare cu carbonat de sodiu, filtrată la vid, evaporată la vid rezultând un sirop galben-marونی. Siropul a fost cromatografiat pe coloană cu silicagel. Eluția a fost realizată cu metanol:acetat de etil = 1:9. În urma separării s-a obținut un amestec format din derivatul mono-O-izopropilidenic și derivatul di-O-izopropilidenic, sub forma unui solid de culoare alb-gălbui (0,745 g,  $\eta = 64\%$ ). Derivatul di-izopropilidenic al zaharozei a fost purificat prin separare pe coloană cu silica gel cu acetat de etil:metanol = 19:1 și a fost obținut sub forma unui solid alb.

### 3.3.10. Reacția de acetalizare a lactozei

O suspensie de 3,42 g monohidrat de lactoză și 25 mg acid p-toluensulfonic în 25 mL 2,2-dimetoxipropan a fost încălzită la reflux timp de 24h. O soluție limpede a fost obținută și răcită la temperatura camerei. După neutralizare cu carbonat de sodiu, filtrare și evaporarea la vid a filtratului obținut a rezultat un sirop galben-marونی. Siropul a fost cromatografiat pe coloană cu silicagel. Eluția a fost realizată cu acetat de etil:hexan = 6:4. În urma separării s-au obținut doi compuși tri-izopropilidenici și anume 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza (3,45 g,  $\eta = 68\%$ ) și 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza (0,46 g,  $\eta = 9\%$ ), sub forma unor solide amorfe, de culoare albă.

### 3.3.11. Reacția de acetalizare a inulinei

Într-un vas Erlenmayer de 100 mL s-au introdus 0,425 g inulină (2,6 mmoli unități de fructoză anhidră) și 35 mL dimetilformamidă uscată în prealabil pe site moleculare, care au fost supuse agitării magnetice până la obținerea unei soluții limpezi. Apoi s-au adăugat 3,5 mL 2,2-dimetoxipropan și 32,5 mg acid p-toluensulfonic. Amestecul de reacție a fost supus agitării magnetice la 70°C timp de 48h. Reacția a fost oprită prin neutralizare cu carbonat de sodiu, urmată de filtrare și evaporare la vid rezultând un sirop galben-marونی. Siropul a fost cromatografiat pe coloană cu silicagel pentru separarea derivaților izopropilidenici de inulina nereacționată. Eluția a fost realizată cu acetat de etil:metanol = 4:1. În urma separării s-a obținut un amestec format din derivați mono-, di- și tri-izopropilidenici,

la diferite grade de polimerizare, sub forma unui sirop vâcos, de culoare galbenă (0,27 g,  $\eta = 52\%$ ).

### 3.3.12. Reacția de esterificare a alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic

0,05 mmoli alchilglucozidă respectiv acetal de zahar, 0,15 mmoli acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, 30 mg site moleculare (3 Å), 0,05 g Novozyme 435 și 1 mL *tert*-butanol au fost introduse într-un flacon de sticlă de 4 mL. Reacțiile au fost efectuate într-un incubator (ILW 115 STD, Pol-Eko-Aparatura, Polonia) echipat cu un agitator orbital (MIR-S100, Sanyo, Japonia) la 300 rpm, la 60°C. Au fost prelevate probe la diferite intervale de timp cuprinse între 24 și 72 ore de reacție.

Evoluția reacției de esterificare a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei de lichide (cromatograf Jasco). Toate experimentele și analizele cromatografice au fost realizate în duplicat. Conversiile au fost calculate pe baza curbei de etalonare a acidului aromatic (Figura 52, Anexe) iar randamentele de ester au fost calculate pe baza curbelor de calibrare ale esterilor puri, izolați și purificați (Figurile 61 – 63, Anexe). Identificarea produșilor de reacție a fost realizată prin metoda MALDI TOF MS, pe baza similarității dintre valorile  $m/z$  identificate în spectrele de masă și valorile calculate pentru esterii corespunzători. Esterii aromatici ai  $\alpha$ -metil-glucozei,  $\beta$ -octil-glucozei și monoacetonglucozei au fost purificați prin separare pe coloană cu silicagel cu acetat de etil și respectiv acetat de etil:hexan = 5:3 și au fost obținuți sub forma unor solide de culoare albă. Au fost apoi caracterizați prin spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.

## 3.4. Metode de analiză

### 3.4.1. Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze

Analiza cantitativă în cromatografie se bazează pe faptul că, în condițiile unui răspuns liniar al detectorului, aria picului este proporțională cu cantitatea componentei căreia îi corespunde picul, indiferent de forma picului. În această condiție răspunsul al detectorului diferă în funcție de structura compusului și de selectivitatea detectorului. Așadar pentru a realiza analiza cantitativă este necesar ca, după obținerea cromatogramei în care componentele să fie separate cu o rezoluție cât mai bună, să fie efectuate două operații:

- calcularea cât mai exactă a ariilor (manual sau prin integrare automată)
- calibrarea, adică stabilirea corespondenței dintre arie și concentrația componentei.

Determinarea concentrației componentelor unui amestec analizat se poate face prin următoarele metode:

- metoda normării ariilor
- metoda calibrării răspunsului detectorului
- metoda standardului intern
- metoda standardului extern.

În această lucrare, pentru analiza cantitativă s-a utilizat **metoda standardului intern** care constă în adăugarea unui compus standard în cantitate cunoscută la amestecul de analizat, iar determinarea cantitativă se face prin raportare la acest standard. Metoda are avantajul că nu este necesară cunoașterea

exactă a cantității de probă injectată și că mici modificări ale condițiilor de analiză care afectează aria picului nu vor duce la rezultate eronate, ele influențând în măsură egală picul componentei și al standardului.

Determinările cromatografice pentru probele din reacțiile de transesterificare au fost efectuate pe un cromatograf de gaze Trace GC Ultra (Thermo Scientific), echipat cu detector de ionizare în flacără, autosampler și coloană Restek Rxi-5ms, 30m x 0,25 mm x 0,25 μm.

Condiții de analiză pentru probe:

- temperatură injector: 275°C
- temperatură detector: 300°C
- gaz purtător: heliu cu debitul 1 mL/min
- program de temperatură: 100 (2 min) - 300°C (3 min) cu viteza de încălzire 10°C/min.

încălzire 10°C/min.

### Mod de lucru

În cinci fiole cromatografice s-au cântărit cu exactitate volume diferite de compus etalon, o cantitate fixă de standard intern și solvent. Cantitățile de compus etalon și standard au fost alese astfel încât concentrațiile lor și raportul acestora să se înscrie în domeniul reacției urmărite. Probele au fost analizate gaz-cromatografic, fiecare injectându-se de 2 ori pentru eliminarea erorilor de măsură, iar în calcul s-a luat media determinărilor ariilor respective. S-a reprezentat grafic raportului ariilor (compus etalon/standard) în funcție de raportul cantităților (compus etalon/standard). Această dependență este liniară, de forma  $Y = a + bX$ , iar în Tabelul 3.1 se pot observa parametrii dreptelor de etalonare pentru compuşii studiați.

Tabelul 3.1. Parametrii dreptelor de etalonare.

Compus etalon	Standard intern	Dreapta de etalonare
Laurat de butil	Hexadecan	$Y = 0,8111X$
3-(4-hidroxifenil) propionat de metil	n-decosan	$Y = 0,6681X$

Cu ajutorul acestor parametri se poate calcula cantitatea de ester care se găsește la un moment dat în amestecul de reacție:

$$m_{\text{ester}} = \left( \frac{A_{\text{ester}}}{A_{\text{st}}} - a \right) \cdot \frac{m_{\text{st}}}{b} \quad (\text{mg})$$

unde:

$A_{\text{ester}}$  - aria esterului

$A_{\text{st}}$  - aria standardului intern

$m_{\text{st}}$  - cantitatea de standard

### 3.4.2. Analiza cantitativă prin cromatografie de lichide

Determinările cromatografice au fost efectuate folosind două sisteme HPLC și anume:

- sistem HPLC de la Waters, echipat cu o coloană cu fază inversă Atlantis T3 3 μm, 2,1 mm x 100 mm (Waters) termostată la 30°C, cu un detector UV cu sir de diode și cu un dispozitiv de injectare automată. Detectia s-a realizat la 220

nm. Eluția s-a realizat cu amestec de acetonitril-apă folosind gradient de la 2% la 98% (17,5 min) urmată de eluție izocratică cu 98:2 acetonitril/apă (4,5 min), ambele acidulate cu 0,1% acid trifluoracetic, cu un debit de 0,5 mL/min.

- sistem HPLC de la Jasco, echipat cu o coloană cu fază inversă Synergy 4u Hydro – RP 80A, 250 x 4,6 mm (Phenomenex), cu un detector UV și cu un dispozitiv de injectare automată. Detecția s-a realizat la 276 nm. Eluția s-a realizat cu amestec de acetonitril-apă folosind gradient de la 2% la 98% (17,5 min) urmată de eluție izocratică cu 98:2 acetonitril/apă (4,5 min), cu un debit de 0,6 mL/min.

Analizele UPLC MS au fost realizate cu un sistem UPLC – MS Waters Alliance 2695 HPLC, echipat cu detector de UV (Waters 2996), detector MS (Waters ZQ-4000) și coloană Waters BEH C18 (cu fază inversă). Componenta MS a fost un sistem Thermo LTQ-XL Electro Spray Ionization Iontrap MS (ESI-MS). Măsurătorile au fost efectuate în mod ion negativ. Gazul purtător a fost heliu iar azotul a fost gaz auxiliar. Temperatura capilarei a fost setată la 250°C și potențialul de pulverizare la 4,7 kV. Calibrarea s-a realizat cu o probă de monoester al zaharozei cu HPPME. Analiza probelor s-a efectuat inițial pe întreg domeniul  $m/z = 300 - 2000$ , iar analiza MS2 a ionului cel mai intens s-a efectuat utilizând o energie de coliziune normalizată de 35. Pentru achiziția și procesarea datelor s-a folosit pachetul software Xcalibur (Thermo).

### Mod de lucru

S-a preparat o soluție stoc de 10 mM de compus etalon în solventul utilizat la reacție din care s-au luat părți corespunzătoare pentru prepararea soluțiilor de diferite concentrații.

Probele au fost analizate prin cromatografie de lichide, fiecare injectându-se de 2 ori pentru eliminarea erorilor de măsură, iar în calcul s-a luat media determinărilor ariilor respective. S-a reprezentat grafic aria în funcție de concentrația compusului etalon. Această dependență este liniară, de forma  $Y = a + bX$ , iar în Tabelul 3.2 se pot observa parametrii dreptelor de etalonare pentru compușii studiați.

Tabelul 3.2. Parametrii dreptelor de etalonare.

Compus etalon	$\lambda$ (nm)	Dreapta de etalonare
3-(4-hidroxifenil)-propionat de metil	220	$Y = 21907 X$
3-(4-hidroxifenil)-propionat de metil	276	$Y = 8405,2 X$
acidul 3-(4-hidroxifenil)-propionic	220	$Y = 22938 X$
acidul 3-(4-hidroxifenil)-propionic	276	$Y = 9423,9 X$
1-arabitol-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 7746,7 X$
1,5-arabitol di-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 14140 X$
1-xilitil-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 7211,6 X$
1,5-xilitil-di-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 14820 X$
1-manitol-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 7003,2 X$
1,6-manitol-di-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 16101 X$
1-sorbitil-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 6917,2 X$
1,6-sorbitil-di-3(4-hidroxifenil)-propionat	276	$Y = 16304 X$
6-O-3(4-hidroxifenil)-propionat de $\alpha$ -metil-glucoză	276	$Y = 7927,1 X$
6-O-3(4-hidroxifenil)-propionat de $\beta$ -octil-glucoză	276	$Y = 9136,5 X$
6-O-3(4-hidroxifenil)-propionat de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză	276	$Y = 8612,7 X$

### 3.4.3. Determinarea proteinelor prin metoda Bradford

#### Principiul metodei

Dozarea proteinelor în soluție (domeniu 0,1-1,4 mg/ml, folosind BSA ca standard) se bazează pe formarea unui complex în urma reacției proteinei din soluție cu reactivul de culoare Brilliant Blue G. Complexul proteină-Brilliant Blue G determină o absorbție maximă în domeniul 465-595 nm. Reactivul Bradford nu necesită diluție și poate fi folosit pentru determinarea proteinelor folosind microplăcuțe.

#### Etalonarea soluției de BSA prin metoda Bradford

##### Mod de lucru

S-au realizat soluții de albumină serică bovină (BSA) de diferite concentrații în apă deionizată (0,15-1,2 mg/ml). S-au luat câte 5  $\mu$ l din aceste soluții și s-au introdus în microplăcuțe adăugându-se 250  $\mu$ l reactiv Bradford. Probele obținute s-au lăsat la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi s-a citit extincția la 595 nm față de un martor obținut în aceleași condiții dar cu înlocuirea soluției de BSA cu apă deionizată. Pentru siguranța determinării probele au fost realizate în duplicat. Rezultatele sunt redate în Tabelul 3.3.

Tabelul 3.3. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Bradford.

Nr. crt.	Sol. BSA ( $\mu$ l)	Apă distilată ( $\mu$ l)	Extincție	Concentrație proteină (mg/mL)
1(martor)	-	20	-	0,0
2.	2	18	0,0561	0,2
3.	4	16	0,1024	0,4
4.	8	12	0,2765	0,8
5.	12	8	0,3982	1,2
6.	16	4	0,5085	1,6

S-a realizat reprezentarea grafică a extincției în funcție de concentrația de proteină. Această reprezentare este de forma unei drepte cu ecuația:

$$E = b \cdot C_p$$

unde,

E – extincția

b – panta dreptei

$C_p$  – concentrația de proteină (mg/ml)

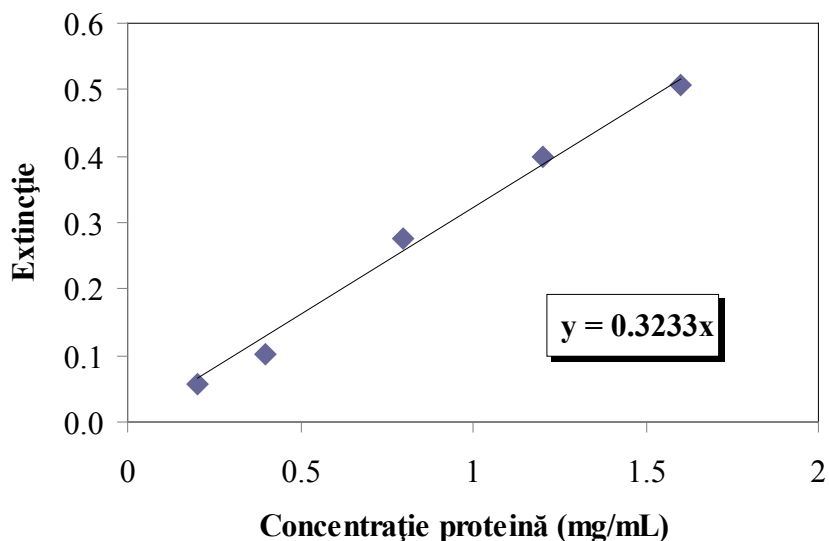


Figura 3.1. Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Bradford.

### Determinarea conținutului de proteine într-o probă necunoscută

#### Mod de lucru

Într-un tub Eppendorf s-au introdus 1 mL soluție probă. Peste 5  $\mu$ l din această soluție s-au adăugat 250  $\mu$ l reactiv Bradford. S-a lăsat la temperatura camerei 10 minute, apoi s-a citit extincția la 595 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea soluției de probă cu apă distilată. Pentru siguranța determinării s-au efectuat trei probe în paralel. Rezultatele sunt redată în Tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. Concentrația de proteine din diferite lipaze native.

Lipaza nativă	$E_p - E_m$	Concentrație proteină (mg/mL)
<i>Candida antarctica</i> B	0,0446	6,9
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0,1317	20,4
Lipozyme TL 100L	0,1284	20,0
<i>Aspergillus niger</i>	0,0432	0,134
<i>Candida rugosa</i>	0,0228	0,071
Lipaza din germeni de grâu	0,1338	0,414
Lipaza din pancreas de porc	0,0589	0,182
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0,0203	0,063
<i>Rhizopus oryzae</i>	0,0228	0,071
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,0823	0,255

Determinările s-au efectuat cu ajutorul unui spectrofotometru Safire (Tecan Benelux BVBA, Giessen, the Netherlands). Concentrația de proteină din probă s-a determinat cu formula:

$$C_p = \frac{1}{b} \cdot (E_p - E_m) \cdot d \text{ (mg/ml)}$$

unde:

$C_p$  - concentrația de proteină, (mg /ml)

$b$  - panta dreptei

$E_p$  - extincție probă

$E_m$  - extincție martor

$d$  - diluția

În cazul preparatelor imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel, cantitatea totală de proteine din apele de spălare s-a obținut prin produsul dintre concentrația de proteină și volumul de filtrat obținut. Cantitatea de proteină imobilizată s-a calculat prin diferența dintre cantitatea de proteină supusă imobilizării și cantitatea totală de proteine regăsită în apele de spălare. Randamentul de imobilizare s-a calculat prin raportarea cantității de proteină imobilizată la cea inițială.

$$\eta_{\text{imobilizare}} = (\text{cantitate proteină imobilizată} / \text{cantitate totală proteine}) \times 100$$

*Tabelul 3.5.* Concentrația de proteine din lipaza din *Termomyces lanuginosus* imobilizată prin metoda de entrapare în sol-gel.

Silani precursori	Extincție	$\eta_{\text{imob}}$ (%)	Conținut proteine (mg/mg preparat)
PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1,6:0,4:1)	0,1590	67	0,025
OctTMOS:TMOS (1:1)	0,0454	91	0,036
OctTMOS:TMOS (2:1)	0,0614	87	0,054
OctTMOS:TMOS (1:1) fără aditiv	0,0345	93	0,037
MeTMOS:TMOS (1:1)	0,0079	98	0,033
PrTMOS:TMOS (1:1)	0,0547	89	0,035
PhTMOS:TMOS (1:1)	0,0622	87	0,028
VTMOS:TMOS (1:1)	0,0477	91	0,03
DMeDMOS:TMOS (1:1)	0,0946	81	0,04
PhMeTMOS:TMOS (1:1)	0,0417	91	0,04
(3-NH <sub>2</sub> Pr)TMOS:TMOS (1:1)	0,0191	96	0,032
iBuTMOS:TMOS (1:1)	0,0227	96	0,04

Determinările s-au efectuat cu ajutorul unui spectrofotometru Safire (Tecan Benelux BVBA, Giessen, Olanda).

#### **3.4.4. Cromatografia în strat subțire**

Reacțiile de obținere a derivaților aromatici ai zaharurilor au fost monitorizate în timp folosind și tehnica de cromatografie în strat subțire, utilizând plăcuțe de silicagel depus pe alumină (Merck, DC-Autofolien Kiesegel 60 F<sub>254</sub>) cu dimensiuni 20x20 cm și 0,2mm grosime. Eluenții au fost selectați în funcție de polaritatea substraturilor și a produșilor de reacție. Solvenții utilizați au fost: acetat de etil, hexan, metanol și diclormetan. Probele au fost plasate la baza plăcuței sub formă de spoturi cu ajutorul unei capilare, apoi plăcuțele au fost introduse în camera de eluare în care se găsește eluentul. Vizualizarea spoturilor s-a realizat prin imersarea plăcuței într-o soluție etanolică de acid fosfomolibdic de concentrație 5%, urmată de încălzire.

#### **3.4.5. Cromatografia pe coloană cu silica gel**

Pentru separarea compușilor s-a utilizat o coloană de sticlă umplută cu silica gel (silica gel 60, 40-63 μm, Sigma-Aldrich). S-a folosit tehnica umedă de umplere a coloanelor iar amestecul de separat a fost dizolvat într-o cantitate minimă de eluent și introdus la partea superioară a coloanei. S-a folosit eluție izocratică sau cu gradient, după caz (capitolul III.3). Frațiunile rezultate în urma separării au fost colectate în eprubete, analizate prin cromatografie în strat subțire, iar produsul dorit a fost obținut după evaporarea în vid a solventului. Puritatea esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri a fost determinată prin analiza HPLC.

#### **3.4.6. Analiza FTIR (spectrofotometrie de infraroșu cu transformată Fourier)**

Spectrele FTIR au fost înregistrate folosind spectrofotometrul Jasco FT/IR-430. Analizele IR au fost efectuate utilizând metoda reflexiei difuze (ATR – attenuated total reflectance) și metoda de transmisie în pastilă de KBr.

#### **3.4.7. Spectrometria de masă**

Protocolul de pregătire a probelor este după cum urmează: după îndepărtarea enzimei, 1μl din amestecul de reacție s-a amestecat cu 9 μl soluție matrice (10 mg acid 2,5-dihidroxi benzoic în acetonitril: apă în proporție 500 μl:500 μl). 2μl din acest amestec au fost transferați pe plăcuța de analiză și uscat sub jet de aer cald. Măsurătorile au fost efectuate cu Ultraflex Workstation (Bruker Daltonics, Bremen, Germania), în modul pozitiv și echipat cu un laser de 337nm. Ionii au fost accelerați la o tensiune de 25 kV după un timp de 200 ns. Detecția a fost realizată în modul reflector. Pentru a obține un spectru de bună calitate a fost aplicată o intensitate minimă. Calibrarea s-a făcut cu un amestec de maltodextrine (Avebe, Veendam, Olanda) cu mase moleculare cunoscute. Pentru achiziția și procesarea datelor s-au folosit pachetele software FlexControl și FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Germania).



**3.4.8. Analiza RMN (spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară)**

Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN și  $^{13}\text{C}$ -RMN au fost înregistrate folosind spectrometrul Bruker Avance III, la o frecvență de 400,17 MHz pentru  $^1\text{H}$ -RMN și 100,62 MHz pentru  $^{13}\text{C}$ -RMN. Compușii de analizat au fost dizolvați în solvent deuterat (DMSO- $d_6$  99,9 atom % D, Aldrich,  $\text{CDCl}_3$ , acetonă- $d_6$ ). Pentru spectrele  $^1\text{H}$ -RMN semnalul pentru picul solventului a fost setat la 2,5000 ppm și pentru  $^{13}\text{C}$ -RMN semnalul picului solventului a fost setat la 39,5000 ppm.

## 4. CONCLUZII FINALE

Din studiile experimentale, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, au rezultat următoarele concluzii:

*Determinarea specificității lipazelor native și immobilizate prin entrapare în sol – gel față de substraturi alifatic și aromatice*

1. Dintre zece lipaze native testate, cele provenind din *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* și lipaza din pancreas de porc au demonstrat activitate catalitică în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil, în timp ce în reacția de acilare a 1-octanolului cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil, doar lipazele din *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens* au fost active catalitic.
2. Dintre substraturile fenolice testate, doar 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil și acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic au dus la formarea produșilor de reacție în condițiile studiate.
3. Specificitatea lipazelor testate a fost aceeași atât pentru esterul alifatic cât și pentru esterul cu componentă aromatică, dar valorile activităților specifice au fost mult mai mari în reacția cu esterul alifatic decât în reacția cu esterul cu componentă aromatică, ceea ce atestă că acizii cu componentă aromatică sunt substraturi mai dificile în comparație cu acizii alifatici.
4. Lipaza din *Thermomyces lanuginosus* a demonstrat specificitate pentru diferite zaharuri studiate și activitatea catalitică cea mai mare pentru reacția cu esterul cu componentă aromatică ca donor acil. Lipaza din *Candida antarctica* B pare a fi foarte activă față de alditoli ca și substraturi, ceea ce reprezintă o posibilitate nouă în vederea obținerii unor esteri aromatici ai alditolilor.
5. S-a realizat immobilizarea eficientă a mai multor lipaze microbiene prin metoda de entrapare în sol-gel, folosind amestecuri binare și ternare de silani precursori, în diferite rapoarte molare.
6. Preparatele immobilizate cu lichide ionice ca aditivi au dovedit activitate de esterificare ridicată și randamente de regăsire a activității totale după immobilizare mai mari de 100%, în majoritatea cazurilor, creșterea lungimii catenei hidrocarbonate din lanțul alchil legat de gruparea imidazolică având efect favorabil asupra activității.
7. Pentru reacția de acilare a 1-octanolului cu laurat de vinil s-a observat influența favorabilă a unei matrici mai hidrofobe, conținând grupări octil nehidrolizabile, provenite din precursorul silanic.
8. Acilarea 1-octanolului cu un ester cu componentă aromatică (HPPME) are loc mult mai greu decât reacția similară cu esterul alifatic, dar preparatul cel mai activ a fost și în acest caz cel obținut pe bază de octiltrimetoxisilan. Natura enzimei care se supune immobilizării este foarte importantă, lipaza din *Candida antarctica* B immobilizându-se cu eficiență mult mai mare decât cea din *Thermomyces lanuginosus*.

*Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alditolilor*

1. În reacția de transesterificare a alditolilor cu HPPME lipaza din *Candida antarctica* B a demonstrat cea mai mare eficiență catalitică, în special preparatul comercial Novozyme 435.
2. Preparatele imobilizate prin entrapare în sol – gel s-au dovedit a fi biocatalizatori mai eficienți catalitic decât enzima nativă, demonstrând eficiența ridicată a metodei de entrapare în matrici hibride organice/anorganice.
3. Pentru lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată prin metoda sol-gel, prezența grupării izobutil nehidrolizabilă în matricea de silice a fost cea mai favorabilă, obținându-se o activitate apropiată de cea a preparatului comercial Novozyme 435.
4. Mono- și diesterii aromatici ai xilitolului, arabitolului, sorbitolului și manitolului au fost sintetizați utilizând Novozyme 435 în mediu de solvent organic, cu conversii ridicate.
5. S-a realizat optimizarea parametrilor care influențează reacția: temperatura, timpul de reacție, raportul enzimă/substrat, raportul molar alditol/HPPA, cantitatea de site moleculare, obținându-se conversii aproape totale în condițiile de reacție cele mai favorabile.
6. Studiile cinetice efectuate au arătat că în primele ore, viteza de reacție pentru formarea monoesterului este mai mare decât viteza de reacție pentru producerea diesterului, iar după acest interval de timp concentrația diesterului crește liniar în timp iar concentrația monoesterului rămâne aproximativ constantă.
7. Parametri cinetici ai reacției de acilare arată că enzima prezintă afinitatea cea mai mare pentru arabitol, urmată de xilitol, sorbitol iar afinitatea cea mai mică față de manitol.
8. Analizele de masă au demonstrat formarea mono-, di- și chiar triesterilor la un timp prelungit de reacție pentru toți alditolii studiați, iar spectrele RMN au arătat că substituția a avut loc numai la grupările hidroxil primare ale alditolilor.
9. Controlul parametrilor reacției permite producerea de monoestere sau diestere ca produși principali.

*Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri*

1. Prezența grupărilor alchil și respectiv izopropilidenice în structura zaharurilor a dus la creșterea solubilității lor în mediul de reacție și astfel la creșterea reactivității lor, comparativ cu zaharurile neprotejate.
2. Monoesterii aromatici ai  $\alpha$ -metil-glucozei și  $\beta$ -octil-glucozei au fost sintetizați enzimatic în mediu de solvent organic, cu randamente ridicate.
3. Derivatizarea zaharurilor cu grupări izopropilidenice a avut loc cu randamente de peste 50%, iar grupările hidroxil primare (din poziția 6 în cazul glucozei și din poziția 6' în cazul lactozei și zaharozei) au rămas neprotejate, în vederea esterificării enzimaticice.
4. Prin spectroscopie RMN s-a demonstrat că acilarea cu acidul cu componentă aromatică a avut loc numai la grupările hidroxil primare.

5. Monoesterul aromatic al monoacetonglucozei a fost obținut enzimatic cu randament de peste 90%, după 5 zile de reacție.
6. În cazul zaharozei, spectrele de masă au arătat formarea monoesterilor aromatici ai derivaților mono- și di-izopropilidenati.
7. Spectrometria de masă a arătat formarea derivaților mono- și di-izopropilidenici ai inulinei la grade de polimerizare cuprinse între 2 și 6, precum și a derivaților tri-izopropilidenici la grade de polimerizare între 3 și 5. Prin esterificare cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic s-au format esterii aromatici ai mono- și diacetalilor de inulină, la grad de polimerizare 2 și esterul aromatic al monoacetalului, la grad de polimerizare 3.
8. Confirmarea structurii esterilor aromatici sintetizați, prin spectrometrie de masă, spectroscopie de FT – IR și spectroscopie RMN, demonstrează valabilitatea metodei chemo-enzimatice elaborate pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor.

## BIBLIOGRAFIE

- [1]. Rosatella A. A., Branco L. C., Afonso C. A. M., *Green Chemistry*, 2009, 11, 1406 – 1413
- [2]. Zarcuła C., Corici L., Croitoru R., Ursoiu A., Peter F., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 65, 79 – 86
- [3]. Zarcuła C., Kiss C., Corici L., Croitoru R., Csunderlik C., Peter F., *Revista de Chimie*, 2009, 60 (9), 922 – 927
- [4]. Anderson E. M., Larsson K. M., Kirk O., *Biocatalysis and Biotransformations*, 1998, 16, 181 – 204
- [5]. Ljunger G., Adlercreutz P., Mattiasson B., *Biotechnology Letters*, 1994, 16 (11), 1167 – 1172
- [6]. Arcos J. A., Bernabé M., Otero C., *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 57 (5), 505 – 509
- [7]. Chang S. W., Shaw J. F., *New Biotechnology*, 2009, 26 (3/4), 109 – 116
- [8]. Voutsas E. C., Tsavas P., Magoulas K., Tassios D., *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2002, 47, 1517 – 1520
- [9]. Plou F. J., Cruces M. A., Ferrer M., Fuentes G., Pastor E., Bernabé M., Christensen M., Comelles F., Parra J. L., Ballesteros A., *Journal of Biotechnology*, 2002, 96, 55 – 66
- [10]. Lichtenthaler F. W., Peters S., *Comptes Rendus Chimie*, **2004**, 7, 65 – 90
- [11]. Nenițescu C. D., *Chimie Organică*, **1974**, 2, ediția a VII-a, Editura Didactică și Pedagogică
- [12]. Lichtenthaler F. W., Mondel S., *Pure and Applied Chemistry*, **1997**, 69 (9), 853 – 1866
- [13]. Ganske F., Bornscheuer U. T., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2005**, 36, 40 – 42
- [14]. Kitagawa M., Fan H., Raku T., Shibatani S., Maekawa Y., Hiraguri Y., Kurane R., Tokiwa Y., *Biotechnology Letters*, **1999**, 21, 355 – 359
- [15]. Tsuzuki W., Kitamura Y., Suzuki T., Kobayashi S., *Biotechnology and Bioengineering*, **1999**, 64 (3), 267 – 271
- [16]. Kobayashi T., Ehara T., Mizuoka T., Adachi S., *Biotechnology Letters*, **2010**, 32, 1679 – 1684
- [17]. Degn P., Larsen K. L., Duus J. O., Petersen B. O., Zimmermann W., *Carbohydrate Research*, **2000**, 329, 57 – 63
- [18]. Mathlouthi M., Reiser P., *Sucrose: Properties and Applications*, **1995**, Blackie Academic & Professional
- [19]. Brochette-Lemoine S., Trombotto S., Joannard D., Descotes G., Bouchu A., Queneau Y., *Ultrasonics Sonochemistry*, **2000**, 7, 157 – 161
- [20]. Petrova K., Barros M. T., Correia-Da-Silva P., *Microwave Heating*, 2011, InTech
- [21]. Kennedy J. F., Kumar H., Panesar P. S., Marwaha S. S., Goyal R., Parmar A., Kaur S., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2006**, 81, 866 – 876
- [22]. Forsyth S. A., MacFarlane D. R., Thomson R. J., Von Itzstein M., *Chemistry Communications*, **2002**, 714 – 715

- [23]. Jarosz S., Mach M., *European Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 769 – 780
- [24]. Pedersen N. R., Wimmer R., Matthiesen R., Pedersen L. H., Gessesse A., *Tetrahedron Asymmetry*, **2003**, 14, 667 – 673
- [25]. Van Oosterom M. W., Van Rantwijk F., Sheldon R. A., *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**, 49, 328 – 333
- [26]. Potier P., Bouchu A., Descotes G., Queneau Y., *Synthesis*, **2001**, 458 – 462
- [27]. Molinier V., Kouwer P. J. J., Fitremann J., Bouchu A., Mackenzie G., Queneau Y., Goodby J. W., *Chemical European Journal*, **2006**, 12, 3547 – 3557
- [28]. Potier P., Maccario V., Giudicelli M. B., Queneau Y., Dangles O., *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40 (17), 3387 – 3390
- [29]. Barros M. T., Maycock C. D., Sinerez F., Thomassigny C., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 6511 – 6516
- [30]. Kashiwada Y., Nonaka G. I., Nishioka I., *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1469 – 1472
- [31]. Ong G. T., Chang K. Y., Wu S. H., Wang K. T., *Carbohydrate Research*, **1993**, 241, 327 – 333
- [32]. Chang K. Y., Wu S. H., Wang K. T., *Carbohydrate Research*, **1991**, 222, 251 – 261
- [33]. Barros M. T., Maycock C. D., Thomassigny C., *Carbohydrate Research*, **2000**, 328, 419 – 423
- [34]. Fanton E., Fayet C., Gelas J., Jhurry D., Deffieux A., Fontanille M., *Carbohydrate Research*, **1992**, 226, 337 – 343
- [35]. Sarney D. B., Barnard M. J., MacManus D. A., Vulfson E. N., *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **1996**, 73 (11), 1481 – 1487
- [36]. Park H. G., Chang H. N., *Biotechnology Letters*, **2000**, 22, 39 – 42
- [37]. Patil D. R., Rethwisch D. G., Dordick J. S., *Biotechnology and Bioengineering*, **1991**, 37, 639 – 646
- [38]. Puterka G. J., Farone W., Palmer T., Barrington A., *Journal of Economic Entomology*, **2003**, 96 (3), 636 – 644
- [39]. Chortyk O. T., Pomonis J. G., Johnson A. W., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **1996**, 44, 1551 – 1557
- [40]. Queneau Y., Fitremann J., Trombotto S., *Comptes Rendus Chimie*, **2004**, 7, 177 – 188
- [41]. Giry-Panaud N., Descotes G., Bouchu A., Queneau Y., *European Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 3393 – 3398
- [42]. Khan R., Mufti K. S., Jenner M. R., *Carbohydrate Research*, **1978**, 65, 109 – 113
- [43]. McSweeney P. L. H., Fox P. F., *Advanced Dairy Chemistry*, **2009**, 3, ediția a II-a, Springer
- [44]. Walsh M. K., Bombyk R. A., Wagh A., Bingham A., Berreau L. M., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 60, 171 – 177
- [45]. Gosling A., Stevens G. W., Barber A. R., Kentish S. E., Gras S. L., *Food Chemistry*, **2010**, 121, 307 – 318
- [46]. Drummond C. J., Wells D., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1998**, 141 (1), 131 – 142
- [47]. Yoshino T., Reuter G., Kelm S., Schauer R., *Glycoconjugate Journal*, **1986**, 3, 7 – 14
- [48]. Hough L., Richardson A., Thelwall L.A.W., *Carbohydrate Research*, **1979**, 75, C11 – C12

- [49]. Thelwall L. A. W., *Journal of Dairy Research*, **1982**, 49, 713 – 724
- [50]. Baer H.H., Abbas S.A., *Carbohydrate Research*, **1979**, 77, 117 – 129
- [51]. Baer H.H., Abbas S.A., *Carbohydrate Research*, **1980**, 84, 53 – 60
- [52]. Abbas H. K., Tanaka T., Duke S. O., Porter J. K., Wray E. M., Hodges L., Session A., Wang E., Merrill A. H. Jr., Riley R. T., *Plant Physiology*, **1994**, 106, 1085 – 1093
- [53]. Kawakami A., Yoshida M., *Planta*, **2005**, 223, 90 – 104
- [54]. Stevens C. V., Meriggi A., Peristerpoulou M., Christov P. P., Booten K., Levecke B., Vandamme A., Pitteviels N., Tadros T. F., *Biomacromolecules*, **2001**, 2 (4), 1256 – 1259
- [55]. Ter Haar R., Schols H. A., Van den Broek L. A. M., Saglam D., Frissen A. E., Boeriu C. G., Gruppena H., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 62, 183 – 189
- [56]. Morros J., Levecke B., Infante M. R., *Carbohydrate Polymers*, **2010**, 82, 1168 – 1173
- [57]. Sagis L. M. C., Boeriu C. G., Frissen G. E., Schols H. A., Wierenga P. A., *Langmuir*, **2008**, 24, 359 – 361
- [58]. Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., McClements D. J., *Food Research International*, **2004**, 37, 851 – 859
- [59]. Biswas A., Shogren R. L., Willett J. L., *Industrial Crops and Products*, **2009**, 30, 172 – 175
- [60]. Bai Y., Shi Y. C., *Carbohydrate Polymers*, **2011**, 83 (2), 520 – 527
- [61]. Lehmann A., Volkert B., *Carbohydrate Polymers*, **2011**, 83, 1529 – 1533
- [62]. Morris G. A., Sims I. M., Robertson A. J., Furneaux R. H., *Food Hydrocolloids*, **2004**, 18, 1007 – 1014
- [63]. Akhtar M., Dickinson E., *Food Hydrocolloids*, **2007**, 21 (4), 607 – 616
- [64]. Otto R. T., Bornscheuer U. T., Syldatk C., Schmid R. D., *Biotechnology Letters*, **1998**, 20 (4), 437 – 440
- [65]. Mutua L. N., Akoh C. C., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1993**, 70 (1), 43 – 46
- [66]. Chopineau J., McCafferty F. D., Therisod M., Klibanov A. M., *Biotechnology and Bioengineering*, **1988**, 31 (3), 208 – 214
- [67]. Ullmann F., Bohnet M., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, **2005**, 1 – 39, ediția a 6-a
- [68]. McFetridge J., Rades T., Lim M., *Food Research International*, **2004**, 37, 409 – 415
- [69]. Piao J., Kishi S., Adachi S., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2006**, 277, 15 – 19
- [70]. Piao J., Adachi S., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **2006**, 7, 211 – 216
- [71]. Adnani A., Basri M., Chaibakhsh N., Basyarudin M., Rahman A., Salleh A. B., *Industrial Crops and Products*, **2010**, 31, 350 – 356
- [72]. Cramer J. F., Dueholm M. S., Nielsen S. B., Pedersen D. S., Wimmer R., Pedersen L. H., *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, 41, 346 – 352
- [73]. Goueth P., Ramiz A., Ronco G., Mackenzie G., Villa P., *Carbohydrate Research*, **1995**, 266, 171 – 189
- [74]. Adnani A., Basri M., Chaibakhsh N., Ahangar H. A., Salleh A. B., Noor R., Raja Z., Rahman A., Basyaruddin M., Rahman A., *Carbohydrate Research*, **2011**, 346, 472 – 479
- [75]. Rufino A. R., Biaggio F. C., Santos J. C., de Castro H. F., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 47, 5 – 9

- [76]. Iwamoto N., Shima M., Adachi S., *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 38, 16 – 21
- [77]. Mukesh D., Sheth D., Mokashi A., Wagh J., Tilak J. M., Banerji A. A., Thakkar K. R., *Biotechnology Letters*, **1993**, 15 (12), 1243 – 1246
- [78]. Yoo S. I., Park S. J., Yoon H. H., *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **2007**, 13 (1), 1 – 6
- [79]. Ducret A., Giroux A., Trani M., Lortie R., *Biotechnology and Bioengineering*, **1995**, 48, 214 – 221
- [80]. Ducret A., Giroux A., Trani M., Lortie R., *Journal of American Oil Chemist's Society*, **1996**, 73 (1), 109 – 113
- [81]. Kim H. J., Youn S. H., Shin C. S., *Journal of Biotechnology*, **2006**, 123, 174 – 184
- [82]. Janssen A. E. M., Lefferts A. G., van't Riet K., *Biotechnology Letters*, **1990**, 12 (10), 711 – 716
- [83]. Oda K., Sato Y., Katayama S., Ito A., Ohgitani T., *Vaccine*, **2004**, 22, 2812 – 2821
- [84]. Pinna M. C., Salis A., Monduzzi M., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 27 (4 – 6), 233 – 236
- [85]. Salis A., Pinna M. C., Murgia S., Monduzzi M., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 27, 139 – 146
- [86]. Al Majid A. M., *Journal of Saudi Chemical Society*, **2010**, 3 (14), 257 – 260
- [87]. Van Velthuijsen J. A., *J. Agric. Food Chem.*, **1979**, 27 (4), 680 – 686
- [88]. Scholnick F., Ben-Et G., Sucharski M. K., Maurer E. W., Linfield W. M., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1977**, 52 (7), 256 – 258
- [89]. Scholnick F., Linfield W. M., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1977**, 54 (10), 430 – 432
- [90]. Hill Jr. C. G., Hedinsdottir R., Amundson C. H., *Journal of Food Processing and Preservation*, **1987**, 11 (2), 111 – 134
- [91]. Toufeili I., Dziedzic S., *Food Chemistry*, **1993**, 47 (1), 17 – 22
- [92]. Hao Z., Zhen-Hu W., Dong-Mei P., Yi-Fan W., Bing-Fang H., *Food Science*, **2010**, 31 (18), 153 – 156
- [93]. Miura Y., Ikeda T., Kobayashi K., *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 410 – 415
- [94]. Hill K., von Rybinski W., Stoll G., *Alkyl Polyglycosides. Technology, Properties and Applications*, **1997**, VCH
- [95]. Pierre R., Adam I., Fitremann J., Jérôme F., Bouchu A., Courtois G., Barrault J., Queneau Y., *Comptes Rendus Chimie*, **2004**, 7, 151 – 160
- [96]. Villandier N., Adama I., Jerome F., Barrault J., Pierre R., Bouchu A., Fitremann J., Queneau Y., *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2006**, 259, 67 – 77
- [97]. Andresen O., Kirk O., *Progress in Biotechnology*, **1995**, 10, 343 – 349
- [98]. van Rantwijk F., Woudenberg-van Oosterom M., Sheldon R. A., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 511 – 532
- [99]. Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B., *Nature*, **2001**, 409, 258 – 268
- [100]. Sarney D. S., Vulfson E. N., *Trends in Biotechnology*, **1995**, 13, 164 – 172
- [101]. Klibanov A. M., *Nature*, **2001**, 409, 241 – 246
- [102]. Ross A. C., Bell G., Halling P. J., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 8, 183 – 192
- [103]. Persson M., Mladenoska I., Wehtje E., Adlercreutz P., *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 31, 833 – 841



- [104]. Tufvesson P., Annerling A., Hatti-Kaul R., Adlercreutz D., *Biotechnology and Bioengineering*, **2007**, 97, 447 – 453
- [105]. Madigan M. T., Marrs B. L., *Extremophiles. Scientific American*, **1997**, 276, 82 – 87
- [106]. Reetz M. T., Jaeger K. E., *Topics in Current Chemistry*, **1999**, 200, 31 – 57
- [107]. Schmid R. D., Verger R., *Angewandte Chemie International Edition*, **1998**, 37, 1608 – 1633
- [108]. Adachi S., Kobayashi T., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2005**, 99 (2), 87 – 94
- [109]. Ward O. P., Fang J. W., Li Z. Y., *Enzyme Microbial Technology*, **1997**, 20, 52 – 56
- [110]. Fregapane G., Sarney D. B., Vulfson E. N., *Enzyme Microbial Technology*, **1991**, 13, 796 – 800
- [111]. Ferrer M., Cruces M. A., Plou F. J., Bernabe M., Ballesteros A., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 4053 – 4061
- [112]. Bjorkling F., Godtfredsen S. E., Kirk O., *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1989**, 14, 934 – 935
- [113]. Bousquet M. P., Willemot R. M., Monsan P., Boures E., *Biotechnology and Bioengineering*, **1999**, 63, 730 – 736
- [114]. Olivier-Bourbigou H., Magna L., Morvan D., *Applied Catalysis A: General*, **2010**, 373, 1 – 56
- [115]. Danieli B., Luisetti M., Sampognaro G., Carrea G., Riva S., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1997**, 3, 193 – 201
- [116]. Otto R. T., Bornscheuer U. T., Syl датk C., Schmid R. D., *Journal of Biotechnology*, **1998**, 64, 231 – 237
- [117]. Li Z. Y., Ward O. P., *Chinese Chemical Letters*, **1996**, 7, 611 – 614
- [118]. Degn P., Zimmermann W., *Biotechnology and Bioengineering*, **2001**, 74 (6), 483 – 491
- [119]. Ferrer M., Cruces M. A., Plou F. J., Pastor E., Fuentes G., Bernabe M., Parra J. L., Ballesteros A., *Studies in Surface Science and Catalysis*, **2000**, 130, 509 – 514
- [120]. Holm H. C., Cowan D., *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2008**, 110, 679 – 691
- [121]. Artamanov A. F., Burkovskaya L. F., Nigmatullina F. S., Dzhiembaev B. Zh., *Chemistry of Natural Compounds*, **1997**, 33 (5), 571 – 573
- [122]. Sosulski F., Fleming S. E., *Journal of American Oil Chemist's Society*, **1977**, 54, 100A – 104A
- [123]. Baumert A., Milkowski C., Schmidt J., Nimtz M., Wray V., Strack D., *Phytochemistry*, **2005**, 66, 1334 – 1345
- [124]. Sawai A., Kondo T., Ara S., *Journal of Japanese Society of Grassland Science*, **1983**, 29 (2), 175 – 179
- [125]. Akin D. E., Ljungdahl L. G., Wilson J. R., Harris P. J., *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*, **1990**, 173 – 182
- [126]. Saulnier L., Vigouroux J., Thibault J. F., *Carbohydrate Research*, **1995**, 272, 241 – 253
- [127]. Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P., *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 729 – 736
- [128]. Stamatis H., Sereti V., Kolisis F. N., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 323 – 328

- [129]. Vafiadi C., Topakas E., Wong K. K. Y., Suckling I. D., Christakopoulos P., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 373 – 379
- [130]. Chen J. H., Ho C. T., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **1997**, 45, 2374 – 2378
- [131]. Otto R. T., Scheib H., Bornscheuer U. T., Pleiss J., Sylđatk C., Schmid R. D., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 8, 201 – 211
- [132]. Sabally K., Karboune S., Yeboah F. K., Kermasha S., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2005**, 127, 17 – 27
- [133]. Ohta T., Semboku N., Kuchii A., Egashira Y., Sanada H., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **1997**, 45, 1644 – 1648
- [134]. Maatta -Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Torronen A. R., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2004**, 52, 6178 – 6187
- [135]. Guyot B., Bosquette B., Pina M., Graille J., *Biotechnology Letters*, **1997**, 19 (6), 529 – 532
- [136]. Hensel A., Leisenheimer S., Müller A., Wolf-Heuss E., Engel J., Busker E., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1995**, 84, 115 – 118
- [137]. Twu Y. K., Shih I. L., Yen Y. H., Ling Y. F., Shieh C. J., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **2005**, 53, 1012 – 1016
- [138]. Buisman G. J. H., van Helteren C. T. W., Kramer G. F. H., Veldsink J. W., Derksen J. T. P., Cuperus F. P., *Biotechnology Letters*, **1998**, 20 (2), 131 – 136
- [139]. Compton D. L., Laszlo J. A., Berhow M. A., *Journal of American Oil Chemist's Society*, **2000**, 77 (5), 513 – 519
- [140]. Stamatis H., Sereti V., Kolisis F. N., *Journal of American Oil Chemist's Society*, **1999**, 76 (12), 1505 – 1510
- [141]. Stevenson D. E., Wibisono R., Jensen D. J., Stanley R. A., Cooney J. M., *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**, 39, 1236 – 1241
- [142]. Corner J. J., Swain T., *Nature*, **1965**, 207, 634 – 635
- [143]. Kirk O., Christensen W. M., Beck F., Damhus T., *Biocatalysis and Biotransformations*, **1995**, 12 (2), 91 – 97
- [144]. Livage J., Coradin T., Roux C., *Journal of Physics: Condensed Matter*, **2001**, 13, R673 – R691
- [145]. Khimich N. N., *Glass Physics and Chemistry*, **2004**, 30 (5), 430 – 442
- [146]. Collinson M. M., *Mikrochimica Acta*, **1998**, 129 149 – 165
- [147]. Betancor L., Luckarift H. R., *Trends in Biotechnology*, **2008**, 26 (10), 566 – 572
- [148]. Pierre A.C., *Biocatalysis and Biotransformation*, **2004**, 22 (3), 145 – 170
- [149]. Jin W., Brennan J. D., *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 461, 1 – 36
- [150]. Gill I., *Chemistry of Materials*, **2001**, 13, 3404 – 3421
- [151]. Kandimalla V. B., Tripathi V. S., Ju H., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2006**, 36, 73 – 106
- [152]. Gill I., Ballesteros A., *Tibtech*, **2000**, 18, 469 – 479
- [153]. Hoyos P., Buthe A., Ansorge-Schumacher M. B., Sinisterra J. V., Alcantara A. R., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2008**, 52/53, 133 – 139
- [154]. Cao X., Yang J., Shu L., Yu B., Yan Y., *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 177 – 182
- [155]. Chen J. P., Hwang Y. N., *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**, 33, 513 – 519
- [156]. Dandavate V., Keharia H., Madamwar D., *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 349 – 352

- [157]. Hara P., Hanefeld U., Kanerva L. T., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2008**, 50, 80 – 86
- [158]. Kawakami K., Takahashi R., Shakeri M., Sakai S., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 57, 194 – 197
- [159]. Macario A., Moliner M., Corma A., Giordano G., *Microporous and Mesoporous Materials*, **2009**, 118, 334 – 340
- [160]. Nassreddine S., Karout A., Christ M. L., Pierre A. C., *Applied Catalysis A: General*, **2008**, 344, 70 – 77
- [161]. Soares C. M. F., dos Santos O. A., Olivo J. E., de Castro H. F., de Moraes F. F., Zanin G. M., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 29, 69 – 79
- [162]. Soares C. M. F., dos Santos O. A., de Castro H. F., de Moraes F. F., Zanin G. M., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 39, 69 – 76
- [163]. Soares C. M. F., dos Santos O. A. A., de Castro H. F., Itako J. E., de Moraes F. F., Zanin G. M., *Journal of Non-Crystalline Solids*, **2006**, 352, 3469 – 3477
- [164]. Yang G., Wu J., Xu G., Yang L., *Bioresource Technology*, **2009**, 100, 4311 – 4316
- [165]. Zarcula C., **Croitoru R.**, Corîci L., Csunderlik C., Peter F., *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, **2009**, 2 (3), 138 – 144
- [166]. Peter F., Zarcula C., Kakasi-Zsurka S., **Croitoru R.**, Davidescu C., Csunderlik C., *Journal of Biotechnology*, **2008**, 136S, S356 – S401
- [167]. Zarcula C., Corîci L., **Croitoru R.**, Péter F., *Annals of West University of Timisoara, Series of Chemistry*, **2007**, 16 (4), 107 – 112
- [168]. Zarcula C., Corîci L., **Croitoru R.**, Péter F., *Annals of West University of Timisoara, Series Chemistry*, **2008**, 17 (3), 61 – 66
- [169]. Brem J., Turcu M. C., Paizs C., Lundell K., Toşa M. I., Irimie F. D., Kanerva L. T., *Process Biochemistry*, **2012**, 47 (1), 119 – 126
- [170]. Brem J., Liljebblad A., Paizs C., Toşa M. I., Irimie F. D., Kanerva L. T., *Tetrahedron:Asymetry*, **2011**, 22 (3), 315 – 322
- [171]. Brem J., Naghi M., Toşa M. I., Boros Z., Poppe L., Irimie F. D., Paizs C., *Tetrahedron:Asymetry*, **2011**, 22 (16 – 17), 1672 – 1679
- [172]. Gotor-Fernandez V., Brieva R., Gotor V., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 40, 111 – 120
- [173]. Falbe J., *Surfactants in Consumer Products—Theory, Technology and Application*, **1986**, Springer
- [174]. Hill K., Rhode O., *Fett/ Lipid*, **1999**, 101 (1), 25 – 33
- [175]. Schulz P., *Chimica oggi*, **1992**, 10 (8/9), 33 – 38
- [176]. Tundo P., Perosa A., Zecchini F., *Methods and Reagents for Green Chemistry*, **2007**, Wiley - Interscience
- [177]. Whitehurst R. J., *Emulsifiers in Food Technology*, **2004**, Blackwell Publishing
- [178]. Muller A. S., Gagnaire J., Queneau Y., Karaoglanian M., Maitre J. P., Bouchu A., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2002**, 203, 55 – 66
- [179]. Bazin H. G., Polat T., Linhardt R. J., *Carbohydrate Research*, **1998**, 309, 189 – 205
- [180]. Horton D., *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **2008**, 61, Elsevier
- [181]. Riess J. G., Greiner J., *Carbohydrate Research*, **2000**, 327, 147 – 168
- [182]. Christian D., Fitremann J., Bouchu A., Queneau Y., *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 583 – 586

- [183]. Polat T., Linhardt R. J., *Journal of Surfactants and Detergents*, **2001**, 4 (4), 415 – 421
- [184]. Reynolds R. C., Chappel C. I., *Food and Chemical Toxicology*, **1998**, 36, 81 – 93
- [185]. Grenby T.H., *Advances in Sweeteners*, **1996**, Blackie Academic and Professional
- [186]. Toda M., Takagaki A., Okamura M., Kondo J. N., Hayashi S., Domen K., Hara M., *Nature*, **2005**, 438, 178
- [187]. Booten K., Levecke B., *Specialty Chemicals Magazine*, **2004**, 14
- [188]. Tharwat T., Levecke B., Booten K., *Chimica Oggi*, **2006**, 55
- [189]. Naik S., Basu A., Saikia R., Madan B., Paul P., Chaterjee R., Brask J., Svendsen A., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 65, 18 – 23
- [190]. Kanerva L. T., Vihanto J., Halme M. H., Lojonen J. M., Euranto E. K., *Acta Chemica Scandinavica*, **1990**, 44, 1032 – 1035
- [191]. Li N., Zeng Q. M., Zong M. H., *Journal of Biotechnology*, **2009**, 142, 267 – 270
- [192]. **Croitoru R.**, Paul C., van den Broek A. L., Friessen A. E., Peter F., Boeriu C. G., *Netherlands Biotechnology Congress*, **2010**, 112
- [193]. **Croitoru R.**, Paul C., van den Broek A. L., Friessen A. E., Peter F., Boeriu C. G., *The 5<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis*, **2010**, ISBN 978-3-941492-24-0, 143
- [194]. Castillo E., Pezzotti F., Navarro A., Lopez-Munguia A., *Journal of Biotechnology*, **2003**, 102, 251 – 259
- [195]. **Croitoru R.**, van den Broek L. A. M., Frissen A. E., Davidescu C. M., Peter F., Boeriu C. G., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 76, 484 – 489
- [196]. Arroyo M., Sinisterra J. V., *Journal of Organic Chemistry*, **1994**, 59, 4410 – 4417
- [197]. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations*, **1999**, Wiley - WCH
- [198]. Schmid R. D., Verger R., *Angewandte Chemie International*, **1998**, 37, 1608 – 1633
- [199]. Zaks A., Klibanov A. M., *Journal of Biological Chemistry*, **1988**, 263 (7), 3194 – 3201
- [200]. Cao L., Bornscheuer U. T., Schmid R. D., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 279 – 285
- [201]. Sarney D. B., Kapeller H., Fregapane G., Vulfson E. N., *Journal of American Oil Chemists Society*, **1994**, 71(7), 711 – 714
- [202]. Bhaskar P. M., Mathiselvam M., Loganathan D., *Carbohydrate Research*, **2008**, 343, 1801 – 1807
- [203]. Hanaya T., Sato N., Yamamoto H., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 2494 – 2501
- [204]. Brar A., Vankar Y. D., *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 5207 – 5210
- [205]. **Croitoru R.**, Fițișău F., Van den Broek L. A. M., Frissen A., Peter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., *Bioprocess Biochemistry*, 2012, în curs de publicare.
- [206]. **Croitoru R.**, Paul C., Van den Broek L. A. M., Frissen A., Peter F., Boeriu C. G., *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, Romania, **2010**, p. 39

- [207]. **Croitoru R.**, Van den Broek L. A. M., Frissen A., Davidescu C. M., Peter F., Boeriu C. G., *12th Edition of Timisoara's Academic Days, Chemistry*, Timișoara, Romania, **2011**, p. 115

## ANEXE

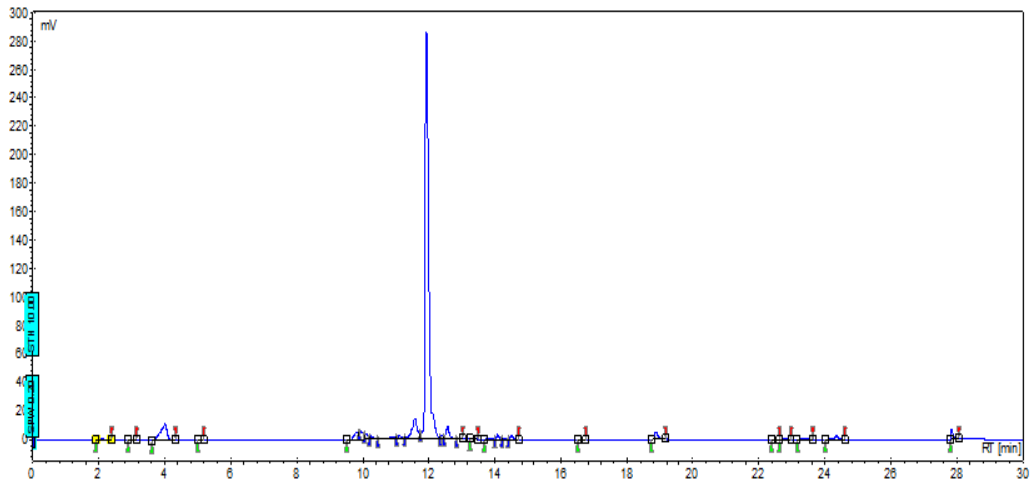


Figura 1. Cromatograma HPLC a 1-sorbitil-3-(4-hidroxifenil)-propionatului.

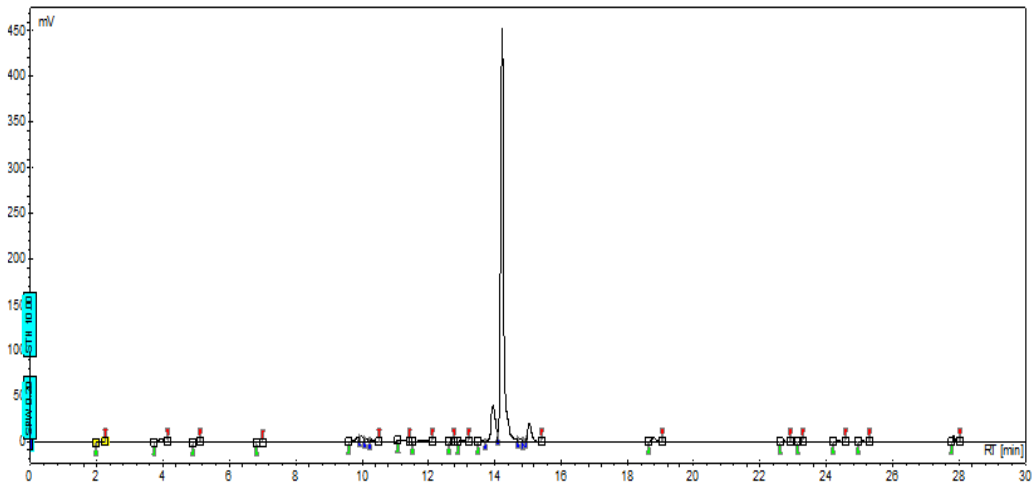


Figura 2. Cromatograma HPLC a 1,6-di-sorbitil-3-(4-hidroxifenil)-propionatului.

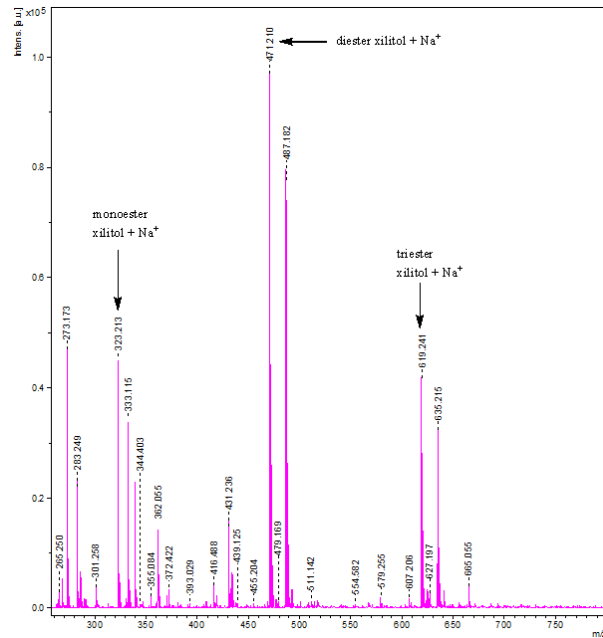


Figura 3. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea xilitolului cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

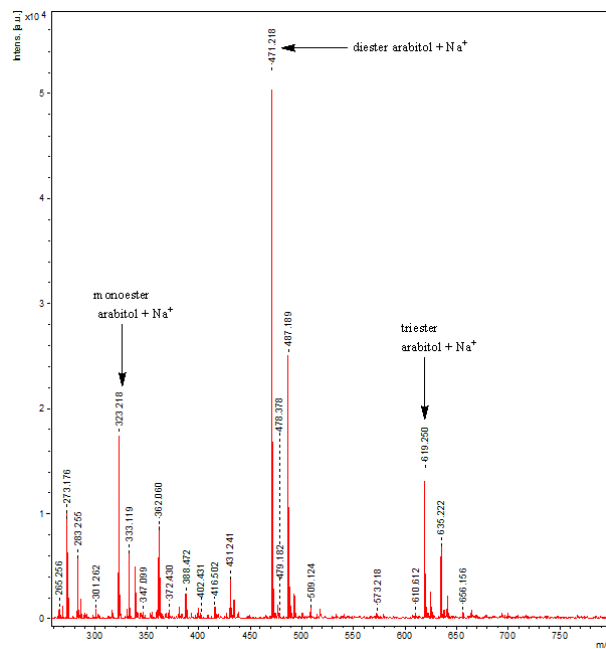


Figura 4. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea arabitolului cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

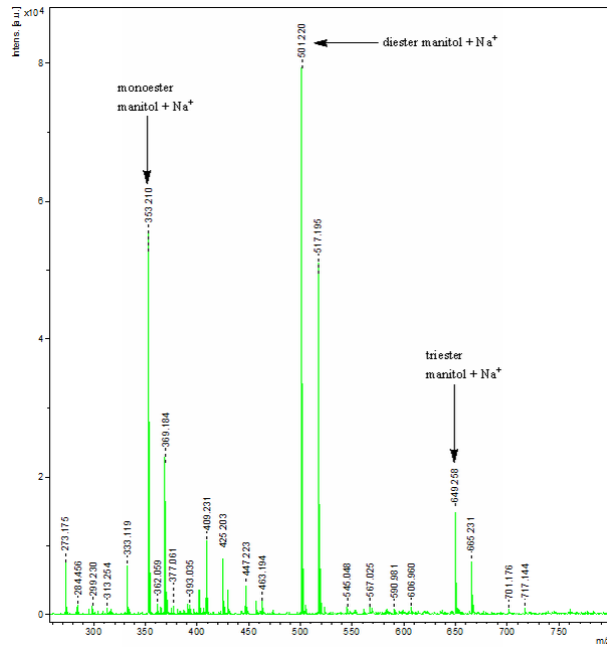


Figura 5. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea manitolului cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

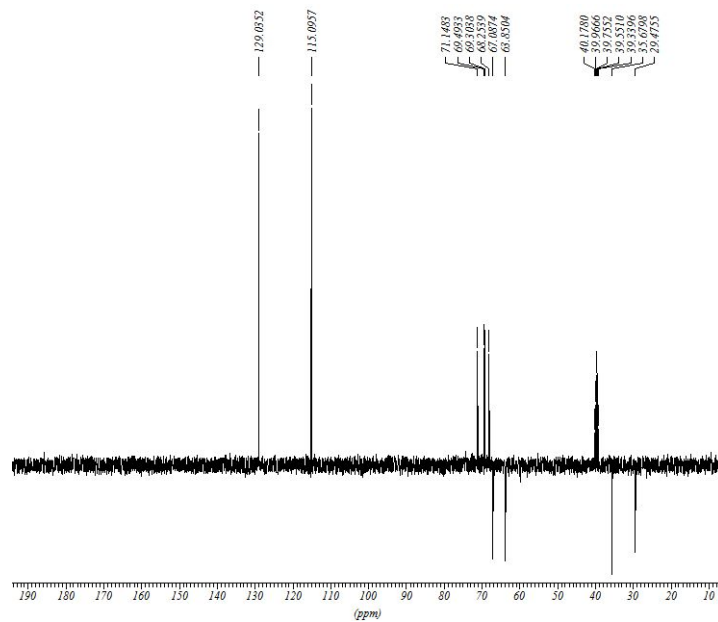


Figura 6. Spectrul DEPT 135 al 1-manitol-3-(4-hidroxifenil)-propionatului (CDCl<sub>3</sub>).



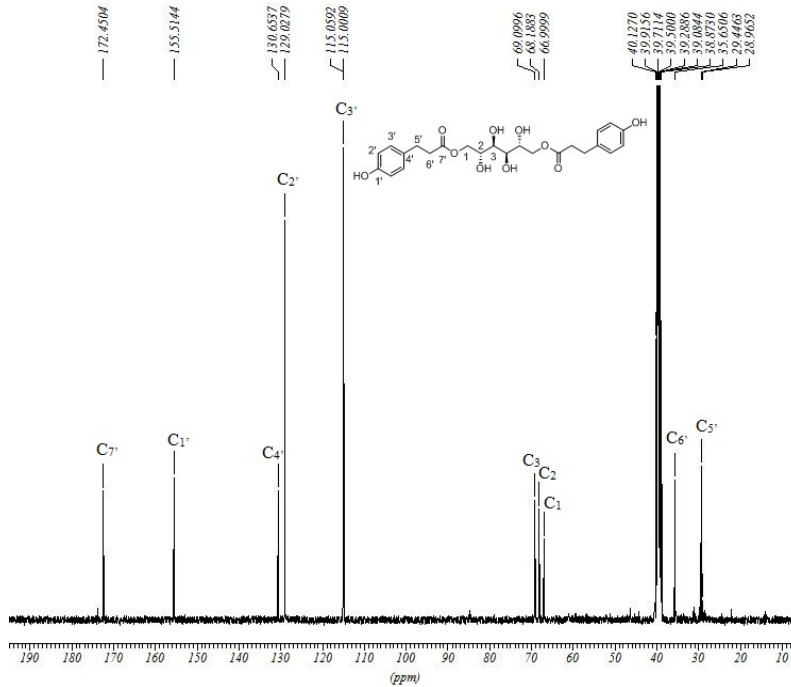


Figura 7. Spectrul <sup>13</sup>C-RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de manitol (DMSO-d6).

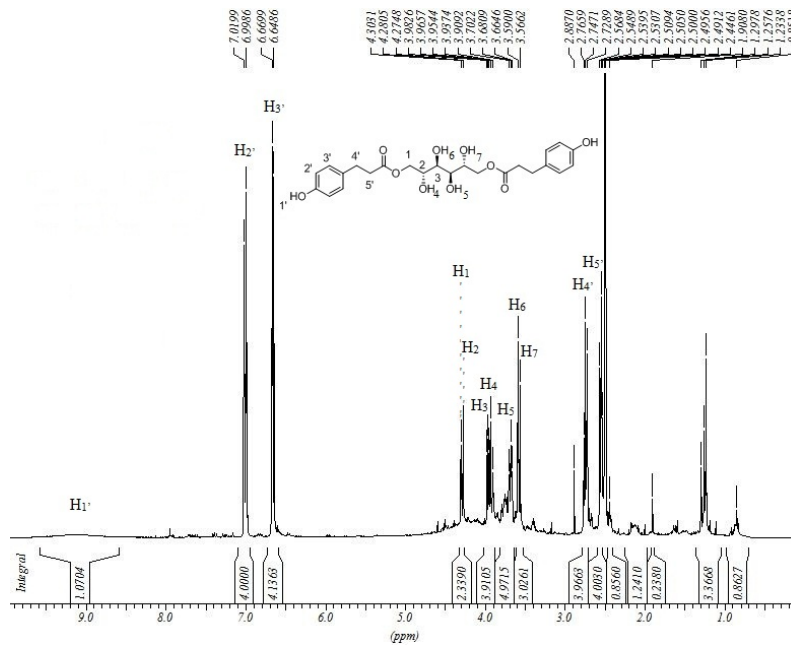


Figura 8. Spectrul <sup>1</sup>H-RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de manitol (DMSO-d6).

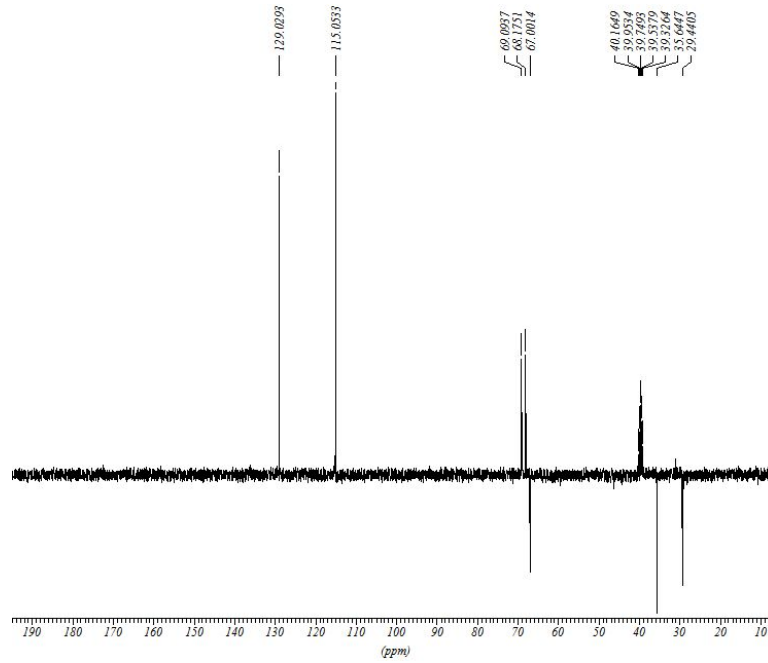


Figura 9. Spectrul DEPT 135 al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de manitol ( $\text{CDCl}_3$ ).

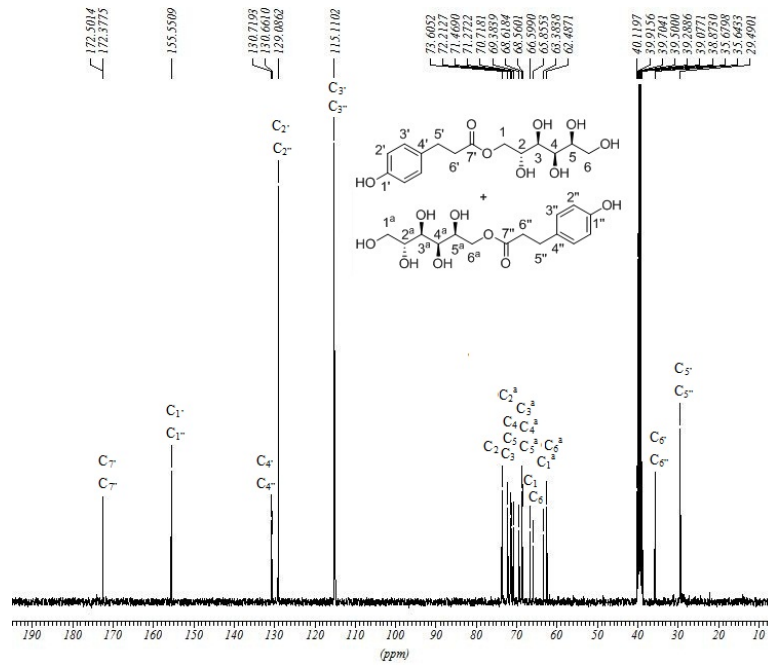


Figura 10. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de sorbitol și 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de sorbitol ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

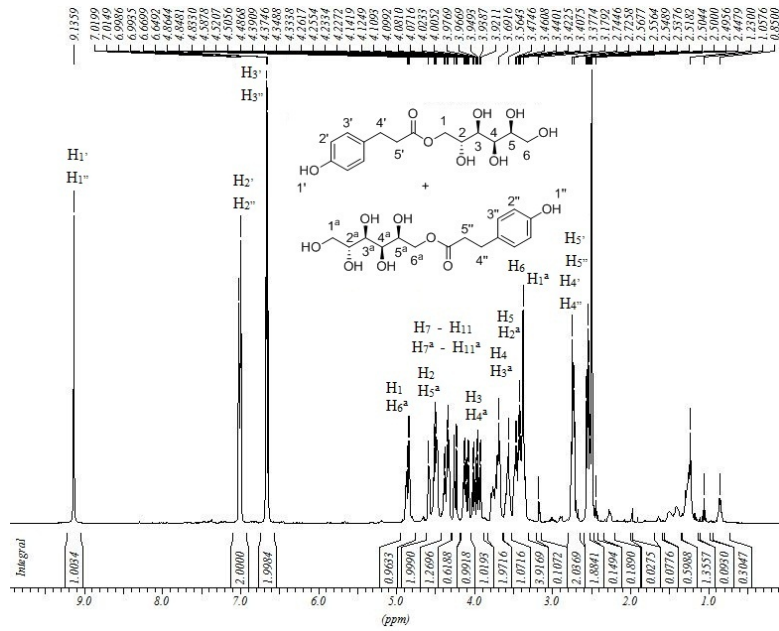


Figura 11. Spectrul <sup>1</sup>H-RMN al 1-O-3-(4-hidroxfenil)-propionatului de sorbitol și 6-O-3-(4-hidroxfenil)-propionatului de sorbitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

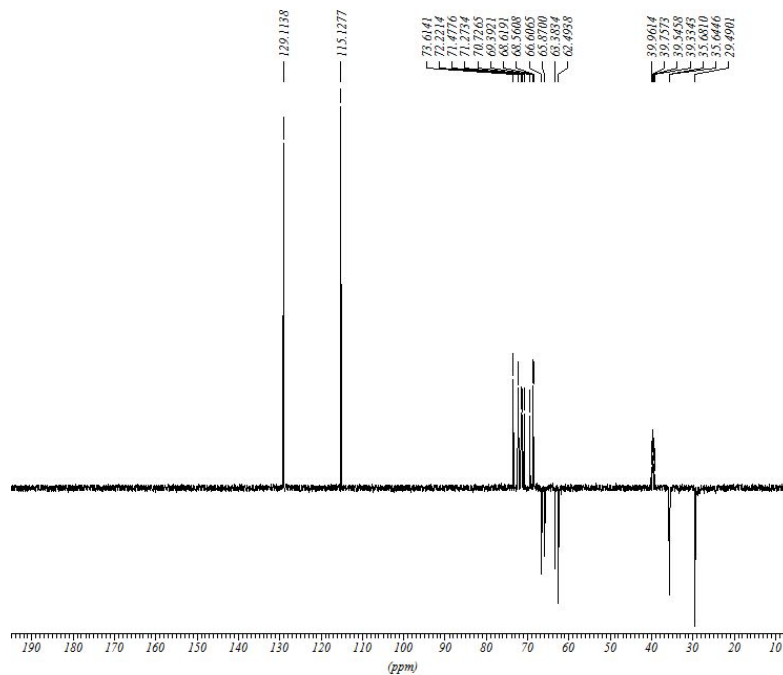


Figura 12. Spectrul DEPT 135 al 1-O-3-(4-hidroxfenil)-propionatului de sorbitol și 6-O-3-(4-hidroxfenil)-propionatului de sorbitol (CDCl<sub>3</sub>).

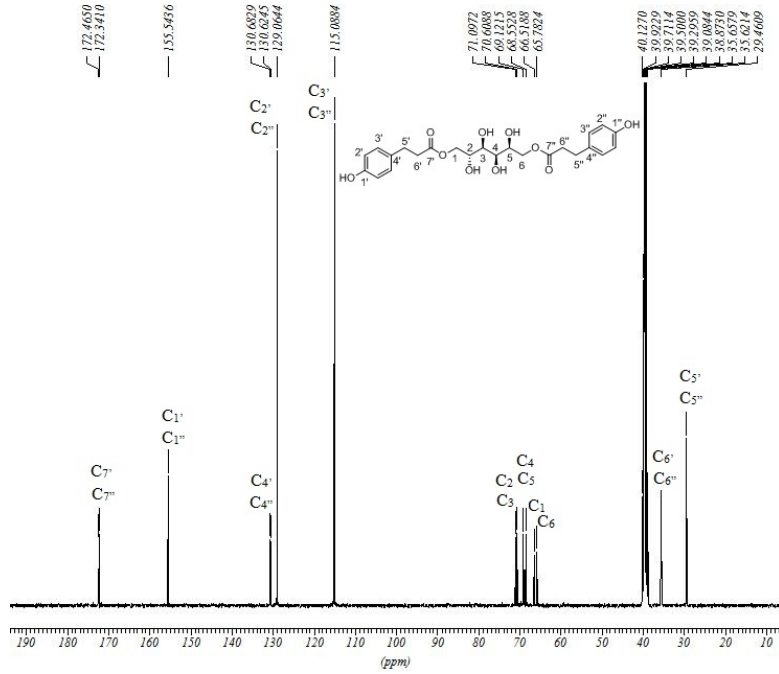


Figura 13. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de sorbitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

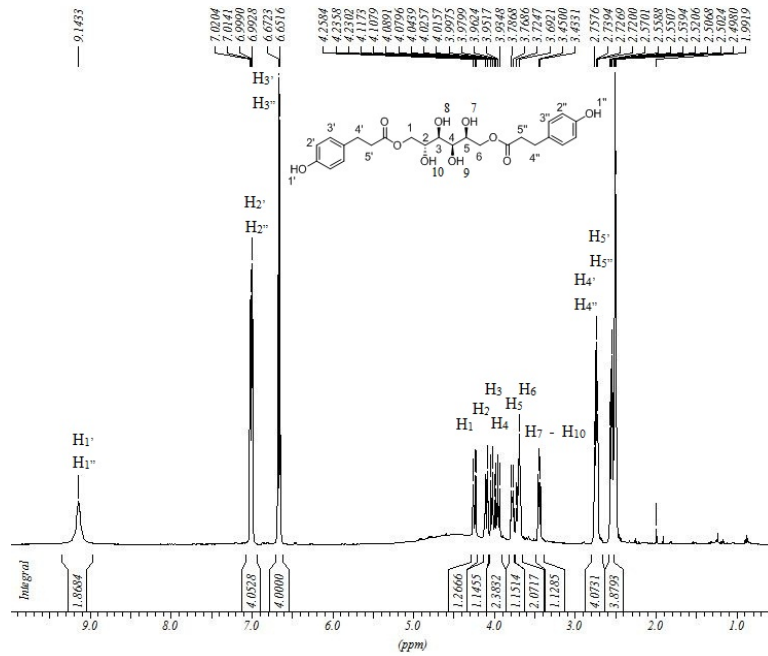


Figura 14. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de sorbitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

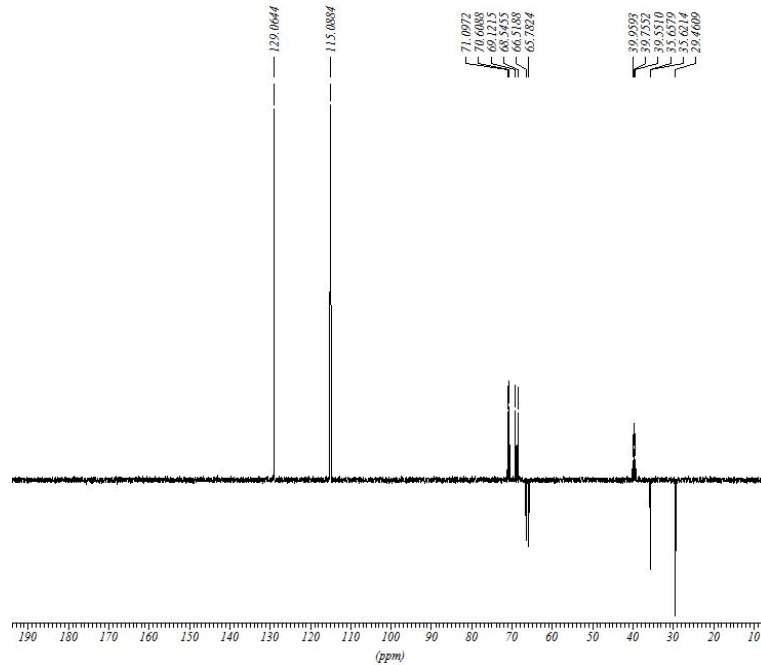


Figura 15. Spectrul DEPT 135 al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de sorbitol (CDCl<sub>3</sub>).

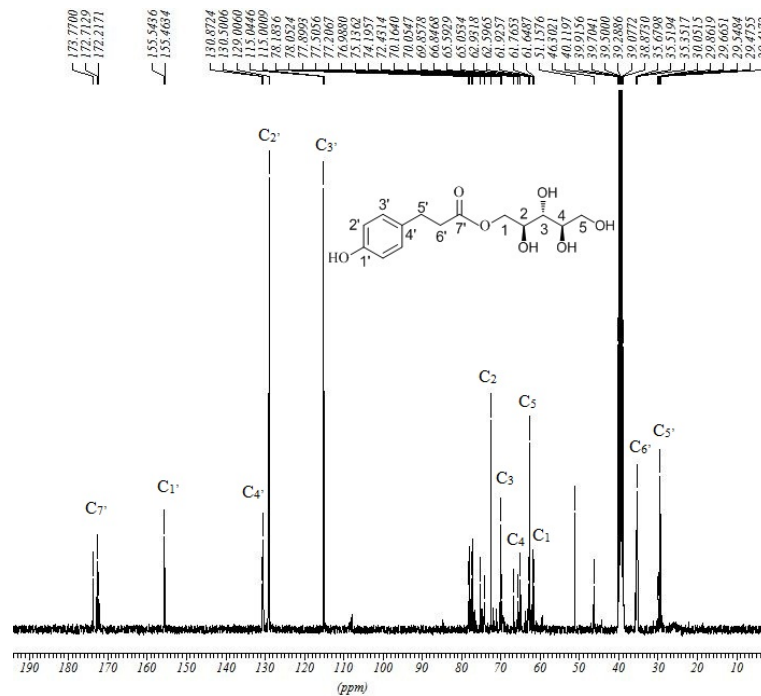


Figura 16. Spectrul <sup>13</sup>C-RMN al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de xilitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

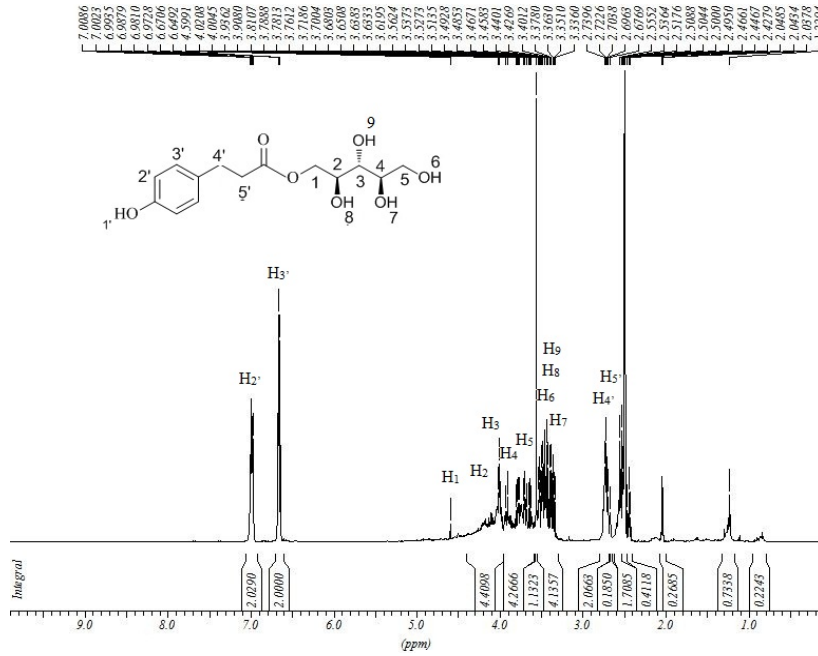


Figura 17. Spectrul <sup>1</sup>H-RMN al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de xilitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

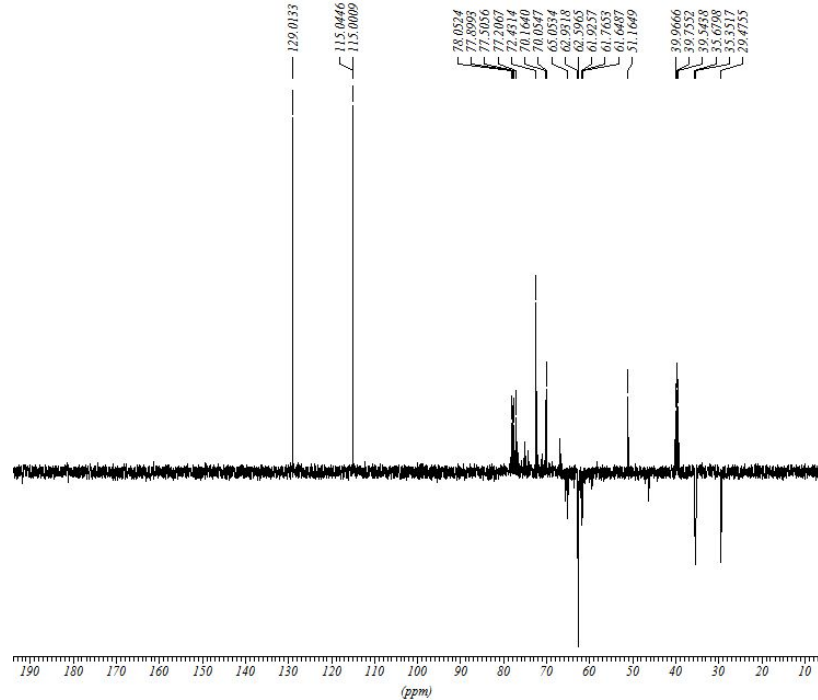


Figura 18. Spectrul DEPT 135 al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de xilitol (CDCl<sub>3</sub>).

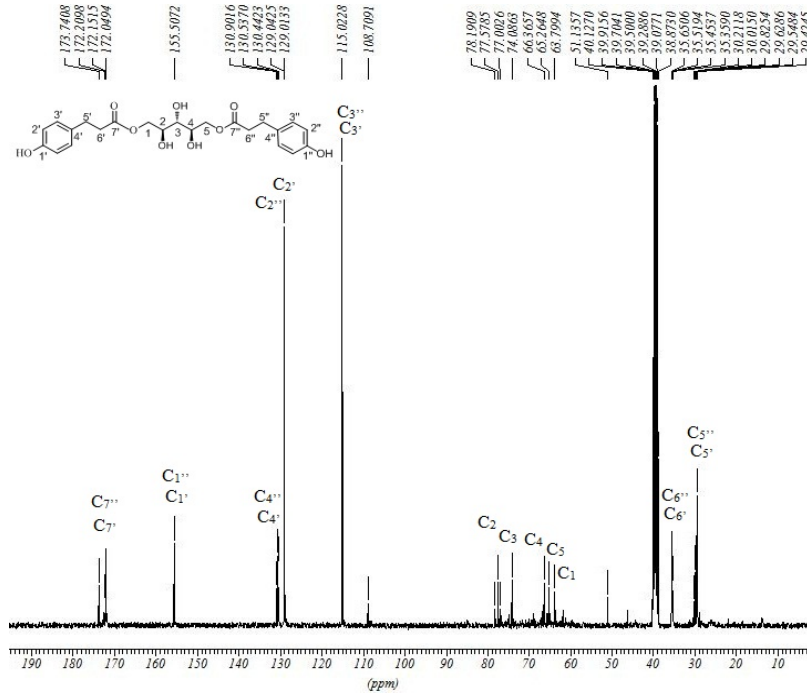


Figura 19. Spectrul <sup>13</sup>C-RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxyfenil)-propionatului de xilitol (DMSO-d6).

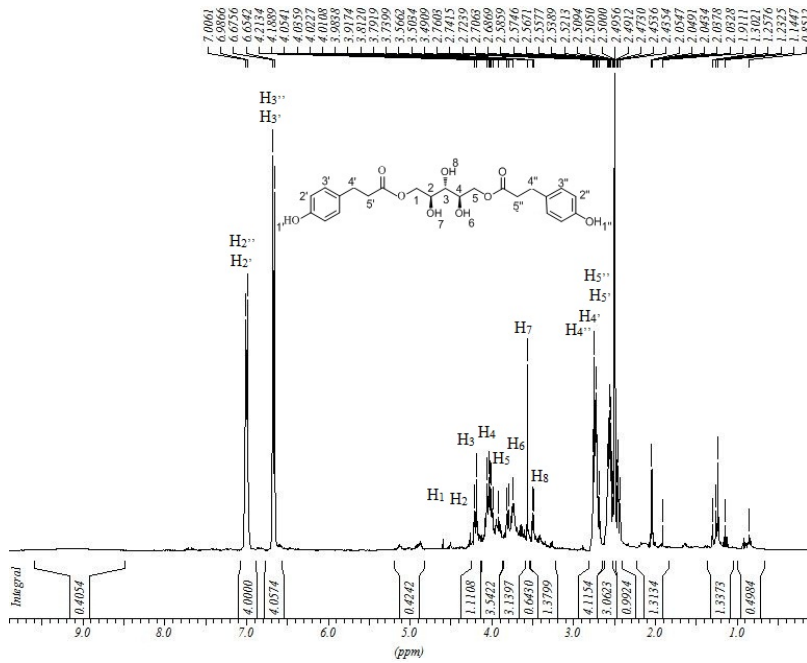


Figura 20. Spectrul <sup>1</sup>H-RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxyfenil)-propionatului de xilitol (DMSO-d6).

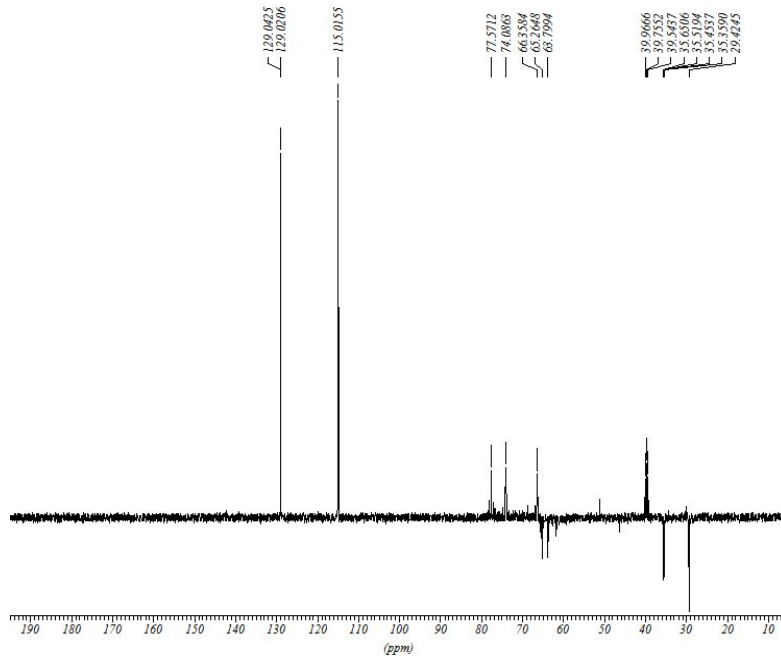


Figura 21. Spectrul DEPT 135 al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de xilitol ( $CDCl_3$ ).

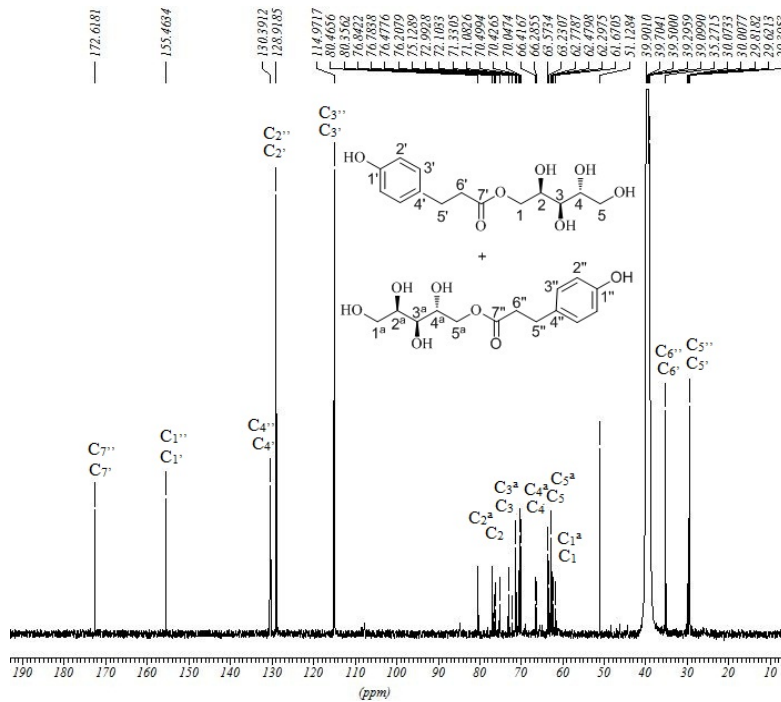


Figura 22. Spectrul  $^{13}C$ -RMN al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol ( $DMSO-d_6$ ).



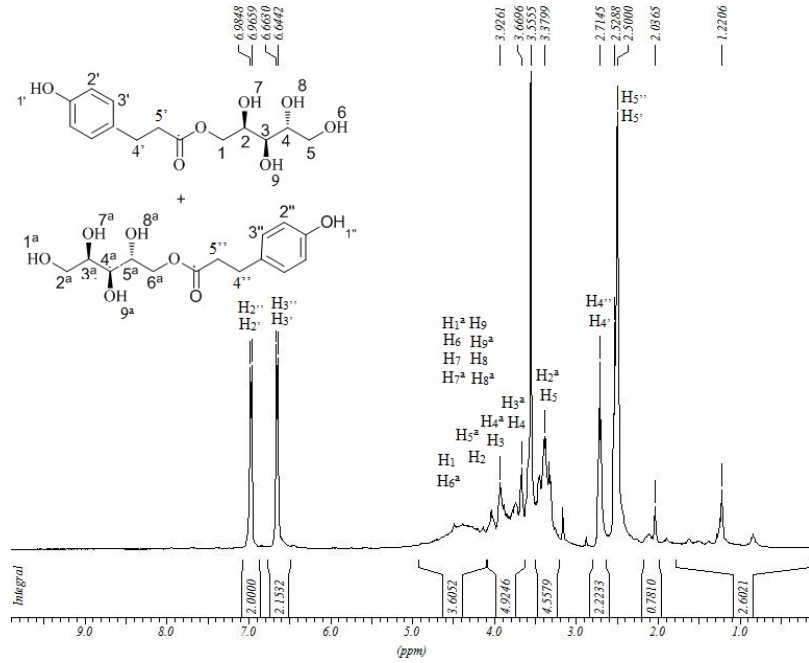


Figura 23. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

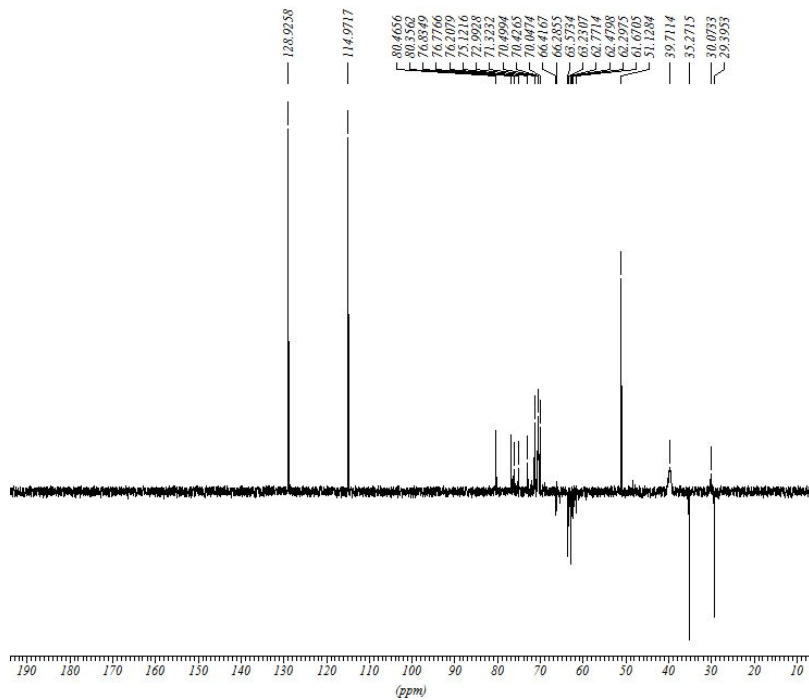


Figura 24. Spectrul DEPT 135 al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol (CDCl<sub>3</sub>).

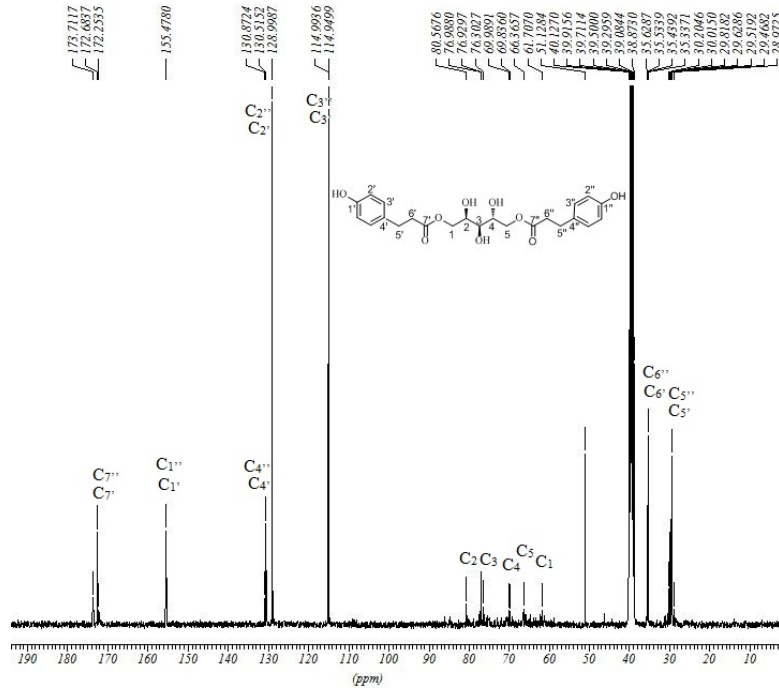


Figura 25. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

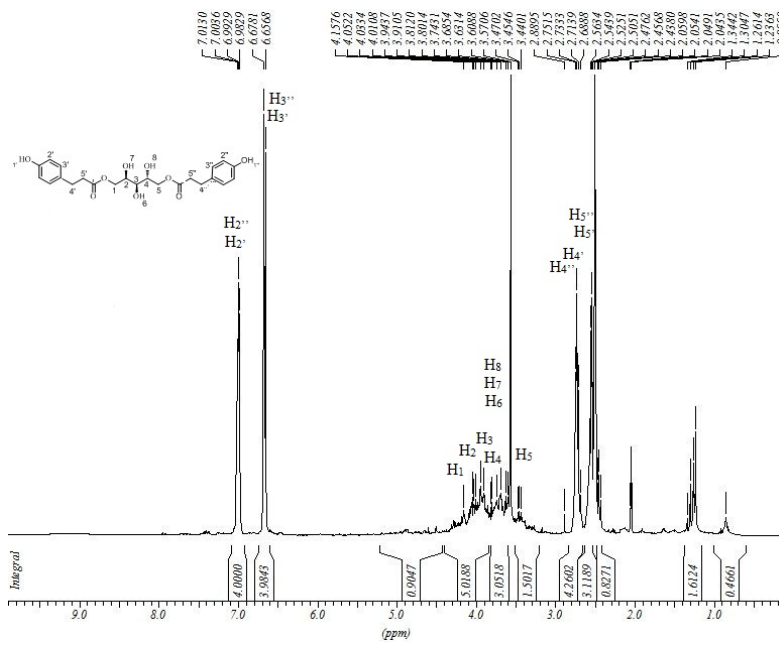


Figura 26. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol (DMSO-d<sub>6</sub>).

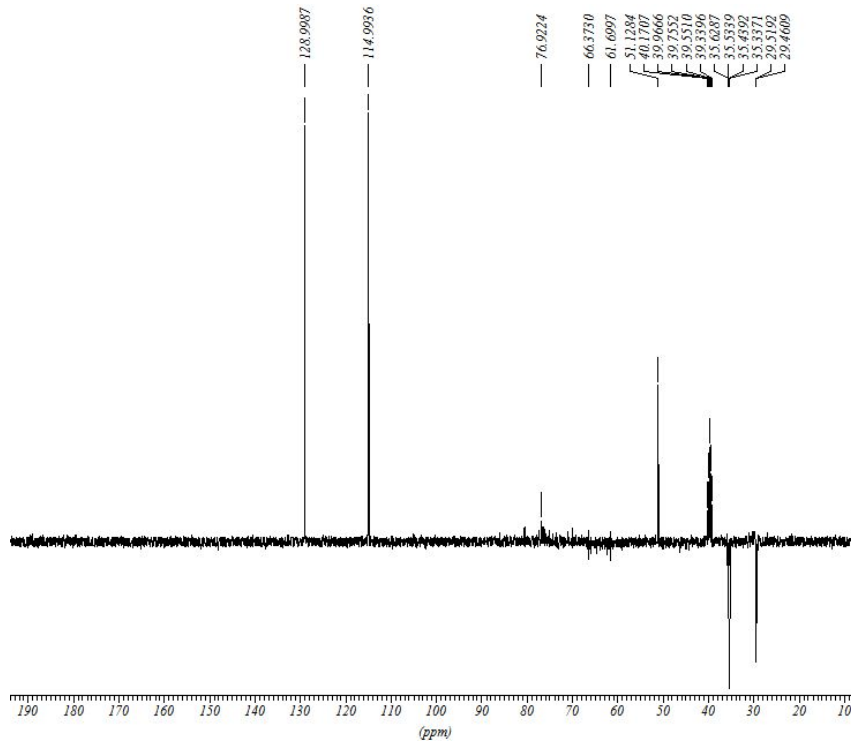


Figura 27. Spectrul DEPT 135 al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol (CDCl<sub>3</sub>).

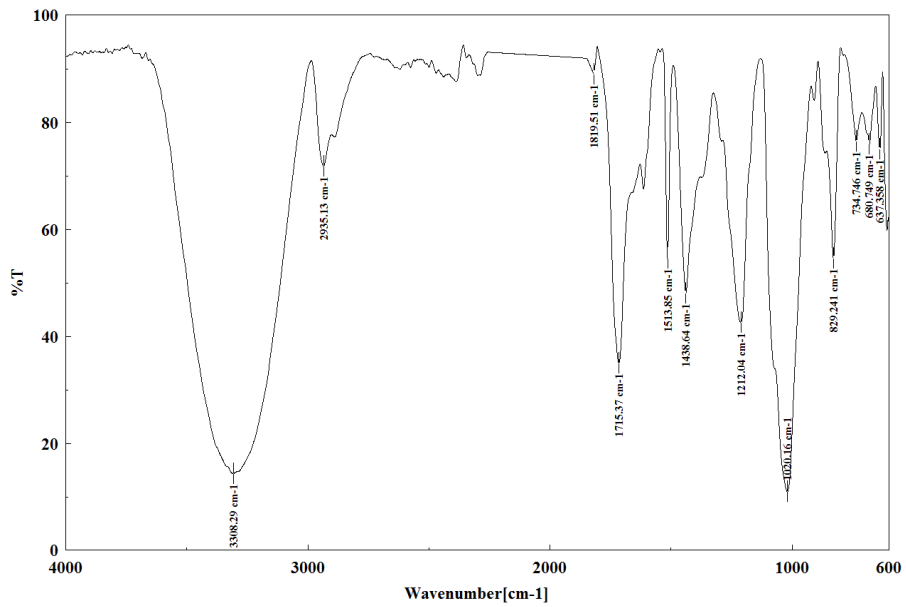


Figura 28. Spectrul FT - IR al 1-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol.

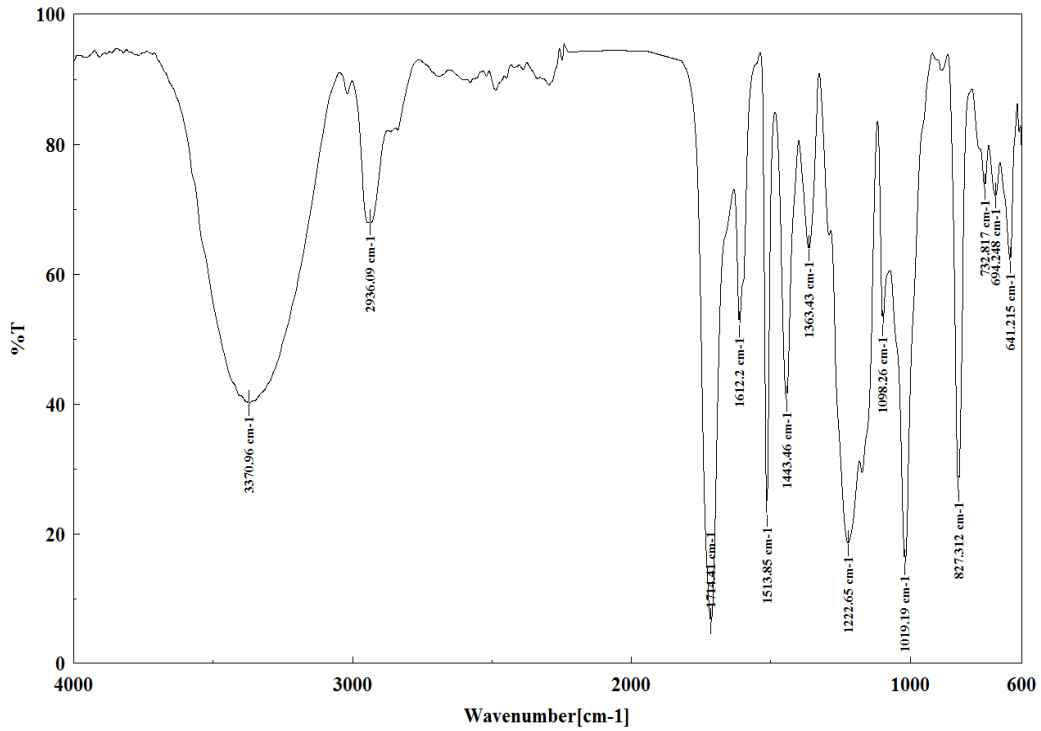


Figura 29. Spectrul FT – IR al 1,6-di-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de arabitol.

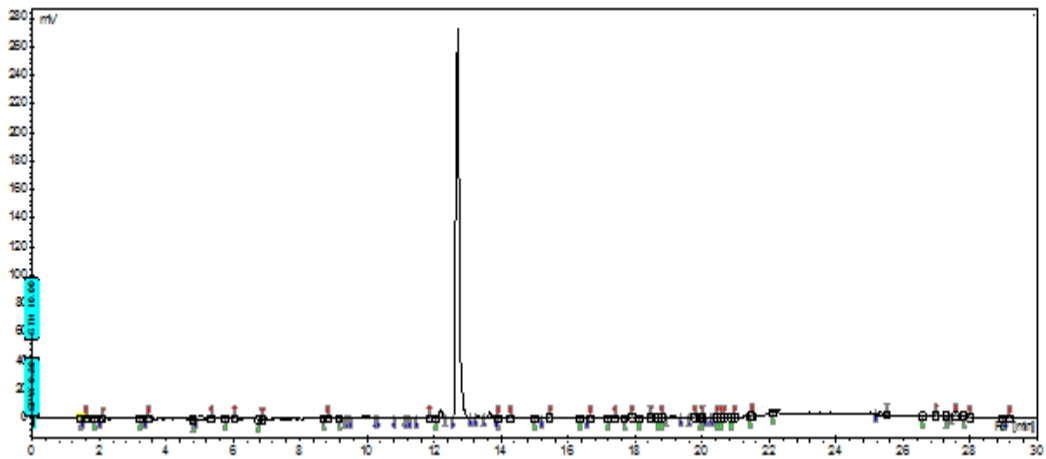


Figura 30. Cromatograma HPLC a 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză.

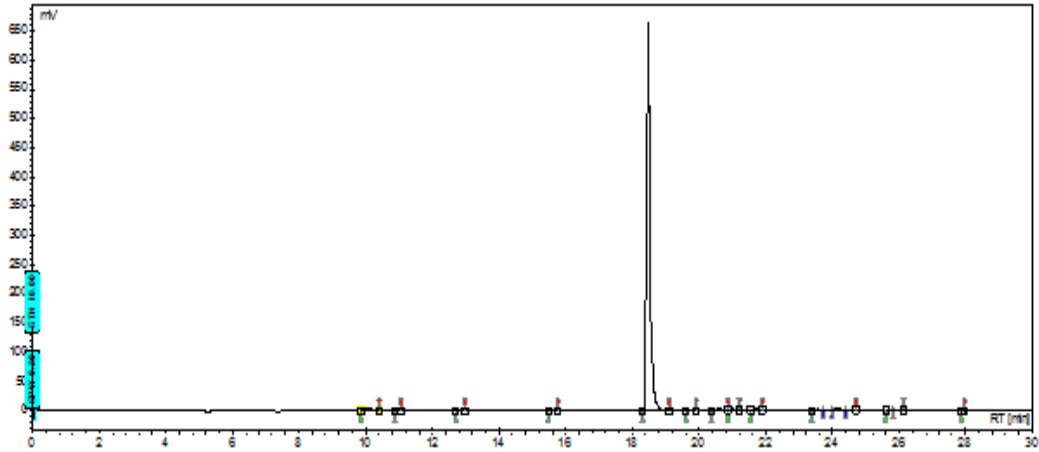


Figura 31. Cromatograma HPLC a 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză.

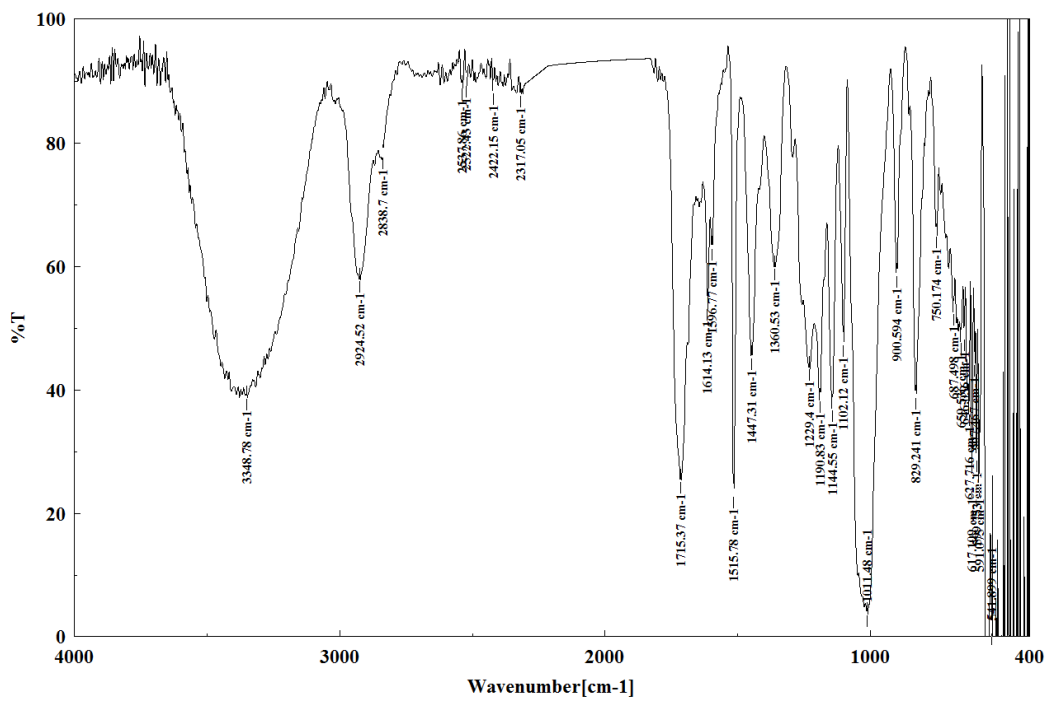


Figura 32. Spectrul FT – IR al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză.

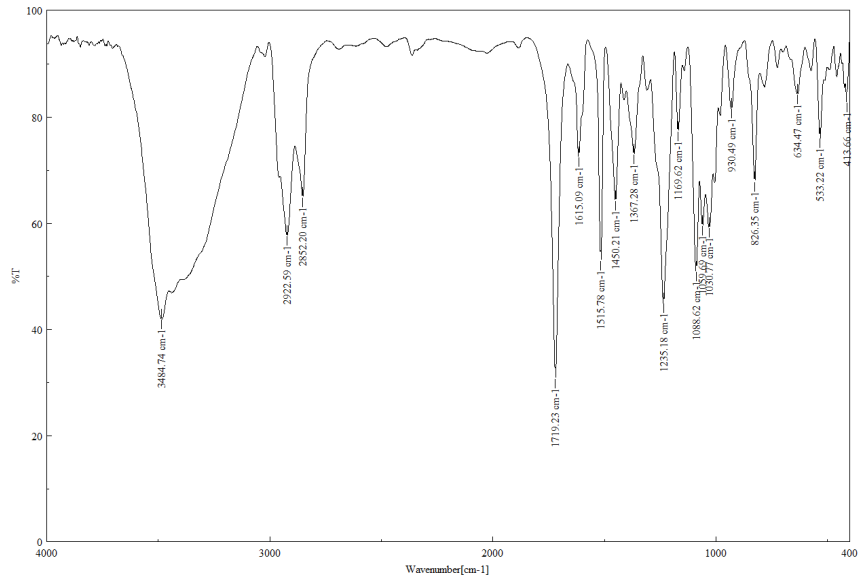


Figura 33. Spectrul FT – IR al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză.

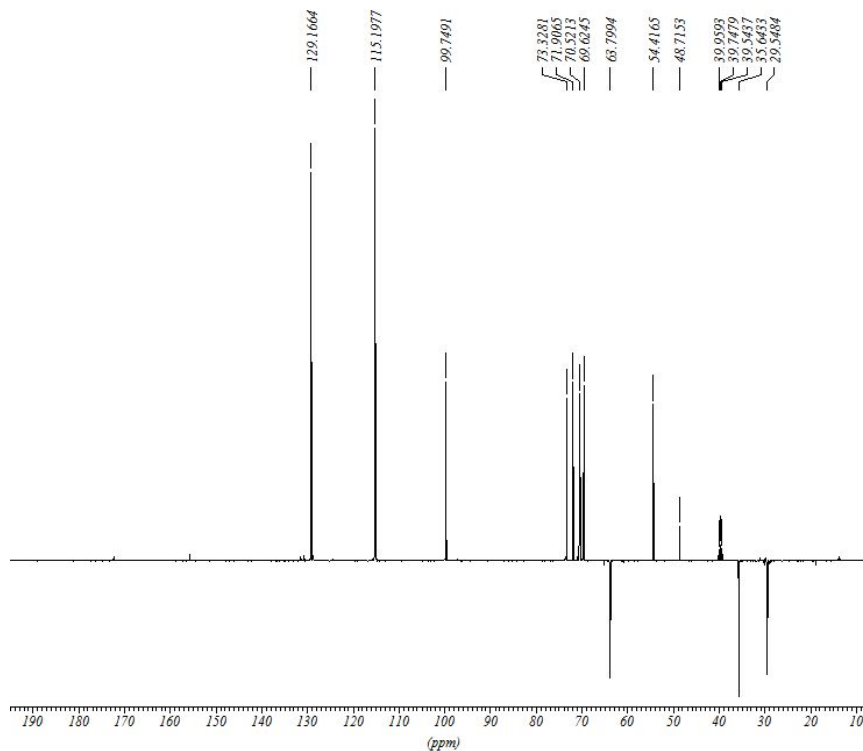


Figura 34. Spectrul DEPT 135 al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză (DMSO-d<sub>6</sub>).

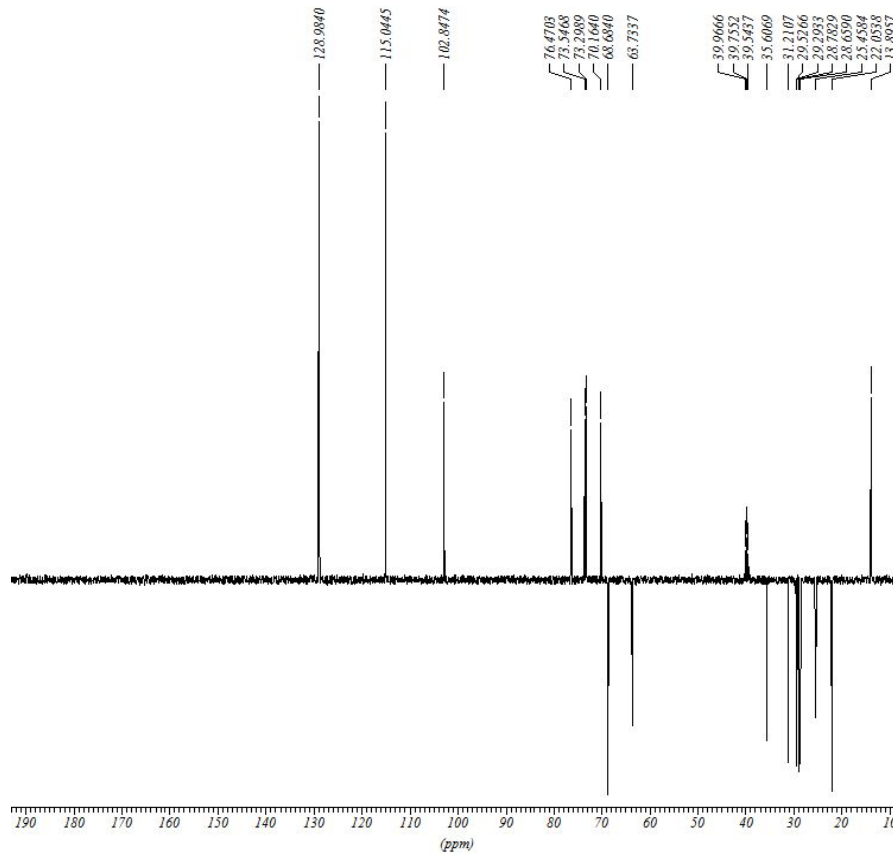


Figura 35. Spectrul DEPT 135 al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză (DMSO-d<sub>6</sub>).

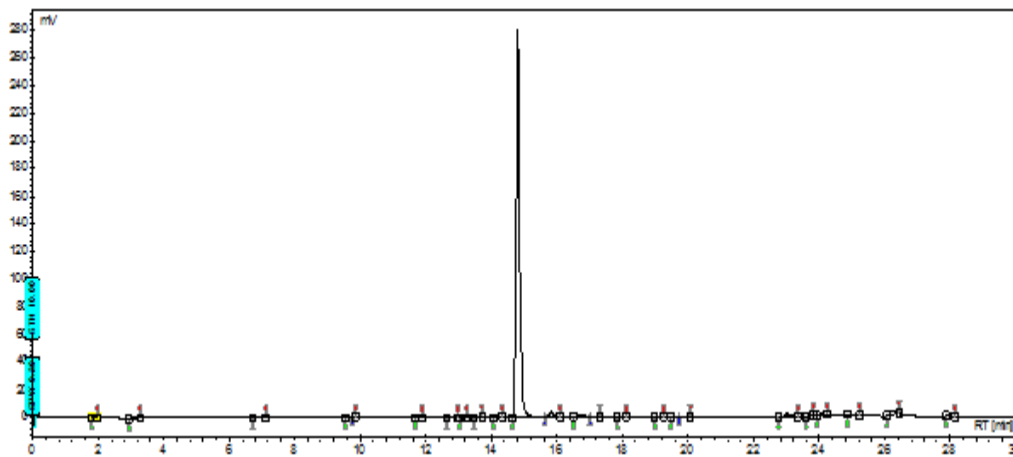


Figura 36. Cromatograma HPLC a 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropiliden-glucozei.

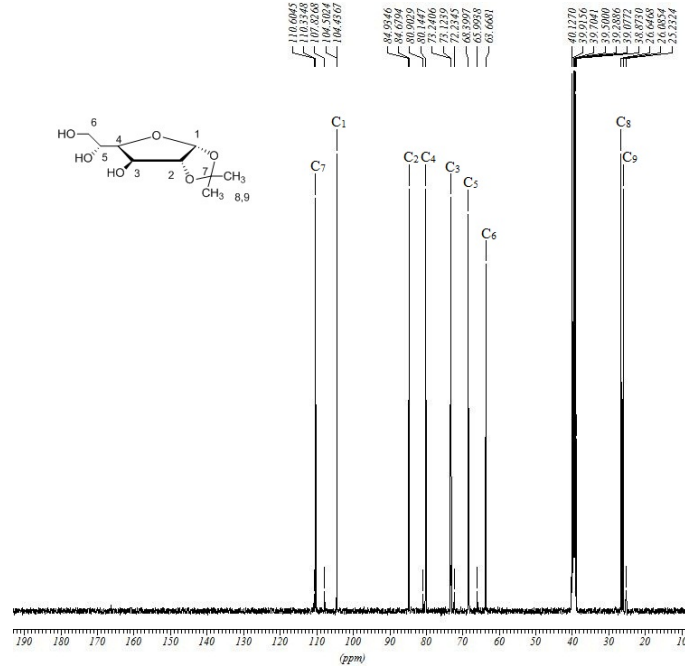


Figura 37. Spectrul  $^{13}\text{C}$ -RMN al 1,2-O-izopropiliden-glucofuranzei (DMSO-d<sub>6</sub>).

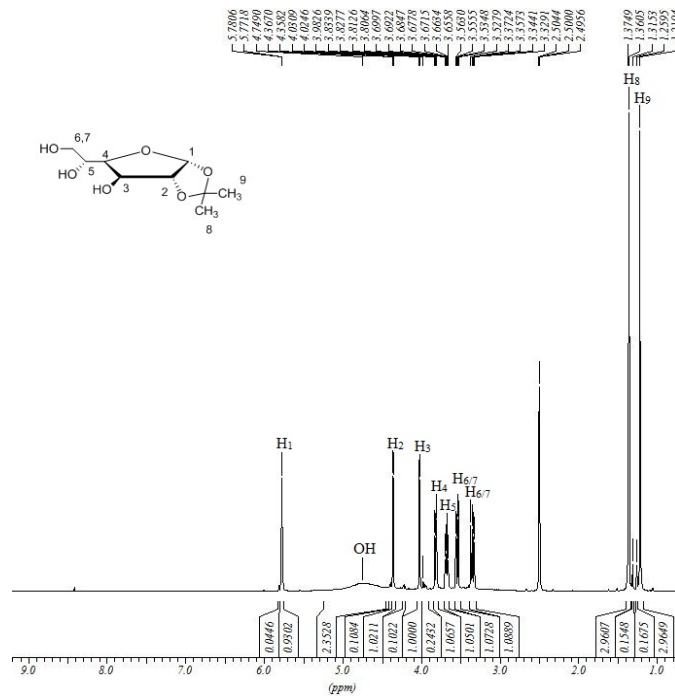


Figura 38. Spectrul  $^1\text{H}$ -RMN al 1,2-O-izopropiliden-glucofuranzei (DMSO-d<sub>6</sub>).



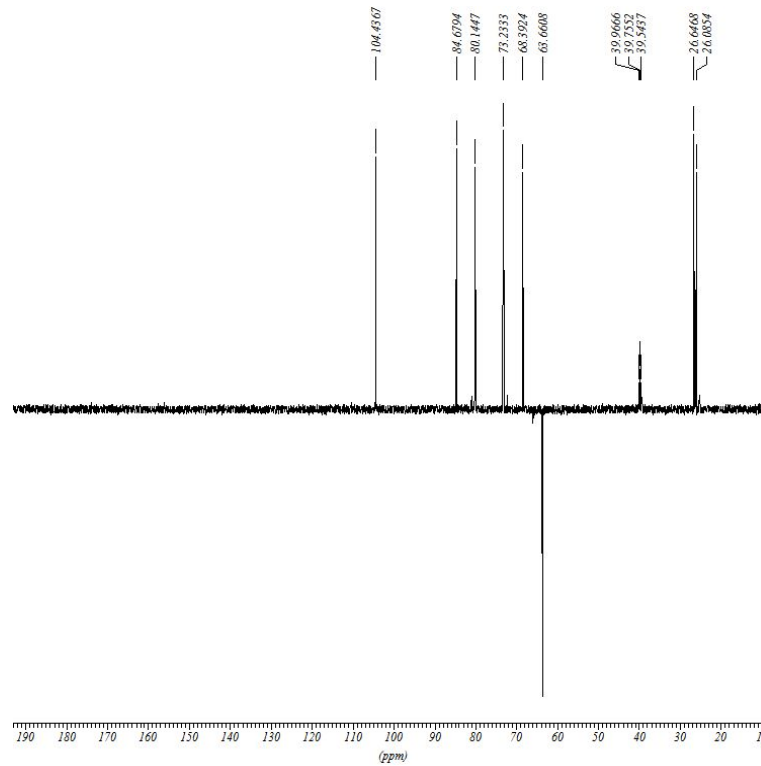


Figura 39. Spectrul DEPT 135 al 1,2-O-izopropiliden-glucofuranozei (DMSO-d6).

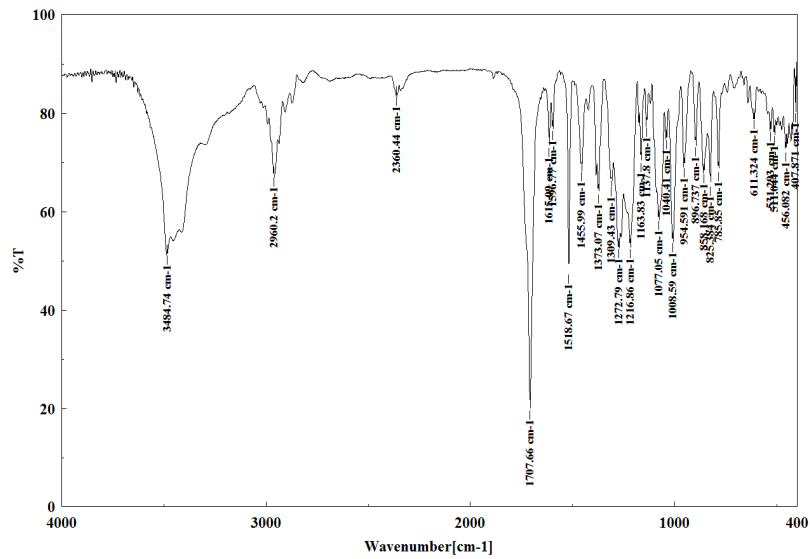


Figura 40. Spectrul FT - IR al 6-O-3-(4-hidroxyfenil)-propionatului de 1,2-O-izopropiliden-glucofuranoză.

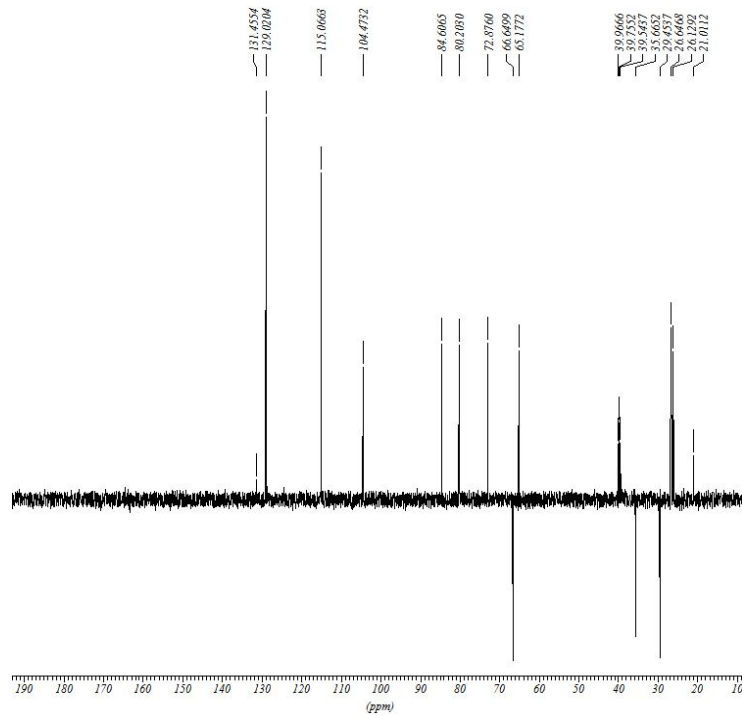


Figura 41. Spectrul DEPT 135 al 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropiliden-glucofuranoză (DMSO-d6).

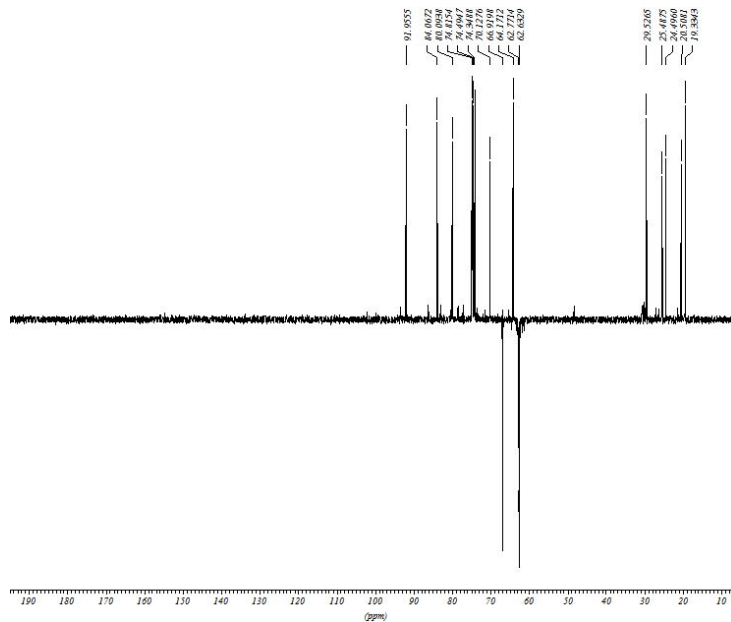


Figura 42. Spectrul DEPT 135 al 2,1',4,6-di-O-izopropiliden zaharozei (DMSO-d6).

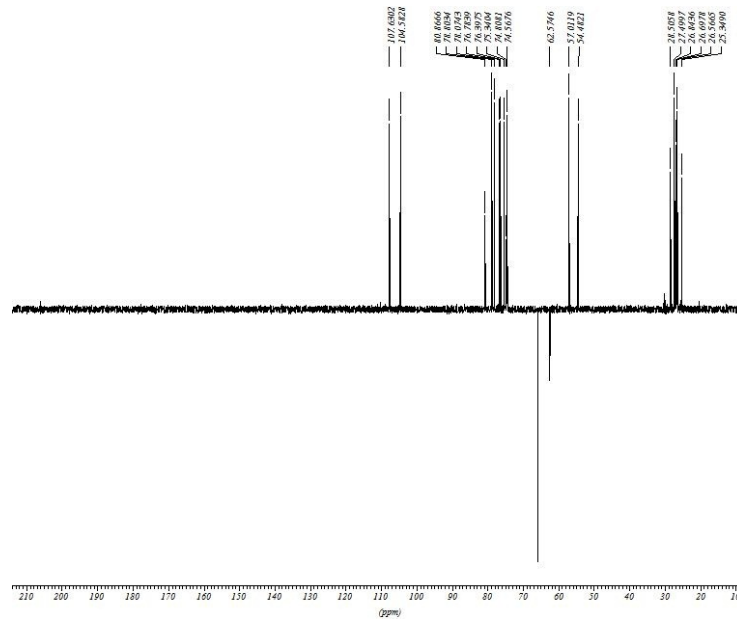


Figura 43. Spectrul DEPT 135 al 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei (acetona-d<sub>6</sub>).

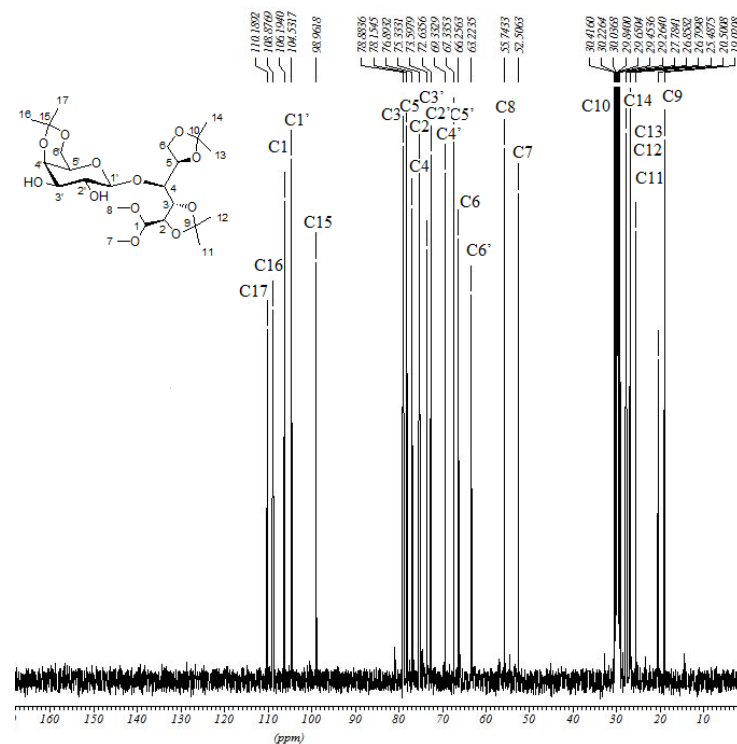


Figura 44. Spectrul <sup>13</sup>C-RMN al 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei (acetona-d<sub>6</sub>).

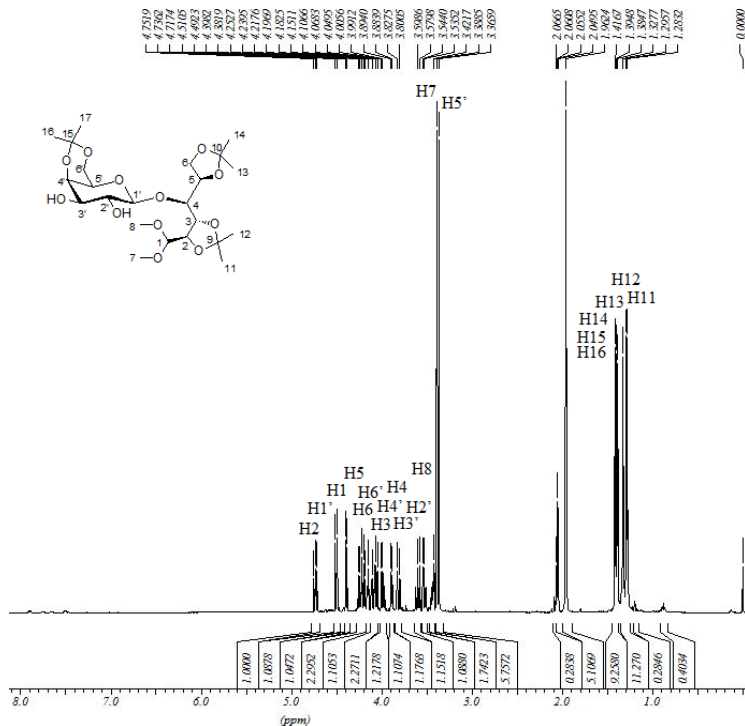


Figura 45. Spectrul <sup>1</sup>H-RMN al 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei (acetona-d6).

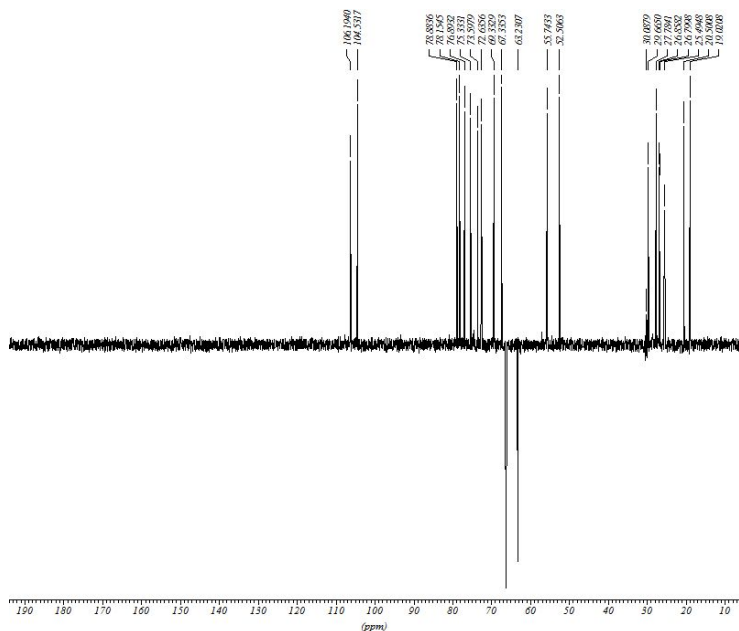


Figura 46. Spectrul DEPT 135 al 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei (acetona-d6).

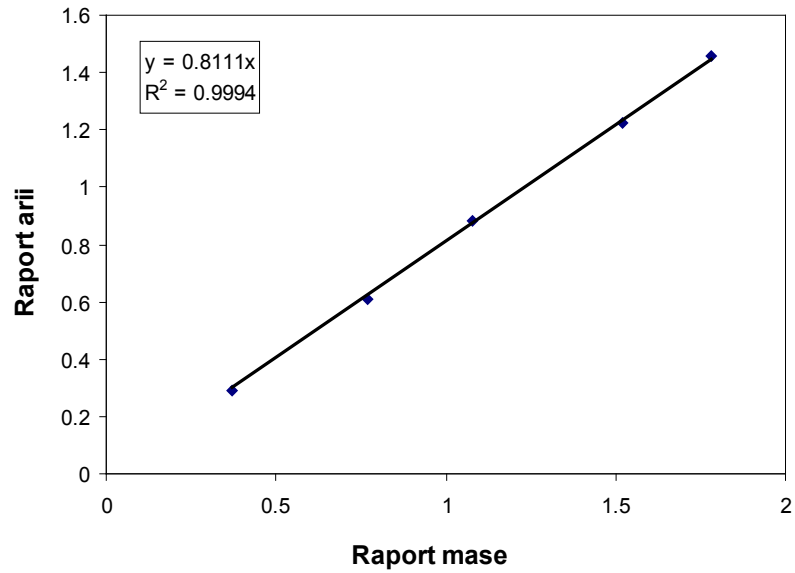


Figura 47. Dreapta de etalonare a lauratului de butil cu n-hexadecan în n-hexan (analiză gaz cromatografică).

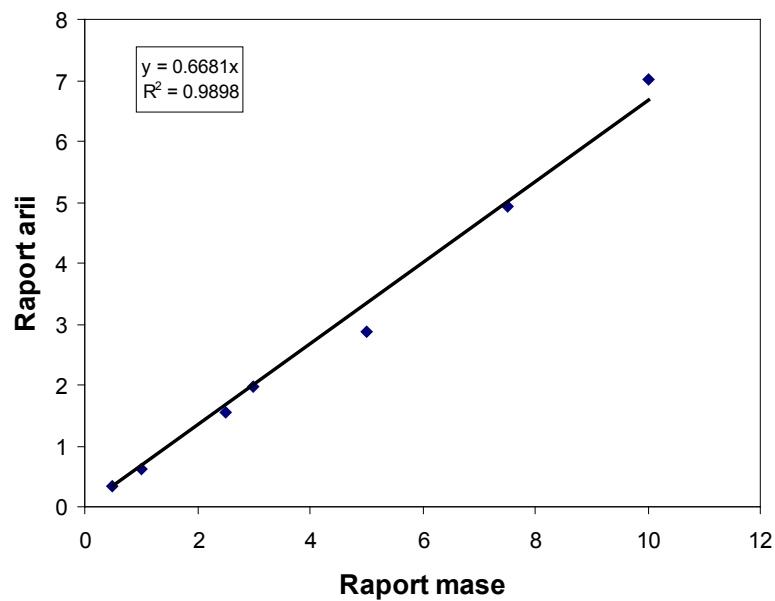


Figura 48. Dreapta de etalonare a 3-(4-hidroxifenil) propionatului de metil cu n-decosan în *terț*-butanol (analiză gaz cromatografică).

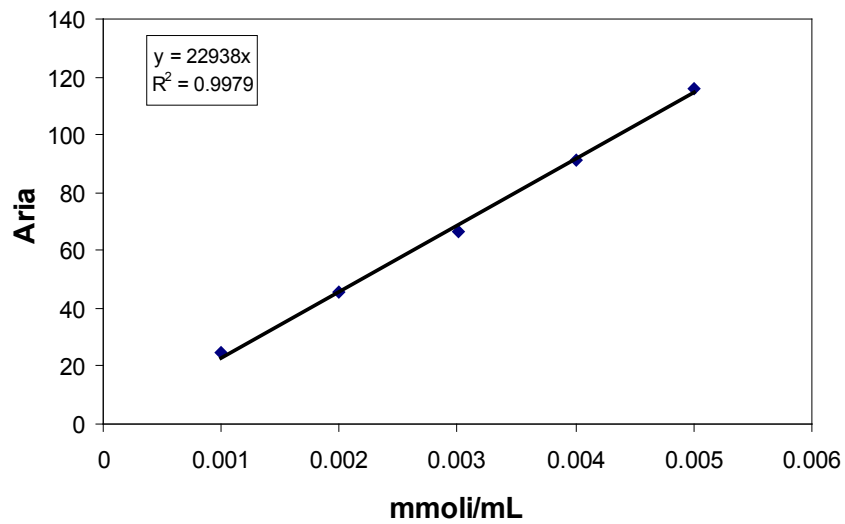


Figura 49. Dreapta de etalonare a acidului 3-(4-hidroxifenil) propionic în metanol (analiză HPLC la 220 nm).

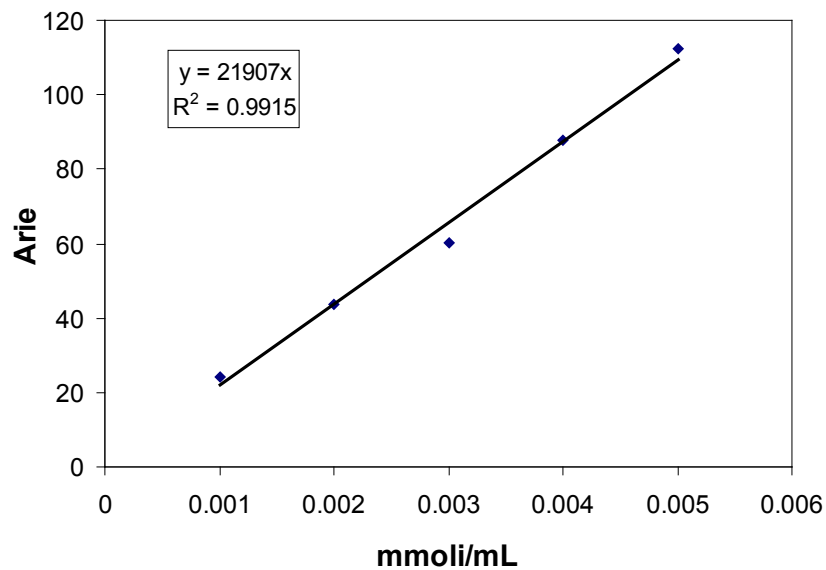


Figura 50. Dreapta de etalonare a 3-(4-hidroxifenil) propionatului de metil în metanol (analiză HPLC la 220 nm).

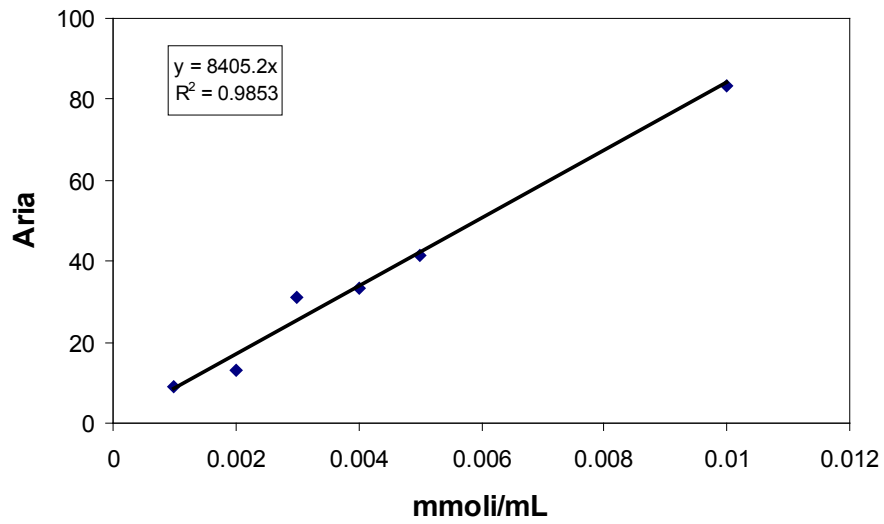


Figura 51. Dreapta de etalonare a 3-(4-hidroxifenil) propionatului de metil în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

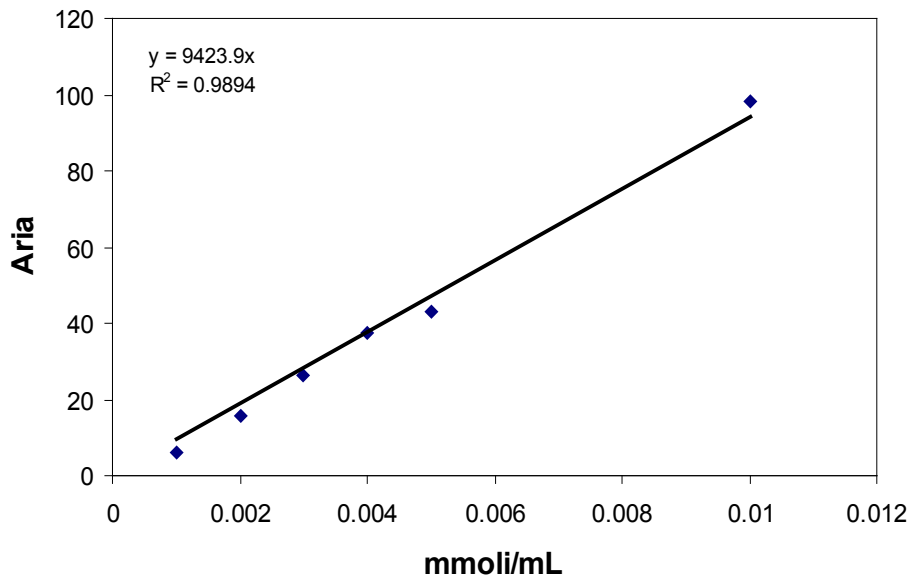


Figura 52. Dreapta de etalonare a acidului 3-(4-hidroxifenil) propionic în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

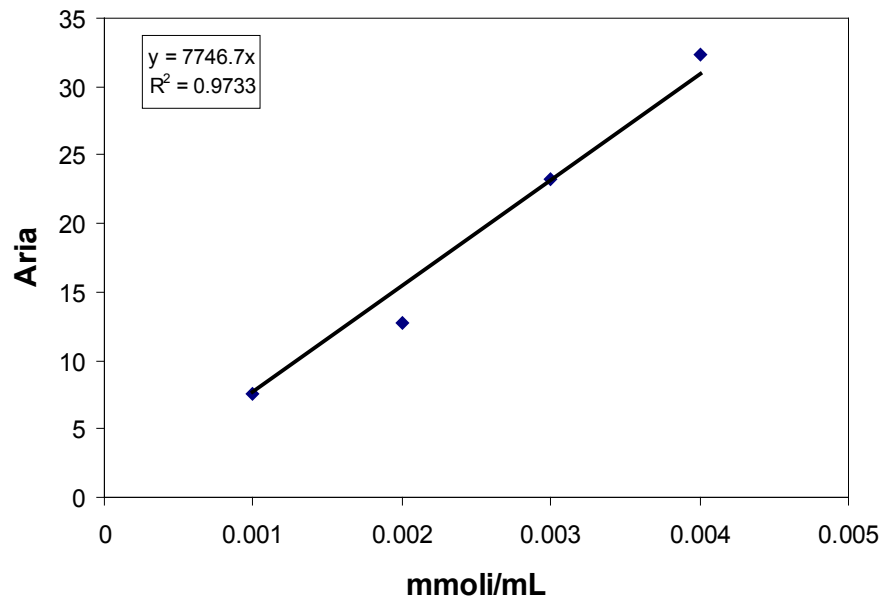


Figura 53. Dreapta de etalonare a 1-arabitol-3-(4-hidroxiifenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

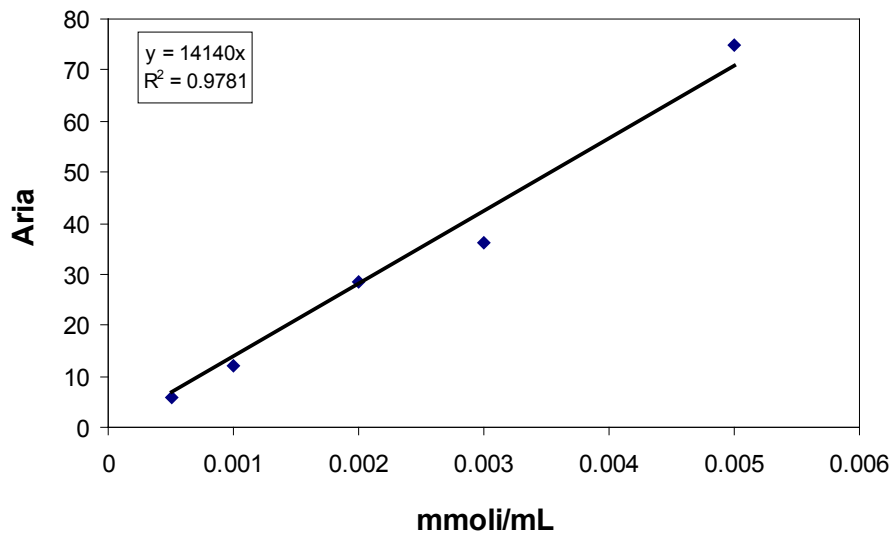


Figura 54. Dreapta de etalonare a 1,5-arabitol di-3-(4-hidroxiifenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).



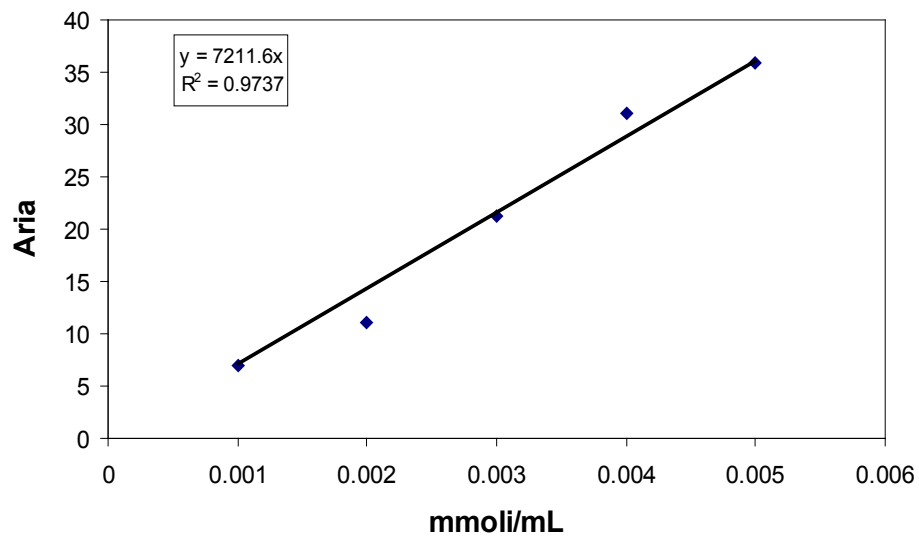


Figura 55. Dreapta de etalonare a 1-xilitil-3-(4-hidroxiifenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

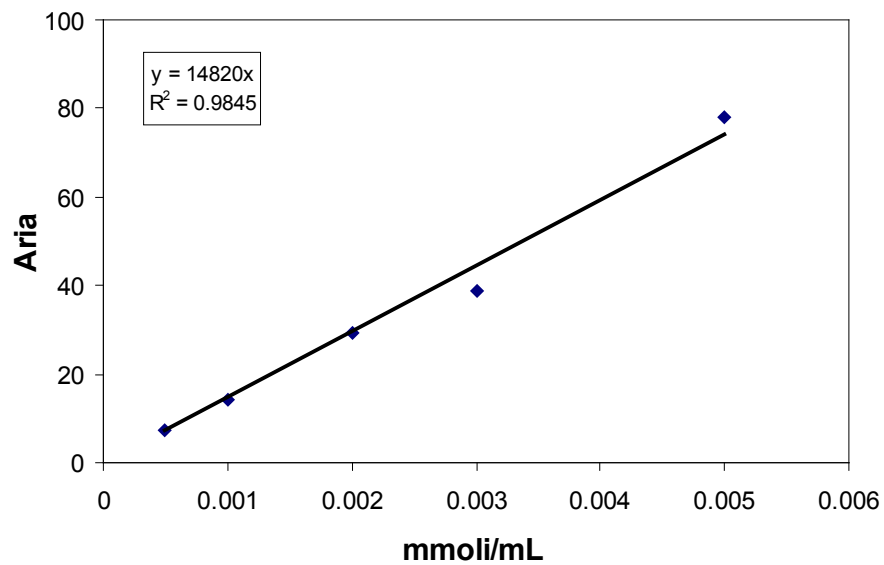


Figura 56. Dreapta de etalonare a 1,5-xilitil-di-3-(4-hidroxiifenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

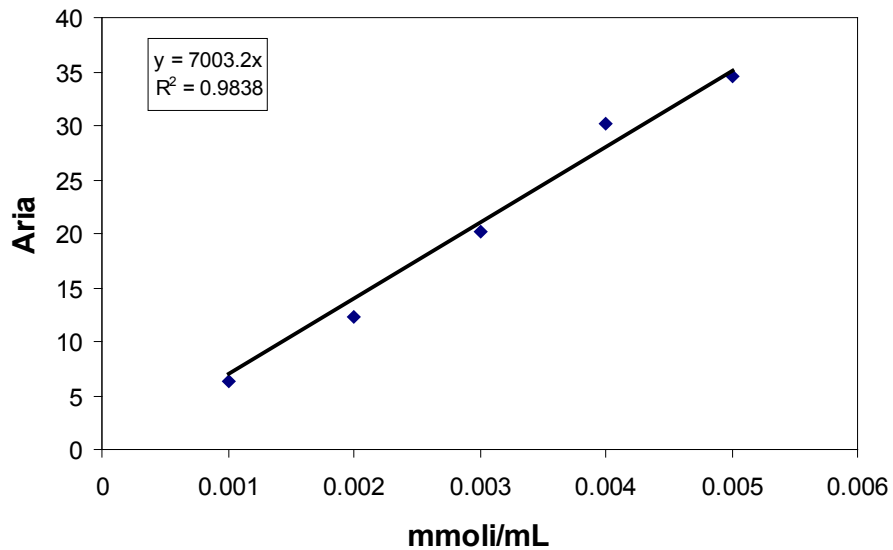


Figura 57. Dreapta de etalonare a 1-manitol-3-(4-hidroxfenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

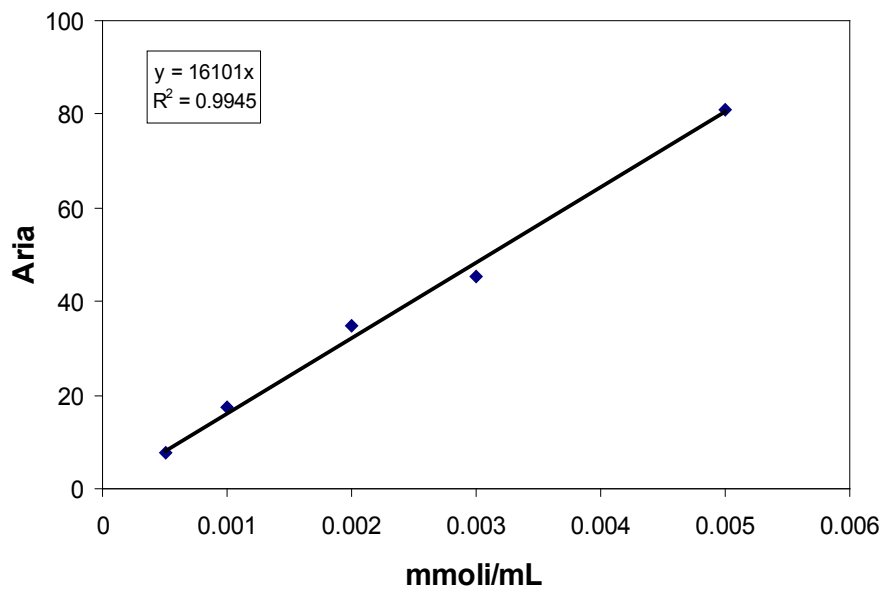


Figura 58. Dreapta de etalonare a 1,6-manitol-di-3-(4-hidroxfenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

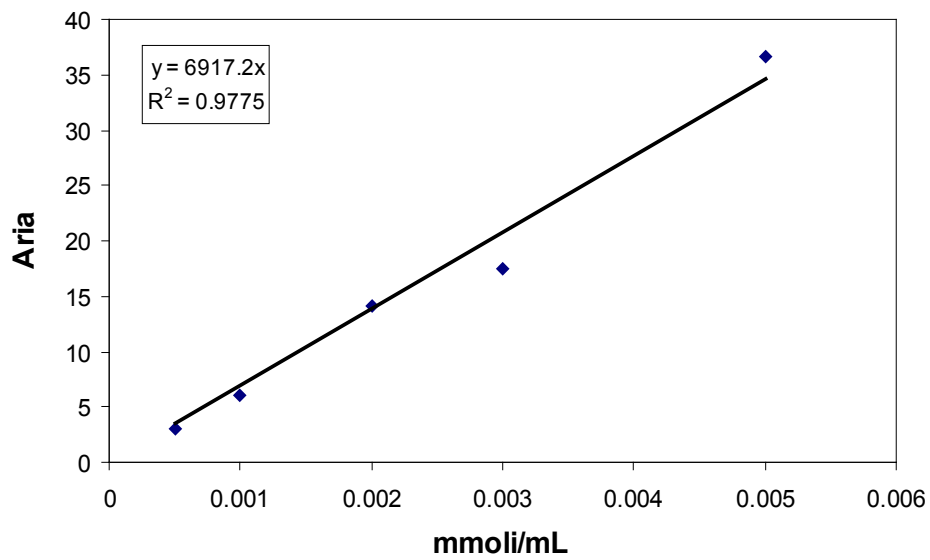


Figura 59. Dreapta de etalonare a 1-sorbitil-3-(4-hidroxifenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

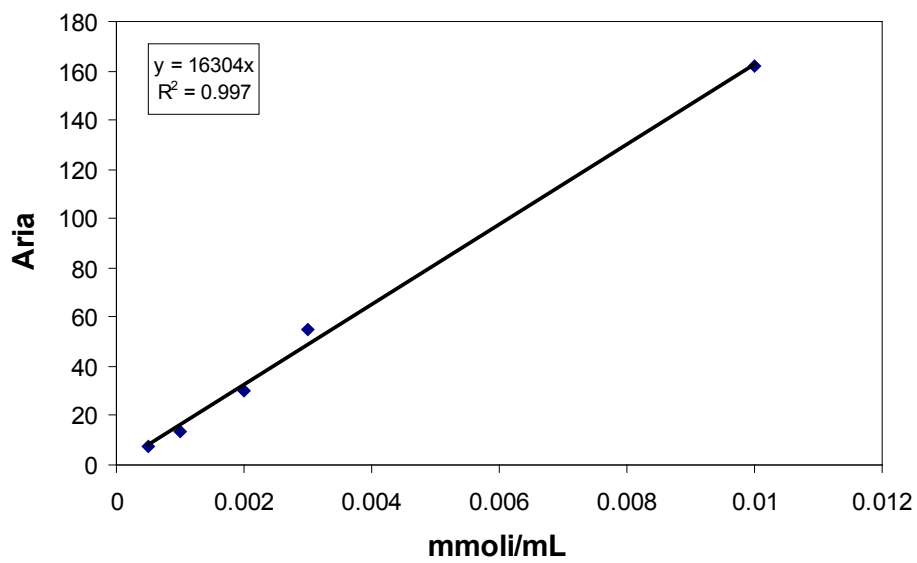


Figura 60. Dreapta de etalonare a 1,6-sorbitil-di-3(4-hidroxifenil)-propionatului în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

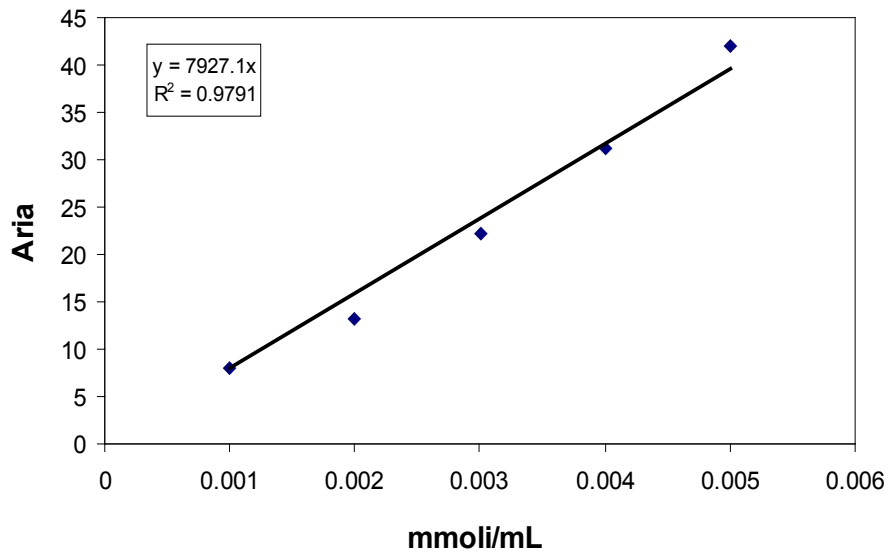


Figura 61. Dreapta de etalonare a 6-O-3(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\alpha$ -metil-glucoză în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

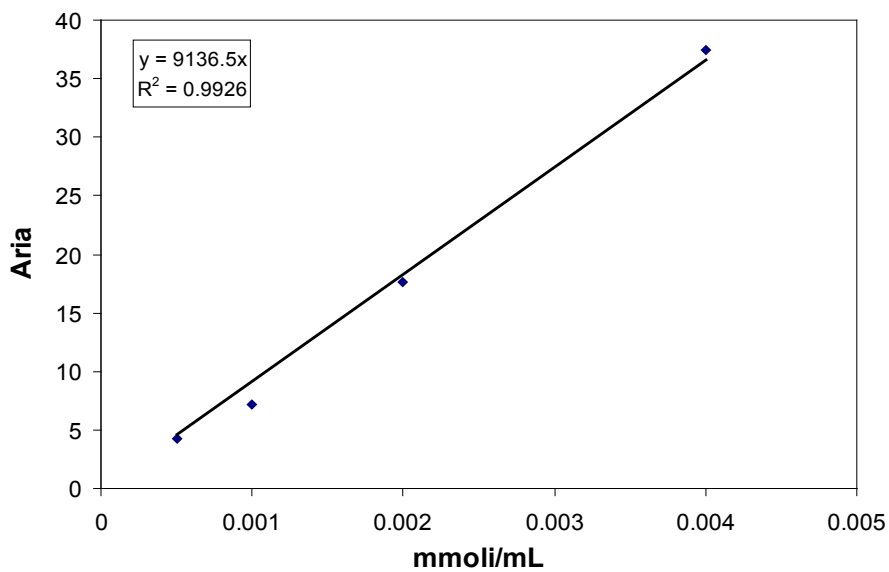


Figura 62. Dreapta de etalonare a 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de  $\beta$ -octil-glucoză în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

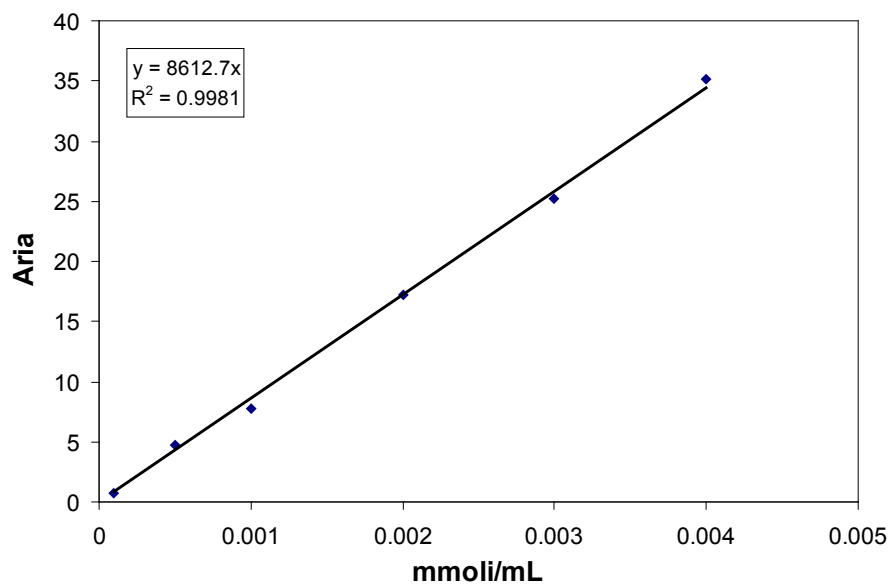


Figura 63. Dreapta de etalonare a 6-O-3(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză în metanol (analiză HPLC la 276 nm).

## LISTA DE LUCRĂRI

**Croitoru R.**, Van den Broek L. A. M., Frissen A., Davidescu C. M., Peter F., Boeriu C. G., Lipase Catalyzed Synthesis of Aromatic Esters of Sugar Alcohols, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2011, 76, pp 426-431, (citat în SCOPUS).

**Croitoru R.**, Fițigău F., Van den Broek L. A. M., Frissen A., Peter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., Biocatalytic acylation of sugar alcohols by 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid, *Process Biochemistry*, 2012, în curs de publicare.

Zarcu C., Corîci L., **Croitoru R.**, Ursoiu A., Peter F., Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during immobilization of lipase by the sol-gel method, *Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic*, 2010, 65 (1-4), pp 79-86.

### Lucrări prezentate la manifestări științifice

**Croitoru R.**, Paul C., Van den Broek L. A. M., Frissen A., Peter F., Boeriu C. G., Immobilized Sol-Gel Lipase Catalyst For Efficient Esterification, *Netherlands Biotechnology Congress, NBC-13*, Ede Wageningen, The Netherlands, 2010, p. 112.

**Croitoru R.**, Paul C., Van den Broek L. A. M., Frissen A., Peter F., Boeriu C. G., Ionic liquids as template compounds for sol-gel entrapment of lipases, *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, Romania, 2010, p. 39.

**Croitoru R.**, Paul C., Van den Broek L. A. M., Frissen A., Peter F., Boeriu C. G., Screening of Free and Sol-Gel Immobilized Lipases in Transesterification Reaction, *International Congress on Biocatalysis Hamburg, Biocat2010*, Germany, 2010, p. 143.

**Croitoru R.**, Van den Broek L. A. M., Frissen A., Davidescu C. M., Péter F., Boeriu C. G., Enzymatic synthesis of phenyl esters of polyhidric alcohols, *12th Edition of Timisoara's Academic Days, Chemistry*, Timișoara, Romania, 2011, p. 115.