



UNIUNEA EUROPEANĂ



GOVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL ÎNCALEZIRII, ENERGIEI  
PROTECTIEI SOCIALE ȘI  
PENSIONARILOR, VÂRSTNICIEI  
ȘI FAMILIEI



Fondul Social European  
Poziția 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
ȘI CERCETĂRII  
ȘTIINȚIFICE



**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala doctorală de Inginerie**



**TEZĂ DE DOCTORAT**  
**PROCESE DE BIOCONVERSIE**  
**PENTRU OBȚINEREA UNOR COMPUȘI**  
**ORGANICI BIOLOGIC ACTIVI**

**Doctorand,**  
**BOTEZ (GHINEA) Ioana Otilia**

**Conducător de doctorat, prof.dr.ing. BHRIM Gabriela-Elena**

**Seria I1: Biotehnologii Nr. 3**

**GALAȚI 2013**



**Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați**  
**Școala doctorală de Inginerie**



**TEZĂ DE DOCTORAT**

**PROCESE DE BIOCONVERSIE**

**PENTRU OBȚINEREA UNOR COMPUȘI ORGANICI  
BIOLOGIC ACTIVI**

**Doctorand,**  
**Ioana Otilia BOTEZ (GHINEA)**

**Conducător de doctorat, prof.dr.ing. Gabriela-Elena BAHRIM**

**Referent oficial, dr.chim. Martine DEMEUNYNCK**  
**Referent oficial, prof.univ.dr. Rodica-Simona OANCEA**  
**Referent oficial, conf.dr.chim. Rodica-Mihaela DINICĂ**

**Seria I1: Biotehnologii Nr. 3**

**GALAȚI 2013**

Seriile tezelor de doctorat sustinute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

**Domeniul ȘTIINȚE INGINEREȘTI**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

**Domeniul ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

**Domeniul ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie- Engleză**

Seria U 2: **Filologie- Română**

Seria U 3: **Istorie**



**ROMÂNIA**  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE

26345/23.10.2013

Către \_\_\_\_\_

Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați vă face cunoscut că, în data de \_\_\_\_\_ ora \_\_\_\_\_, în \_\_\_\_\_, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: „PROCESE DE BIOCONVERSIE PENTRU OBTINEREA UNOR COMPUȘI ORGANICI BIOLOGIC ACTIVI”, elaborată de doamna/domnul BOTEZ IOANA-OTILIA (GHINEA), în vederea conferirii titlului științific de doctor în domeniul de doctorat **Biotehnologii**.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- Președinte** Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
- Conducător de doctorat** Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHIRM  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
- Referent oficial** Director de cercetare dr.chim.Martine DEMEUNYNCK  
Université Joseph Fourier, Grenoble, Franța
- Referent oficial** Prof.univ.dr. Rodica-Simona OANCEA  
Universitatea „Lucian Blaga” din Sibiu
- Referent oficial** Conf.univ.dr.chim. Rodica-Mihaela DINICĂ  
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat, și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa universității, str. Domnească nr. 47, 800008 Galați, Fax 0236 / 461353, e-mail rectorat@ugal.ro.

Rector,

Prof. univ. dr. ing. Iulian Gabriel BÎRSAN





UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI  
PROTECȚIEI VÂRSTNICI ȘI  
AFOURORUFondul Social European  
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale  
2007-2013MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
OPSDREUUNIVERSITATEA  
GALATIENSIS

Teza de doctorat a fost elaborată cu sprijinul financiar acordat de către proiectul **POSDRU /107/1.5/S/76822, ID proiect: 76822, "Calitatea și continuitatea formării în cadrul ciclului de studii doctorale"-TOP ACADEMIC**, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007–2013, perioada de implementare: 1 octombrie 2010 – 30 septembrie 2013, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

## Mulțumiri

Pe parcursul celor trei ani care au condus la elaborarea acestei teze de doctorat am găsit în îndrumătorul științific, doamna **prof.dr.ing. Gabriela Bahrim**, un sprijin permanent, un profesor cu o etică și capacitate de muncă ireproșabile, demne de toată recunoștința.

Orele petrecute în laborator ar fi fost mai lungi dacă nu aș fi beneficiat de experiența, răbdarea și căldura sufletească oferite de doamna **conf.dr.chim. Rodica Dinică** și doamna **dr.chim. Martine Demeunynck**, care au avut grijă ca de fiecare dată să văd mai limpede și să nu îmi uit scopul.

Adresez sincere mulțumiri doamnelor **prof.dr.chim. Geta Cârâc** și **conf.dr.ing. Luminița Georgescu**, membri ai comisiei de îndrumare a tezei de doctorat, pentru aprecierile și recomandările valoroase, care au contribuit la conturarea prezentei lucrări.

Doamna **prof.dr. Rodica Simona Oancea** onorează această teza de doctorat prin calitatea de referent oficial, și țin să îi adresez mulțumiri.

Această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără ajutorul esențial al **dr.ing. Georgiana Parfene (Horincar)** și **drd.chim. Simon Bonte**, cărora le sunt recunoscătoare și îndatorată.

Nenumărați oameni deosebiți au contribuit la formarea mea personală și profesională pe parcursul ultimilor trei ani: **ș.l.dr.chim. Bianca Furdui**, **dr.chim. Eric Peyrin**, **dr.chim. Jean-Luc Decout**, **dr.chim. Isabelle Baussanne**, **ing. Atena Bîrlădeanu**, **tehn. Mihaela Dumitriu**, **dr.ing. Svetlana Laura Leonov (Iancu)**, **conf.dr.ing. Aida Vasile**, **ș.l.dr.chim. Mihaela Timofti**, **prep.drd.ing. Oana Nistor**, **drd. Elena Ioniță**, colega mea de suferință **drd.biol. Claudia Popa (Ungureanu)** și mulți alții, pe care îi apreciez enorm.

Fără dragostea necondiționată a **familiei mele**, acest moment ar fi fost imposibil de imaginat. Ei mi-au fost sprijin moral și fizic în suișurile și coborâșurile acestei călătorii. Vă iubesc! Ca orice drum lung, au fost și bune, și rele, dar toate se suportă mai ușor dacă știi pentru cine lupți.

Vă mulțumesc!

Drd.chim. Ioana Otilia Botez (Ghinea)

Galați, 06.12.2013

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

### I. STUDIUL DOCUMENTAR

<b>1.Reacții de cicloadiție</b> .....	2
1.1.Clasificare .....	2
1.2.Reacții de cicloadiție 1,3-dipolară .....	3
1.2.1.Dipoli (cicloimoniu-ilide) .....	4
1.2.2.Dipolarofili (alchene, alchine) .....	6
<b>2.Compuși cu structură indolizinică</b> .....	7
2.1.Structură și metode de obținere.....	7
2.2.Importanța practică .....	10
<b>3.Procese ecoeficiente de biocataliză</b> .....	11
3.1.Biocatalizatori comerciali .....	11
3.2.Biocatalizatori obținuți în laborator.....	13
<b>4.Determinarea activității biologice a compușilor organici</b> .....	15
4.1.Activitatea antimicrobiană.....	15
4.1.1.Metode de determinare a activității antimicrobiene .....	15
4.1.2.Activitatea antimicrobiană a sărurilor cuaternare de amoniu .....	16
4.2.Activitatea antioxidantă.....	17
4.2.1.Metode de determinare a activității antioxidante .....	18
4.2.2.Activitatea antioxidantă a sărurilor cuaternare de amoniu și a compușilor indolizinici .....	19
4.3.Activitatea anti-acetilcolinesterazică .....	20
4.3.1.Metode de obținere a acetilcolinesterazei pentru studii <i>in vitro</i> .....	20
4.3.2.Metode de determinare a activității anti-acetilcolinesterazice .....	21
4.3.3.Compuși cu activitate anti-acetilcolinesterazică .....	21

### II. PARTEA EXPERIMENTALĂ

<b>5.Obținerea precursorilor indolizinici</b> .....	25
5.1.Introducere .....	25
5.2.Obiectivele studiului.....	25
5.3.Materiale și metode de investigare .....	26

5.3.1. Materiale .....	26
5.3.2. Metode de sinteză a compușilor obținuți .....	27
5.3.3. Metode utilizate în evaluarea reacțiilor și analiza compușilor obținuți .....	39
5.4. Rezultate și discuții .....	41
5.4.1. Obținerea unor sărurilor cuaternare de piridiniu .....	42
5.4.2. Obținerea unor alchine .....	63
5.5. Concluzii parțiale .....	68
<b>6. Obținerea unor derivați indolizini prin biocataliză .....</b>	<b>69</b>
6.1. Introducere .....	69
6.2. Obiectivele studiului .....	69
6.3. Materiale și metode de investigare .....	70
6.3.1. Materiale .....	70
6.3.2. Metode de selecție și obținere a biocatalizatorilor .....	71
6.3.3. Metode de obținere a derivaților indolizini prin biocataliză .....	74
6.3.4. Metode de modelare matematică și analiză statistică a datelor experimentale .....	75
6.4. Rezultate și discuții .....	75
6.4.1. Selecția microorganismelor cu potențial biocatalitic ....	75
6.4.2. Evaluarea potențialului biocatalitic al tulpinilor selecționate .....	78
Studiul tulpinilor fungice .....	78
Studiul bacteriei psihrofile <i>Pseudomonas fluorescens</i> MP11 .....	85
6.4.3. Optimizarea biocatalizatorului și a condițiilor optime de biocataliză prin modelare matematică și metode de analiză statistică .....	88
6.4.4. Obținerea unor derivați indolizini prin biotransformare, în condițiile optimizate prin modelare matematică .....	115
6.5. Concluzii parțiale .....	124
<b>7. Activitatea biologică a compușilor obținuți .....</b>	<b>126</b>
7.1. Introducere .....	126
7.2. Obiectivele studiului .....	126
7.3. Materiale și metode de investigare .....	127
7.3.1. Materiale .....	127
7.3.3. Metode de evaluare a activității biologice .....	128
7.4. Rezultate și discuții .....	130



7.4.1.Evaluarea activității antimicrobiene a compușilor organici obținuți .....	130
7.4.2.Analiza activității antioxidante a compușilor organici obținuți.....	132
7.4.3.Activitatea anti-acetilcolinesterazică a compușilor organici obținuți.....	155
7.5.Concluzii parțiale .....	161

### **III. Concluzii generale, contribuții originale și perspective**

8. Concluzii generale.....	164
9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii și perspective de continuare a cercetărilor.....	167

### **IV. Referințe bibliografice .....**

### **V. Diseminarea rezultatelor cercetărilor.....**

## Introducere

În ultima jumătate de secol, motivația specialiștilor în domeniul chimiei organice s-a modificat semnificativ, de la dorința de a obține pe orice cale diverși compuși cu structuri cât mai complexe, la atenția pentru aplicațiile acestora și pentru condițiile în care se desfășoară reacțiile chimice. Astfel, domenii precum chimia terapeutică, care are ca scop identificarea moleculelor cu activitate biologică remarcabilă, și chimia verde, ce are ca deziderat reducerea impactului asupra mediului, au cunoscut o dezvoltare fără precedent.

Biocataliza reprezintă utilizarea catalizatorilor obținuți din surse biologice, precum celule întregi sau enzime, pentru a realiza transformări chimice. Implicarea enzimelor în sinteza organică a câștigat importanță în cea de-a doua jumătate a secolului XX, iar evenimente precum apariția tehnologiei ADN recombinant și dezvoltarea evoluției direcționate au adus biocatalizatorii în laboratoarele de chimie organică și de biotehnologie, unde utilizarea acestora a fost supranumită „biotehnologie albă” (engl. white biochemistry) (Reetz 2013). Biocatalizatorii sunt obținuți din surse regenerabile și sunt utilizați în practică, pentru a cataliza reacții ce se desfășoară cu viteză mare, cu consum redus de energie și în condiții blânde de procesare, pentru obținerea de bioderivați cu inocuitate ridicată, în condiții de siguranță pentru mediul înconjurător și ființele vii.

Reacțiile de cicloadiție sunt utilizate în obținerea heterocicurilor cu structuri diverse. Indolizinele reprezintă o clasă de compuși heteroaromatici cu două cicluri condensate, a câte cinci respectiv șase atomi, având un atom de azot în comun. Aceasta clasă de compuși prezintă un interes deosebit pentru numeroase grupuri de cercetători, datorită proprietăților fluorescente dar și a activității biologice prezentate de compușii izolați până în prezent. Astfel, unele indolizine au activitate antiinflamatorie, antivirală, antioxidantă, fiind vizate pentru a trata cancerul, bolile cardiovasculare și infecțiile cu virusul HIV (Shen 2010).

Compușii indolizिनici pot fi obținuți în etape, alchilând azotul piridinei, bipiridilului sau altor derivați, sarea cuaternară de piridiniu obținută fiind ulterior pusă în reacție cu alchena sau alchina dorită. Cercetările au indicat că sărurile cuaternare de piridiniu, precum și sărurile biscuaternare au numeroase proprietăți antibacteriene cu spectru larg, inclusiv împotriva unor tulpini de *Staphylococcus aureus*, rezistente la meticilină sau

*Enterococcus faecalis*, rezistente la vancomicină (Pernak 2001, Chanawanno 2010).

Aceste reacții se desfășoară la temperaturi înalte și sunt adesea promovate de oxidanți precum  $\text{CrO}_3$ , tetrakispiridincobalt (II) dicromat sau  $\text{MnO}_2$  și de baze, cum ar fi trietilamina sau carbonatul de potasiu. Reacțiile se pot desfășura în solvenți nocivi precum N, N'-dimetilformamida, N-metilpirolidonă, 1,2-epoxipropan, tetrahidrofuran (Liu 2010, Georgescu 2009, Wang 2006, Furdul 2006, Rotaru 2005, Wu 2003,). De asemenea, reacția se poate desfășura ca o reacție multicomponent, adăugând simultan în mediul de reacție heterociclul, agentul alchilant - un derivat halogenat și dipolarofilul - o alchenă sau o alchină.

Teza de doctorat intitulată „**Procese de biotransformare pentru obținerea unor compuși organici biologic activi**” a urmărit identificarea unor noi căi de sinteză și biosinteză eficiente și a unor biocatalizatori (enzime comerciale și culturi de microorganisme selecționate) pentru a obține derivați indolizini și precursori ai acestora. După obținerea, purificarea și caracterizarea acestora, s-a testat activitatea biologică, realizând studii pentru determinarea activității antimicrobiene, antioxidante și anti-acetilcolinesterazice.

Obiectivele științifice vizate au fost următoarele:

- Identificarea unor metode eficiente, neconvenționale, în domeniul chimiei verzi, pentru a obține precursori indolizini: săruri cuaternare de amoniu și alchine activate prin grupări atrăgătoare de electroni.
- Identificarea și selecția unor biocatalizatori (enzime comerciale și culturi de microorganisme) și studiul condițiilor de biotransformare pentru obținerea unor derivați indolizini cu puritate ridicată.
- Evaluarea activității biologice a compușilor organici obținuți (activitatea antimicrobiană, antioxidantă și anti-acetilcolinesterazică), prin patru metode moderne de analiză, pentru a putea contura cât mai bine potențialele aplicații ale acestora.

Pentru îndeplinirea activităților de cercetare prevăzute în programul de studii doctorale, în acord cu obiectivele științifice formulate, s-a utilizat infrastructura laboratoarelor:

- Centrul integrat de cercetare și formare pentru biotehnologie aplicată în industria alimentară, Platforma Bioaliment ([www.bioaliment.ugal.ro](http://www.bioaliment.ugal.ro)), Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos, Galați, România.
- Laboratoarele Facultății de Științe și Mediu, Universitatea Dunărea de Jos. Galați, România.
- Laboratoarele Departamentului de Farmacochimie Moleculară, Universitatea Joseph Fourier, Grenoble, Franța.

Studiile doctorale au fost susținute financiar de Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane **POSDRU/107/1.5/S/76822 - Calitatea si continuitatea formarii in cadrul ciclului de studii doctorale - TOP ACADEMIC.**

*Teza de doctorat conține 177 pagini, în care sunt incluse 30 de scheme de reacție, 8 scheme-bloc, 88 de figuri și 33 de tabele. Studiul documentar reprezintă 15% iar partea experimentală 85%.*

Teza de doctorat cuprinde cinci secțiuni, **Studiul documentar; Partea experimentală; Concluzii generale; Contribuții originale și perspective; Referințe bibliografice și Diseminarea rezultatelor cercetării.**

**I. STUDIUL DOCUMENTAR** cuprinde 4 capitole în care se prezintă stadiul actual al realizărilor științifice și aplicative în ceea ce privește metodele de obținere și aplicațiile precursorilor și derivaților indolizini și metodele moderne de determinare a activității biologice a compușilor organici. De asemenea, sunt prezentate și date din literatura de specialitate cu privire la activitatea biologică a compușilor organici cu structuri asemănătoare cu cele ale compușilor obținuți în cadrul studiilor experimentale. În lipsa lucrărilor științifice cu privire la obținerea indolizinelor prin biocataliză, se exemplifică diverse procese generale de biotransformare, particularizându-se prin reacții variate biocatalizate, utilizând fie preparate enzimatic brută fie enzime comerciale.

**Capitolul 1**, intitulat **Reacții de cicloadiție**, cuprinde clasificarea acestor tipuri de reacții, precum și detalii asupra reacțiilor de cicloadiție 1,3-dipolare, tipul de reacție de cicloadiție prin care se urmărește obținerea derivaților indolizini. Sunt prezentate de asemenea metode de obținere a

dipolilor-1,3 - cicloimoniu-ilidele și dipolarofililor corespunzători - alchine sau alchene activate prin grupări atrăgătoare de electroni.

**Capitolul 2**, intitulat **Compuși cu structură indolizinică**, este structurat în 2 subcapitole care se referă la structura, metodele de obținere și importanța practică a indolizinelor studiate până în prezent. În acest capitol sunt prezentate mai multe căi de sinteză urmate de diverși cercetători, punându-se în evidență laturile nocive pentru mediu și sănătate cum ar fi solvenții toxici sau utilizarea catalizatorilor costisitori, obținuți din surse neregenerabile sau consumul ridicat de energie datorat utilizării unor temperaturi ridicate, aceste aspecte fiind preluate din lucrările științifice publicate anterior acestui studiu. De asemenea, este prezentată importanța practică a compușilor sintetizați, punându-se accent pe studiile în care s-a demonstrat activitatea biologică a derivaților indolizinici.

**Capitolul 3** se intitulează **Procese ecoeficiente de biocataliză**. În acest capitol sunt prezentate diverse reacții de biotransformare, în urma cărora se obțin compuși organici cu structuri organice foarte variate. În acest mod s-a evidențiat faptul că biocataliza poate conduce la noi compuși ce nu pot fi obținuți pe căi clasice de cataliză, dar și la obținerea unor noi compuși, în condiții blânde de reacție, utilizând catalizatori obținuți din surse regenerabile. Literatura de specialitate nu include lucrări științifice în care derivații indolizinici să se obțină prin biotransformare. Dealtfel, în literatură nu există referințe cu privire la reacții de cicloadiție 1,3-dipolare realizate prin biotransformare.

**Capitolul 4**, intitulat **Determinarea activității biologice a compușilor organici**, cuprinde 3 subcapitole și include o trecere în revistă a metodelor descrise în literatura de specialitate, cu privire la determinarea activității antimicrobiene, antioxidante și anti-acetilcolinesterazice. De asemenea, este prezentată activitatea antimicrobiană și antioxidantă a unor compuși organici cu structură similară celor obținuți în cadrul studiilor experimentale, precum și activitatea anti-acetilcolinesterazică a unor compuși cunoscuți ca având activitate anti-acetilcolinesterazică, considerați de referință.

**II. PARTEA EXPERIMENTALĂ** cuprinde trei capitole ce prezintă desfășurarea și rezultatele studiilor experimentale, incluzând subcapitole ce descriu obiectivele științifice, materialele și metodele de investigare, rezultatele și discuțiile precum și concluziile parțiale ale fiecărui capitol.

**Capitolul 5, Obținerea precursorilor indoliziniici**, prezintă studiul experimental realizat cu scopul de a obține compuși organici ce ar putea fi utilizați ca precursori ai derivaților indoliziniici, și anume două clase de compuși: săruri cuaternare de piridiniu și alchine activate.

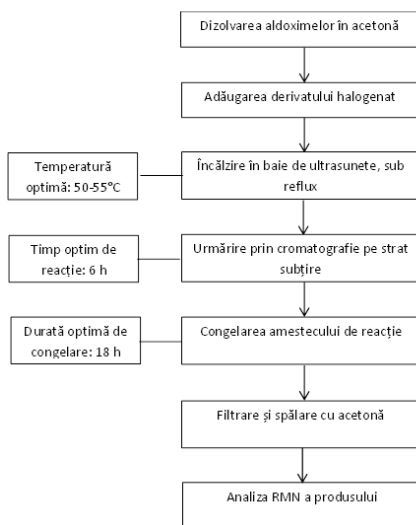
Obiectivele științifice vizate au fost următoarele:

- Obținerea de noi sintoni pentru reacții de cicloadiție (de tipul sărurilor cuaternare de piridiniu și alchine activate), prin reacții clasice sau biocatalizate.
- Identificarea unor metode noi în scopul creșterii randamentului reacțiilor cunoscute în literatură, creșterea eficienței economice, conducerea proceselor la o temperatură mai redusă, într-un timp mai scurt, folosind solvenți cu toxicitatea scăzută.

Metodele de investigare abordate au fost:

- Sinteze chimice clasice și biocatalizate: realizate în diverși solvenți, sub tratament termic convențional dar și neconvențional, prin activare cu microunde și ultrasunete;
- Metode cromatografice: cromatografie pe strat subțire (TLC), cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC);
- Metode spectrale: spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară, spectrometrie de masă, spectrometrie în domeniul IR.

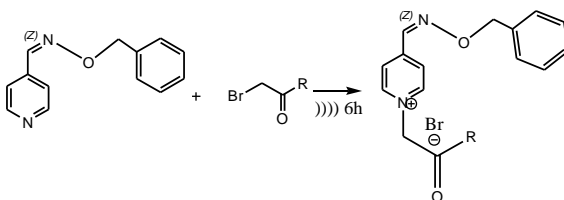
Schema procedurii generale de N-alkilare prin activare cu ultrasunete



**Schema 1.** Procedura generală de N-alkilare (obținere a sărurilor de piridiniu) prin activare cu ultrasunete

În ceea ce privește sărurile cuaternare de piridiniu, sunt prezentate căile de sinteză urmate pentru a obține acești compuși într-un timp mai scurt, într-un solvent mai puțin nociv, la temperatură mai redusă, cu o mai mare puritate și cu un randament bun, comparativ cu rezultatele descrise în literatura de specialitate. S-a identificat o metodă optimă, ce implică activarea prin intermediul ultrasunetelor, ce s-a utilizat pentru a obține 12 săruri cuaternare de amoniu, prezentată în schema 1.

Utilizând această metodă au fost preparați 12 compuși, utilizând reacția chimică prezentată în schema 2.



R:  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{OCH}_3$

**Schema 2.** Reacția activată de ultrasunete dintre 4-piridin-aldoxima (O-benzil) și derivați halogenați reactivi

În subcapitolul *Obținerea unor alchine activate* s-a prezentat modul în care s-a realizat selecția unor biocatalizatori comerciali și a condițiilor de biotransformare precum alegerea solventului, modul de agitare și timpul și temperatura de reacție, obținându-se prin biocataliză trei compuși.

Prin metode de cataliză clasică, reacția de formare a alchinelor activate vizate conduce la obținerea unui amestec de multipli subproduși, ce nu pot fi izolați, după cum se poate observa din figura 1.

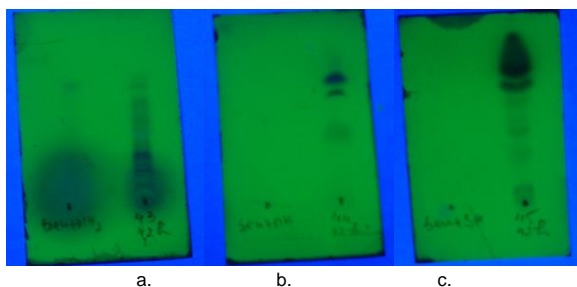
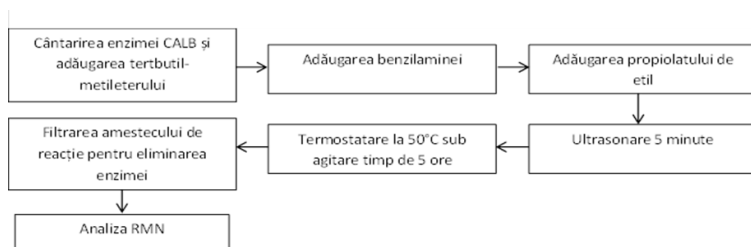


Fig. 1. Cromatograme pe strat subțire. Produși detectați după 42 ore de reacție a propiolatului de etil cu: a. benzilamina; b. alcoolul benzilic; c. benzilmercaptan.

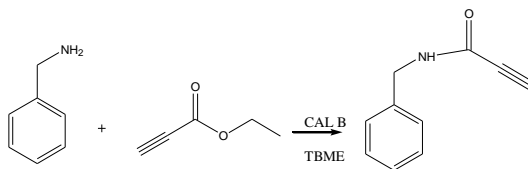
În schema 3 se exemplifică metoda biocatalitică de obținere a benzilpropiolamidei, cu o bioconversie de 90 %.



Schema 3. Procedul optim de obținere a benzilpropiolamidei prin biocataliză

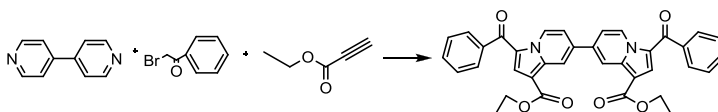
Benzilpropiolamida este obținută conform reacției prezentate în schema 4.





**Schema 4.** Obținerea benzilpropionamidei din benzilamină și propionat de etil

**Capitolul 6, Obținerea unor derivați indoliziniici prin biocataliză,** include rezultatele obținute utilizându-se reacția model de obținere a derivatului indolizinic, 1,1'-diethyl-dicarboxilat-3,3'-benzoi-7,7'-bis(indolizina) (schema 5).



**Schema 5.** Reacția model de obținere a 1,1'-diethyl-dicarboxilat-3,3'-benzoi-7,7'-bis(indolizinei)

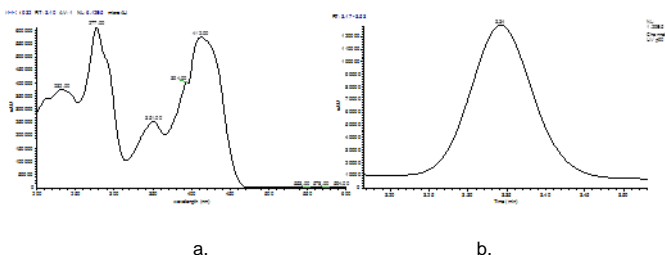
Obiectivele științifice vizate au fost următoarele:

- Selecția a șase tulpini de bacterii, nouă tulpini de drozii și șase tulpini de mucegaiuri, din Colecția de microorganisme a Platformei de cercetare și formare Bioaliment (indicativ MIUG), ca potențiali biocatalizatori ai reacției model.
- Studiul condițiilor de biotransformare utilizând preparate enzimatiche în stare brută (biomasă, lichid cultural și cultură integrală) pentru obținerea unor compuși indoliziniici.
- Testarea eficienței biocatalizatorilor în condiții diferite de cultivare și de reacție, stabilindu-se astfel parametrii ce au influență asupra biotransformării.
- Optimizarea procesului de biocataliză prin modelare matematică și analiză statistică, utilizând modelul Plackett-Burman.
- Identificarea celui mai eficient biocatalizator și condițiilor optime de reacție pentru a obține derivați indoliziniici.

Metodele de investigare, de modelare matematică și interpretare statistică a datelor experimentale au fost:

- Metode microbiologice: cultivarea microorganismelor (bacterii și fungi) în sistem solid și submers, cu aerare și agitare, obținerea unor preparate enzimactice brute (mediu fermentat, biomasă și lichid cultural).
- Metode de investigare chimică, cromatografie HPLC, cromatografie TLC.
- Metode de modelare matematică și statistică: design al experimentelor prin metoda Plackett-Burmann, cu două nivele de variație al fiecărei dintre cele șapte variabile independente (programul Design Expert 8.0).

Compusul obținut a fost pus în evidență datorită fluorescenței sale puternice.



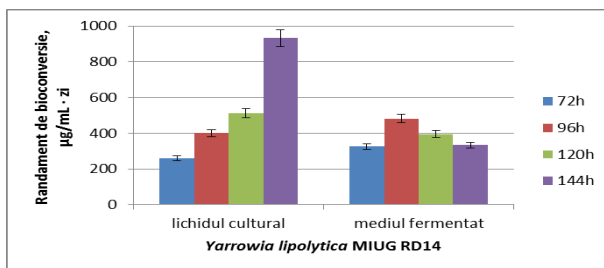
**Fig. 2.** Spectrul UV-vis (a) și cromatograma HPLC (b) ale 1,1'-diethylcarboxilat-3,3'-benzoil-7,7'-bis(indolizinei)

În figura 2 sunt prezentate peak-ul din cromatograma HPLC corespunzător indolizinei obținute din reacția model, precum și spectrul său UV-vis, caracteristic indolizinelor, cu maxime multiple.

Etapile cercetării au fost structurate după cum urmează:

*Selecția microorganismelor cu potențial biocatalitic* pentru procesele chimice analizate. Procesul de selecție a 21 de tulpini microbiene din Colecția de microorganisme MIUG s-a realizat pe baza toxicității reactanților reacției model, și are ca rezultat identificarea a patru tulpini fungice cu potențial biocatalitic (*Yarrowia lipolytica* RD14 MIUG, *Yarrowia lipolytica* RD15 MIUG, *Yarrowia lipolytica* RD16 MIUG, *Geotrichum candidum* MIUG 27).

*Evaluarea potențialului biocatalitic al tulpinilor selecționate* prezintă obținerea unor preparate enzimactice brute în urma cultivării celor patru tulpinilor fungice selecționate și utilizarea acestora ca biocatalizatori ai reacției model. Sunt prezentate comparativ rezultatele privind potențialul biocatalitic al preparatelor brute, obținute cu culturile fungice selecționate în condițiile biotehnologice descrise anterior. S-a analizat performanța lichidelor culturale și a mediilor fermentate, făcând raportarea la cantitatea de indolizină obținută pe mL de biocatalizator, dar și a mediilor fermentate și biomaselor, făcând raportarea la cantitatea de indolizină obținută pe mg substanță uscată.



**Fig. 3.** Capacitatea biocatalitică a lichidului cultural și mediului fermentat obținut prin cultivare submersă cu agitare și aerare a tulpinii *Yarrowia lipolytica* MIUG RD14

Pentru exemplificare, se prezintă figura 3., în care se observă randamentul de bioconversie al celui mai performant biocatalizator din acest subcapitol. Este vorba despre lichidul cultural produs de *Y. lipolytica* MIUG RD14 obținut după șase zile de cultivare în sistem submers, care conduce la producerea de aproximativ 900  $\mu\text{g}$  de indolizină /mL · zi.

Subcapitolul cuprinde și un studiu realizat pentru a determina influența anumitor parametri asupra procesului de biocataliză, în acest studiu utilizându-se, datorită numeroaselor avantaje pe care le oferă (Leonov 2010), o tulpină de bacterii (*Pseudomonas* spp.) cu proprietăți biocatalitice demonstrate în etapa de selecție. Acești parametri, care au constituit ulterior variabile independente în procesul de optimizare prin modelare matematică au fost următorii: perioada de cultivare, concentrația de inocul, concentrația de preparat enzimatic brut, durata și temperatura de reacție, pH-ul soluției tampon și tratamentul cu ultrasunete aplicat înaintea încălzirii amestecului de reacție.

În figura 4 se prezintă, spre exemplificare, capacitatea biocatalitică a mediului fermentat ( $\mu\text{g}$  indolizină/mg s.u.) analizată variind diverse condiții: vârsta culturii (24 și 48 h), cantitatea de biocatalizator (500 și 1000  $\mu\text{L}$ ) și temperatura reacției (25 și 50°C).

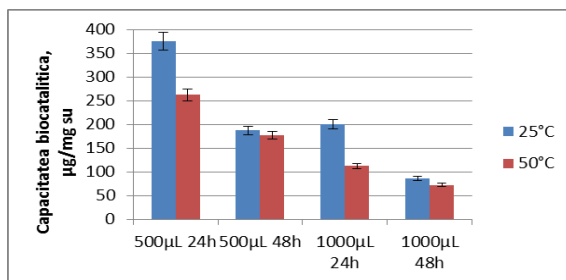


Fig. 4. Capacitatea biocatalitică a mediului fermentat produs de *Pseudomonas fluorescens* MP11

Cel mai bun randament de bioconversie s-a obținut cu mediul fermentat rezultat dintr-o cultură în vârstă de 24 de ore, când s-au utilizat pentru biocataliză 500  $\mu\text{L}$ , iar reacția a fost condusă la temperatura de 25°C. Dublarea cantității de biocatalizator nu a condus la rezultate pozitive, în acest caz randamentul de biotransformare reducându-se cu aproape 50%.

*Optimizarea biocatalizatorului și a condițiilor optime de biocataliză prin modelare matematică și metode de analiză statistică* descrie cele zece modele statistice obținute în urma experimentelor realizate. Astfel, au fost realizate experimente cu șase biocatalizatori, și anume mediul fermentat, lichidul cultural și biomasa obținute în urma cultivării a tulpinilor *Pseudomonas fluorescens* MP11 MIUG și *Yarrowia lipolytica* RD14 MIUG, considerate cele mai performante.

În acest capitol se prezintă biocatalizatorul ideal și condițiile de biotransformare optime pentru reacția model. Acestea sunt mediul fermentat produs cu tulpina *Pseudomonas fluorescens* MP11 MIUG obținut după 72 de ore de cultivare submersă, cu aerare, la temperatura de 25°C, la o durată a reacției de 72 de ore la temperatură ambiantă, cu un pretratament cu ultrasunete de 5 minute. Din reprezentarea sub formă de cub a modelului statistic (figura 5), se observă interacțiunea factorilor semnificativi. Astfel, valoarea maximă predicționată a capacității biocatalitice se atinge atunci când timpul de reacție are valoarea minimă și

tratamentul cu ultrasunete are valoarea maximă, adică după 3 zile și respectiv 5 minute.

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
capacitatea biocatalitica 2  
X1 = B: densitatea inoculului  
X2 = C: cantitatea de biocatalizator  
X3 = E: timpul de reactie  
Actual Factors  
A: vechia culturii = 36.00  
D: temperatura de reactie = 35.00  
F: pH-ul solutiei tampon = 7.00  
G: tratamentul cu ultrasunete = 2.50

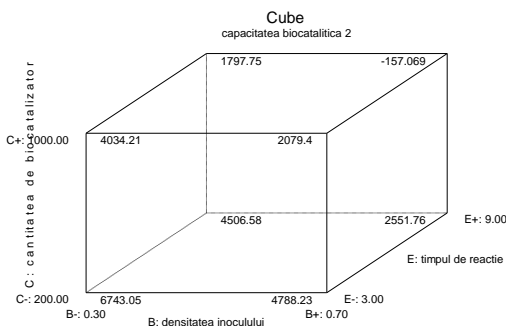
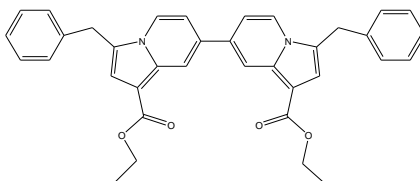


Fig. 5. Interacțiunea variabilelor incluse în model asupra efectului utilizării mediului fermentat al tulpinii *Pseudomonas fluorescens* MP11, în calitate de biocatalizator

În subcapitolul *Obținerea unor derivați indoliziniici prin biotransformare, în condițiile optimizate prin modelare matematică* se prezintă obținerea a 16 derivați indoliziniici utilizând ca metodă de sinteză metoda de biotransformare cea mai eficientă identificată prin modelare matematică.

De asemenea, în acest subcapitol se prezintă structurile și caracteristicile acestor compuși organici obținuți prin biocataliză, exemplificat în cele ce urmează prin produsul reacției model.

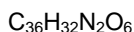
### 1,1'-dietildicarboxilat-3,3'-benzoil- 7,7'-bis(indolizina) (If)



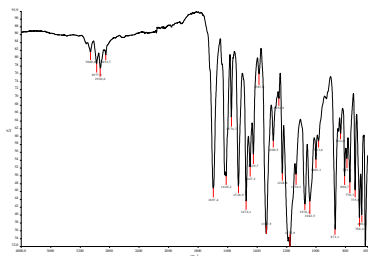
Se obțin cristale de culoare galben deschis.

P.t. = 273-274°C; M=588; η=60%,

Analiză elementală:

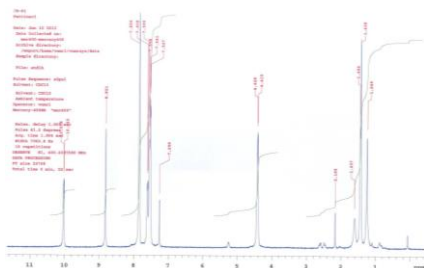


	C%	H%	N%
calculat:	73,46	5,44	4,76
obținut:	73,31	5,26	4,63



**Figura 6.** Spectrul IR pentru 1,1'-diethylcarboxilat-3,3'-benzoil-7,7'-bis(indolizina)

Interpretarea spectrului IR (figura 6) (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3139 (l,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ ); 2979 (l,  $\text{CH}_{\text{alif}}$ ); 1700 (s,  $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ); 1645 (s,  $\text{C}=\text{O}$ ); 1524, 1512, 1479, 1459, 1427 (s,  $\text{C}=\text{N}$ ,  $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$ ); 1341 (s,  $\text{CO}_{\text{ester}}$ ); 1216, 1167 (s,  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ); 1071 (s,  $\text{C}-\text{N}$ )



**Figura 7.** Spectrul RMN pentru 1,1'-diethylcarboxilat-3,3'-benzoil-7,7'-bis(indolizina)

Interpretarea spectrului  $^1\text{H}$ -RMN (figura 7) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$ /ppm: 9.98 (d,  $J = 7.5$ , 2H); 8.77(d,  $J = 1.2$ , 2H); 7.78–7.88 [m, 6H: 4H, 2H (7.82)]; 7.42–7.73 [m, 8H: 4H, 2H, 2H (7.52,  $J = 7.5$ ,  $J = 1.2$ )]; 4,4 (q,  $J = 7.2$ , 4H); 1,43 (t,  $J = 7.2$ , 6H);

S-au obținut randamente superioare de bioconversie, cuprinse între 56% și 68%, similare sau ușor crescute față de randamentele obținute prin metodele descrise în literatură. Prin biocataliză, s-a redus semnificativ timpul de reacție, iar reacția decurge într-o singură etapă, multicomponent

(one-pot). De asemenea, s-a redus temperatura de reacție, un alt beneficiu fiind și realizarea reacției în mediul apos.

**Capitolul 7, Activitatea biologică a compușilor obținuți**, include rezultatele obținute în urma testării potențialului bioactiv al unor compuși organici obținuți în urma studiilor experimentale. Astfel, s-a determinat activitatea antimicrobiană a sărurilor cuaternare de amoniu, testele ulterioare incluzând 28 de compuși organici, săruri cuaternare de amoniu și indolizine.

Obiectivele științifice vizate au fost următoarele:

- Testarea activității antimicrobiene a sărurilor cuaternare de amoniu obținute.
- Testarea activității antioxidante a sărurilor cuaternare de amoniu și indolizinelor obținute.
- Testarea activității anti-acetilcolinesterazice sărurilor cuaternare de amoniu și indolizinelor obținute.

Metodele de investigare utilizate au fost:

- Metoda discurilor pentru determinarea activității antimicrobiene.
- Metode de determinare a activității antioxidante: metoda reducerii radicalului liber DPPH și metoda de decolorare a  $\beta$ -carotenului.
- Obținerea acetilcolinesterazei utilizând țesut cerebral provenit de la *Mus musculus*.
- Metoda Ellman (1961) de analiză a activității anti-acetilcolinesterazice, utilizată cu modificări.

Pentru *evaluarea activității antimicrobiene* s-au utilizat ca microorganisme indicator o serie de nouă microorganisme de alterare. Sărurile cuaternare testate au prezentat activități antimicrobiene moderate, cele derivate de la 4, 4'-bipiridil conducând la rezultatele cele mai slabe. Doi dintre compuși, codificați Sb și Sd, derivați de la piridină, au efect antibacterian avansat, inhibând creșterea și multiplicarea bacteriilor. Alte două săruri codificate Si și Sl, derivate de la 1, 2-bis-(4-piridil) etan au demonstrat un spectru larg de acțiune antimicrobiană, dar cu inhibare moderată.

*Determinarea activității antioxidante* s-a realizat prin două metode, de reducere a radicalului liber DPPH și de decolorare a  $\beta$ -carotenului, datorită

complementarității celor două metode. Se observă că, per ansamblu, sărurile cuaternare au avut mai bună activitate antioxidantă când s-a utilizat metoda cu DPPH. Această analiză s-a desfășurat în metanol, solventul în care s-au preparat și soluțiile-stoc de săruri. În același timp, s-a observat o anume influență a grupărilor funcționale care ulterior nu a fost valabilă și pentru indolizine, acest fapt punându-se pe seama naturii metodei, care are ca mecanism disponibilitatea de a transfera electroni pentru a reduce radicalul liber. Astfel, sărurile cuaternare și bis-cuaternare cuprind în moleculă cationi de amoniu, care interacționează cu grupările funcționale, atrăgând și delocalizând electroni (Apak, 2007).

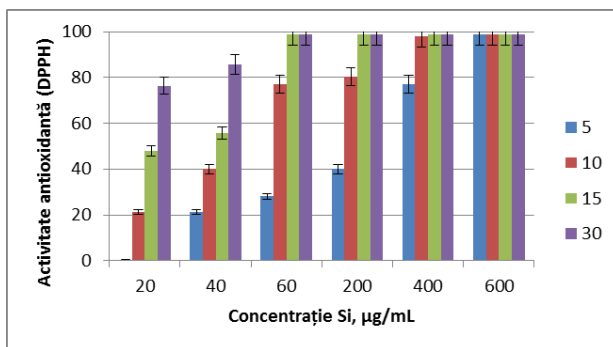


Fig. 8. Activitatea antioxidantă a dibromurii de N,N'-di(o-metoxifenacil)-4,4'-bipiridiniu (metoda DPPH)

Rezultatele determinării activității antioxidante prin metoda cu DPPH se exemplifică prin figura 8, ce prezintă compusul cu activitatea cea mai ridicată, care, la concentrația minimă testată, reduce radicalii liberi DPPH în proporție de peste 75 %, după 30 de minute de reacție.

Atunci când activitatea antioxidantă s-a cuantificat analizând potențialul compusului de a proteja  $\beta$ -carotenul, indolizinele au avut o activitate ușor îmbunătățită comparativ cu sărurile cuaternare de piridiniu și bis-piridiniu. Acest fapt este explicabil prin conceptul de paradox polar, conform căruia, în sistemul  $\beta$ -caroten-acid linoleic, compușii au o reactivitate cu atât mai mare cu cât pot realiza cât mai multe interacțiuni hidrofobe (Lage, 2013).



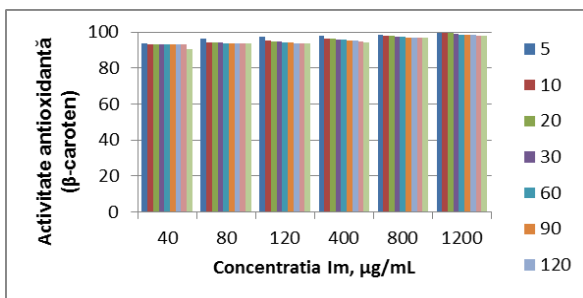


Fig. 9. Activitatea antioxidantă a 1,2,1',2'-tetraetoxicarbonil-3,3'-bis(p-nitro-benzoil)-7,7'-bis(indolizinei) (metoda  $\beta$ -caroten)

Rezultatele determinării activității antioxidante prin metoda cu  $\beta$ -caroten se exemplifică prin figura 9, ce prezintă compusul cu activitatea cea mai ridicată, care, la concentrația minimă testată, protejează  $\beta$ -carotenui de decolorare în proporție de peste 90 %, chiar și după 180 de minute de reacție.

S-a evaluat activitatea anti-acetilcolinesterazică a compușilor organici obținuți, utilizând țesut cerebral provenit de la *Mus musculus* ca sursă de enzimă. Sărurile cuaternare de amoniu au prezentat activități anti-acetilcolinesterazice ridicate, demonstrând încă o dată importanța interacțiunilor cation-electron  $\pi$  pentru inhibarea acestei enzime (Radic, 2001).

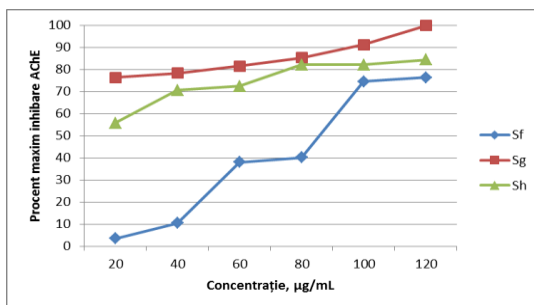


Fig. 10. Activitatea anti-acetilcolinesterazică a sărurilor derivate de la 4, 4'-bipiridil

În figura 10 se prezintă activitatea anti-acetilcolinesterazică a sărurilor derivate de la 4, 4'-bipiridil, două dintre acestea prezentând o bioactivitate

remarcabilă, inhibând enzima în proporție de peste 50 % la concentrația minimă testată.

**III. CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI PERSPECTIVE** reunește concluziile rezultate din analiza studiilor experimentale realizate cu scopul de a obține compuși organici biologic activi, prin biocataliză, dar și contribuțiile originale la dezvoltarea cunoașterii în domeniu.

### Concluzii generale

Studiile realizate în acord cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat au vizat studiul condițiilor de obținere a indolizinelor și a precursorilor acestora prin procese biocatalizate de enzime comerciale și preparate enzimatic brută obținute cu tulpini selecționate de microorganisme. S-a evaluat activitatea biologică a compusilor obținuți prin testarea activității antioxidante, a activității antimicrobiene și a activității anti-acetilcolinesterazice. Pe baza concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din cadrul studiului experimental, este reliefată sumativ o serie de concluzii generale, după cum urmează:

- S-au studiat și optimizat metode rapide și accesibile pentru a obține și purifica numeroși compuși intermediari în reacția de cicloadiție, precum săruri cuaternare de piridiniu ce conțin sau nu funcția oximă, dar și alchine cu grupare propiolamidică derivate de la amine alifatică. Astfel, au fost preparate și analizate 105 reacții clasice și biocatalizate, realizate
- S-au obținut și purificat doisprezece sintoni dipolari și doi precursori ai acestora, prin reacții chimice clasice precum și trei sintoni dipolarofili, prin reacții biocatalizate. S-a stabilit că metoda cea mai eficientă de a obține săruri cuaternare de piridiniu ce conțin în moleculă funcția oximă, pornind de la 4-piridin-aldehidă, este de a substitui întâi oxigenul aldehydic, ca mai apoi să se continue cu alchilarea azotului heterociclic.
- Au fost obținute 12 săruri cuaternare de amoniu utilizând metode neconvenționale, prin activare cu ultrasunete. Randamentele reacțiilor au fost cuprinse între 85 și 96%. Utilizând această metodă, acești compuși se obțin mai rapid (6 ore față de 10 ore de încălzire), în solvent mai puțin nociv (acetonă față de acetonitril), păstrându-se sau

îmbunătățindu-se randamentul obținut prin metodele descrise anterior în literatură.

- S-au obținut randamente superioare de bioconversie pentru aminele alifactice testate, dar și pentru alcoolul benzilic. Aceste rezultate nu au putut fi confirmate și în cazul reacției de formare a benziltioesterului propilic, întrucât enzimele și condițiile de reacție testate nu s-au dovedit a fi adecvate.
- S-au studiat și selecționat pe baza rezistenței la toxicitatea a patru concentrații diferite a reactanților reacției model de obținere a 1,1'-dietildicarboxilat-3,3'-benzoil-7,7'-bis(indolizinei), patru tulpini fungice, trei drojdii (*Yarrowia lipolytica* RD14, *Yarrowia lipolytica* RD15, *Yarrowia lipolytica* RD16) și un mucegai (*Geotrichum candidum* MIUG 27), pentru utilizare în calitate de biocatalizatori în reacția de obținere a indolizinelor.
- Cu aceste patru tulpini s-au obținut trei categorii de biocatalizatori în stare brută (mediul fermentat, biomasa și lichidul cultural), după 72, 96, 120, 144 de ore de cultivare în sistem submers, cu aerare, în mediul suplimentat cu 0,01 μmoli/mL din fiecare din cei trei reactanți, 4,4'-bipiridil, 2-bromoacetofenonă și propiolat de etil.
- A fost testat potențialul bioacatalitic al acestor tipuri de preparate brute în reacția model de obținere a indolizinelor, indentificându-se preparatele care au condus la randamente de biotransformare semnificative, după cum urmează: lichidul cultural obținut cu tulpina *Yarrowia lipolytica* RD14, după șase zile de cultivare, mediul fermentat obținut cu tulpina *Yarrowia lipolytica* RD15, după cinci zile de cultivare și biomasa produsă de *Geotrichum candidum* MIUG 27, după trei zile de cultivare.
- Studii similare au fost realizate și pentru produsele de fermentație obținute cu tulpina de bacterii *Pseudomonas fluorescens* MP11. Utilizarea acestei bacterii oferă o serie de avantaje biotehnologice și anume: este activă la temperaturi scăzute, produce lipaza extracelulară activă la temperaturi scăzute, se înmulțește mult mai rapid comparativ cu fungii, se dezvoltă prin cultivare în mediul minimal. Au fost analizat și efectul altor parametri și anume: durata de cultivare, concentrația de inocul, concentrația de preparat enzimatic, durata și temperatura de reacție.

- Prin modelare matematică s-a studiat și optimizat efectul unor parametri biotehnologici și ai procesului de biocataliză asupra randamentului de biocataliză, corelat cu tipul de biocatalizator (mediul fermentat, biomasa și lichidul cultural), pentru cele mai performante dintre tulpini - *Yarrowia lipolytica* RD14 și *Pseudomonas fluorescens* MP11. S-au stabilit condițiile optime de biocataliză pentru reacția model, care s-au aplicat ulterior pentru a se obține derivați indolizini.
- Au fost obținuți 16 derivați indolizini prin reacții biocatalizate. Biocatalizatorul, mediul fermentat obținut cu tulpina *Pseudomonas fluorescens* MP11, obținut după 72 de ore de cultivare, la temperatura de 25°C, a condus la randamente de reacție de bune, cuprinse între 56 și 68%, comparabile cu cele descrise în literatura de specialitate.
- S-a demonstrat că, prin biocataliză se reduce semnificativ timpul de reacție, reacția desfășurându-se ca o reacție multicomponent (one-pot). De asemenea, se reduce temperatura de reacție, consumul energetic este redus, iar reacția este condusă în mediul apos.
- S-a analizat activitatea antimicrobiană, antioxidantă și anti-acetilcolinesterazică a compușilor obținuți. Pentru analiza antimicrobiană au fost selectate doar sărurile cuaternare de amoniu, proprietățile antibacteriene și antifungice ale unor compuși cu structură similară fiind cunoscute în practica industrială, medicală și cosmetică. Testele de inhibiție au utilizat metoda discurilor, de difuzie în agar și s-au realizat testând nouă tulpini de microorganisme indicator, analizându-se 540 de probe. În general, sărurile cuaternare au prezentat activități antimicrobiene moderate, cele derivate de la 4, 4'-bipiridil conducând la rezultatele cele mai slabe. Doi dintre compuși, bromura de N-(p-metoxifenacil)-4-aldoxi-piridiniu (Sb) și bromura de N-carbometoxi-4-aldoxi(O-benzil)-piridiniu (Sd), derivați de la piridină, s-au evidențiat inhibând puternic creșterea bacteriilor. Alte două săruri, dibromura de N,N'-di(o-metoxifenacil)-4,4'-bipiridiniu (Si) și dibromura de N,N'-di(p-nitrofenacil)-4,4'-bipiridiniu (Sl), au demonstrat un spectru larg de acțiune, dar cu capacitate de inhibare moderată.
- Activitatea antioxidantă, cuantificată prin două metode și activitatea anti-acetilcolinesterazică au fost evaluate pentru 31 de compuși, toți cei 28 de compuși organici obținuți și trei substanțe de referință.
- În urma analizei activității antioxidante a unor săruri cuaternare de amoniu preparate prin metode de activare neconvenționale, din

perspectiva capacității de neutralizare a radicalului liber DPPH, s-au identificat doi compuși cu activitate antioxidantă superioară, cu IC 50 sub 20  $\mu\text{g/mL}$ , și un compus cu IC 50 puțin peste 20  $\mu\text{g/mL}$  dar cu o viteză de reacție foarte bună. Aceștia au fost dibromura de N, N'-difenacil-bipiridiniu (Sg), dibromura de de N,N'-di(o-metoxifenacil)-4,4'-bipiridiniu (Si), respectiv dibromura de N, N'-di(p-metoxifenacil)-bipiridiniu (Sh).

- În urma analizei activității antioxidante a compușilor indoliznici, prin metoda reducerii radicalului liber DPPH, s-a constatat că 1,2,1',2'-tetraetoxicarbonil-3,3'-bis(p-bromo-benzoil)-7,7'-bis(indolizina) (Ik) are IC 50 sub 20  $\mu\text{g/mL}$  și o viteză de reacție mare, la o concentrație de 40  $\mu\text{g/mL}$  prezentând o activitate antioxidantă de aproape 52 % după numai 5 minute de reacție.
- Dintre sărurile cuaternare de amoniu, cea mai bună activitate antioxidantă prin metoda decolorării  $\beta$ -carotenului a fost aceea a unei sări derivate de la piridină, bromura de N-fenacil-4-aldoxi(O-benzil)-piridiniu (Se), 85%, după 180 de minute, la o concentrație de 40  $\mu\text{g/mL}$ .
- În urma analizei activității antioxidante a compușilor indoliznici prin metoda decolorării  $\beta$ -carotenului s-au remarcat doi compuși, cu activități antioxidante superioare substanțelor de referință analizate. Compusul 1,2,1',2'-tetraetoxicarbonil-3,3'-bis(p-nitrobenzoil)-7,7'-bis(indolizina) (Im) și 1,2-bis [1'-etilcarboxilat-3'-(p-nitrobenzoil)-7'-indolizin]etan (Ip), care au prezentat o foarte bună stabilitate în timp, cu valori ale activității antioxidante de 91% respectiv 89%, la concentrația minimă analizată, după 180 de minute.
- Sărurile cuaternare de amoniu prezintă activitate anti-acetilcolinesterazică ridicată, trei săruri au avut IC 50 sub concentrația minimă testată, 20  $\mu\text{g/mL}$ : bromura de N-fenacil-4-aldoxi(O-benzil)-piridiniu (Se), bromura de N, N'-difenacil-bipiridiniu (Sg), ce prezintă o inhibiție de peste 76% la 20  $\mu\text{g/mL}$ , și bromura de N, N'-di(p-metoxifenacil)-bipiridiniu (Sh).
- Dintre compușii indoliznici s-a remarcat 1,2,1',2'-tetraetoxicarbonil-3,3'-bis (p-bromobenzoil)- 7,7'-bis(indolizina) (Ik), cu o valoare IC 50 de aproximativ 30  $\mu\text{g/mL}$ , aceeași indolizină care a prezintă cea mai bună activitate antioxidantă de reducere a radicalului liber DPPH.

- Douăzeci și opt de compuși au fost obținuți și analizați și s-a dovedit activitatea biologică remarcabilă a unora dintre compușii sintetizați.
- O sare cuaternară derivată de la piridiniu, bromura de N-fenacil-4-aldoxi(O-benzil)-piridiniu (Se), a avut cea mai bună activitate antioxidantă prin metoda decolorării  $\beta$ -carotenului dintre toate sărurile cuaternare, și una dintre cele mai bune activități anti-acetilcolinesterazice dintre toți compușii analizați. Dintre sărurile derivate de la 4, 4'-bipiridil s-au remarcat doi compuși, dibromura de N, N'-difenacil-bipiridiniu (Sg) și dibromura de N, N'-di(p-metoxifenacil)-bipiridiniu (Sh), cu rezultate foarte bune împotriva radicalului liber DPPH dar și de inhibare a acetilcolinesterazei. Dibromura de N,N'-di(o-metoxifenacil)-4,4'-bipiridiniu (Si), derivată de la 1, 2-(4-bispiridil)-etan a demonstrat o foarte bună activitate prin metoda cu DPPH, iar în testele antimicrobiene s-a dovedit a fi un compus cu spectru larg de acțiune.
- Trei dintre derivații indoliziniici au condus la rezultate deosebite. Astfel, 1,2,1',2'-tetraetoxicarbonil-3,3'-bis(p-nitrobenzoil)-7,7'-bis(indolizina) (Im) și 1,2-bis [1'-etilcarboxilat-3'-(p-nitrobenzoil)-7'-indolizin]etan (Ip) au fost cei mai activi compuși ce s-au opus decolorării  $\beta$ -carotenului. Dar cel mai performant compus din această clasă a fost 1,2,1',2'-tetraetoxicarbonil-3,3'-bis (p-bromobenzoil)- 7,7'-bis(indolizina) (Ik), care a fost indolizina cu cea mai mare activitate împotriva radicalului liber DPPH și împotriva acetilcolinesterazei.

## **Contribuții la dezvoltarea cunoașterii și perspective de continuare a cercetărilor**

Originalitatea cercetărilor efectuate, în concordanță cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, se concretizează printr-o serie de elemente de noutate, care sporesc valoarea științifică a studiilor realizate.

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat pot fi sintetizate după cum urmează:

- S-au realizat reacții de cicloadiție, utilizând biocatalizatori obținuți cu microorganisme selecționate, în scopul obținerii unor compuși heterociclici cu nucleu de indolizină. Studiile realizate în premieră

compară potențialul biocatalitic al mediului fermentat, biomasei și lichidului cultural, în condițiile în care în literatura de specialitate există doar câteva studii care compară activitatea enzimatică și biocatalitică a lichidului cultural și biomasei. De asemenea s-au utilizat pentru prima oară biocatalizatori, obținuți în laborator și comerciali, pentru creșterea randamentului și purității produșilor unor reacții de cicloadiție 1,3-dipolară.

- Obținerea compușilor indolizinci prin biotransformare a fost studiată pentru prima dată în mediu apos neutru, la diverse temperaturi și prin activare cu ultrasunete. Majoritatea studiilor descrise de literatura de specialitate arată că indolizinele obținute prin reacții de cicloadiție intermoleculară au necesitat tratament termic, solvenți organici și mediu bazic sau catalizatori de tipul acizilor Lewis sau a complecșilor cu Pd, reacții care implică consum mare de energie, solvenți toxici, catalizatori costisitori.
- Au fost obținuți prin metode originale de biocataliză cinci compuși noi și douăzeci și trei de compuși cunoscuți. Pentru acești 28 de compuși a fost analizată pentru prima dată activitatea biologică. Doi dintre aceștia au mai fost testați anterior, dar numai din perspectiva activității antimicrobiene. Până în prezent, niciunui derivat indolizinic nu i-a fost testată activitatea antioxidantă prin metoda cu  $\beta$ -caroten, iar sărurile cuaternare de amoniu nu au fost analizate nici prin metoda cu DPPH.
- În urma acestui studiu s-au identificat șapte compuși cu activitate biologică remarcabilă și metode eficiente pentru a-i obține prin biocataliză.

Din punctul de vedere al aplicațiilor compușilor obținuți, cercetările pot continua prin teste de citotoxicitate, dar și în direcția stabilirii unor relații structură-proprietăți, prin studii de docking molecular. În ceea ce privește inhibiția acetilcolinesterazei, se pot realiza și studii de determinare a constantei de inhibiție. Majoritatea indolizinelor obținute prezintă fluorescență, această proprietate putând fi analizată în studii viitoare.

### Referințe bibliografice selective

- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Bektasoglu B., Berker K.I., Ozyurt D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 7, 1496-1547.
- Chanawanno K., Chantrapromma S., Anantapong T., Kanjana-Opas A., Fun H.-K., 2010, Synthesis, structure and in vitro antibacterial activities of new hybrid disinfectants quaternary ammonium compounds: Pyridinium and quinolinium stilbene benzenesulfonates, *Eur. J. Med. Chem.* 45 4199–4208.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres, jr. V., Featherstone R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology* 7 88-95.
- Furdui B., Dinică R.M., Druță I.I., Demeunynck M., 2006, Improved synthesis of cationic pyridinium-substituted indolizines, *Synthesis* 16 2640-2642.
- Georgescu E., Caira M.R., Georgescu F., Drăghici B., Popa M.M., Dumitrașcu F., 2009, One-pot, three-component synthesis of a library of new pyrrolo[1,2-a]quinoline derivatives, *Synlett* 11 1795-1799.
- Lage M.A.P., Murado García M.A., Vázquez Álvarez J.A., Anders Y., Curran T.P., 2013, A new microplate procedure for simultaneous assessment of lipophilic and hydrophilic antioxidants and pro-oxidants, using crocin and  $\beta$ -carotene bleaching methods in a single combined assay: Tea extracts as a case study, *Food Research International* <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.026>
- Leonov S.L., 2010, Screening for novel cold-active lipases from wild type bacteria isolates, *Innovative Romanian Food Biotechnology* 6 12-17.
- Liu Y., Zhang Y., Shen Y.-M., Hu H.-W., Xu J.-H., 2010, Regioselective synthesis of 3-acylindolizines and benzo-analogues via 1,3-dipolar cycloadditions of N-ylides with maleic anhydride, *Org. Biomol. Chem.* 8 2449-2456.
- Pernak J., Rogoża J., Mirska I., 2001, Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides, *Eur. J. Med. Chem.* 36 313–320.



- Radic Z., Taylor P., 2001, Interaction of reversible inhibitors and substrates with acetylcholinesterase and its fasciculin 2 complex, *J. Biol. Chem.* 276 4622-4633.
- Reetz M.T., 2013, Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present and future, *J. Am. Chem. Soc.* 135 12480-12496.
- Rotaru A.V., Druta I.D., Oeser T., Muller T.J.J., 2005, A novel coupling 1,3-dipolar cycloaddition sequence as a three-component approach to highly fluorescent indolizines, *Helv. Chim. Acta* 88 1798.
- Shen Y.-M., Lv P.-C., Wu Chen W., Liu P.-G., Zhang M.-Z., Zhu H.L., 2010, Synthesis and antiproliferative activity of indolizine derivatives incorporating a cyclopropylcarbonyl group against Hep-G2 cancer cell line, *Eur. J. Med. Chem.* 45 3184-3190.
- Wang B.-X., Liu W.-W., He T., Hu H.-W., 2006, Oxidant promoted 1,3-dipolar cycloaddition of pyridinium ylides to chalcones for preparation of 1-benzoyl-2-arylindolizines, *Chin. J. Chem.* 24 279-281.
- Wu K., Chen Q.-Y., 2003, Synthesis of fluorinated indolizines and 4H-pyrrolo[1,2-a]benzimidazoles via 1,3-dipolar cycloaddition of fluoroalkenes to N-ylides, *Synthesis* 35-40.

## Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Rezultatele obținute în urma studiilor experimentale au fost diseminate prin elaborarea a 13 lucrări științifice, respectiv 3 articole publicate, 2 în reviste cotate ISI și 1 ISI-Proceedings, și 10 lucrări comunicate la conferințe naționale și internaționale, 8 sub formă de poster și 2 comunicări orale.

### A. Articole publicate în reviste cotate ISI

1. Georgiana Parfene, **Ioana Otilia Ghinea**, Bianca Furdui, Gabriela Bahrim, Martine Demeunynck, Rodica Mihaela Dinica, Screening of fungal strains to be used as biocatalysts in bioconversion processes based on cycloaddition reactions, *Current Opinion in Biotechnology*, 24, S60, 2013 (publicare rezumat; factor de impact 2012: 7.860)
2. Rodica Mihaela Dinica, Bianca Furdui, **Ioana Otilia Ghinea**, Gabriela Bahrim, Simon Bonte and Martine Demeunynck, Novel One-Pot Green Synthesis of Indolizines Biocatalysed by *Candida antarctica*

Lipases, *Mar. Drugs*, 11, 431-439, 2013 (factor de impact 2012: 3.978)

3. Simon Bonte, **Ioana Otilia Ghinea**, Isabelle Baussanne, Jean-Paul Xuereb, Rodica Dinica, Martine Demeunynck, Investigation of the lipase-catalysed reaction of aliphatic amines with ethyl propiolate as a route to N-substituted propiolamides, *Tetrahedron*, 69, 5495-5500, 2013 (factor de impact 2012: 2.803)

## B. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale și naționale

1. **Ioana Otilia Ghinea**, Georgiana Parfene, Rodica-Mihaela Dinica, Gabriela Bahrim, Simon Bonte, Martine Demeunynck, Combined Action of Enzymes and Ultrasounds: the First "One-Pot" Cycloaddition Reaction for Indolizine Synthesis, *2<sup>nd</sup> International Symposium on Green Chemistry*, 21-24 mai 2013, La Rochelle, Franta (comunicare orală)
2. **Ioana Otilia Ghinea**, Svetlana Laura Leonov, Rodica Dinica, Gabriela Bahrim, One-pot Cycloaddition Reaction Biocatalysed by Cells and Produced Enzymes of Cold-adapted *Pseudomonas fluorescens* MP11 strain, *Conferința Științifică a Școlilor Doctorale din Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați*, 16-17 mai 2013, Galați, Romania. (comunicare orală)
3. **Ioana Otilia Ghinea**, Bianca Furdui, Georgiana Parfene, Gabriela Bahrim, Rodica Mihaela Dinica, 1,3-Dipolar cycloadditions catalysed by horseradish enzymes, *IUPAC Congres*, 11-16 August 2013, Istanbul, Turcia. (poster)
4. Bianca Furdui, **Ioana Otilia Ghinea**, Steluta Gosav, Rodica Mihaela Dinica, Synthesis and photophysics of some new indolizines fluorophores, *IUPAC Congres*, 11-16 August 2013, Istanbul, Turcia. (poster)
5. Rodica Dinica, Bianca Furdui, **Oana Ghinea**, Synthese facile et efficace "one pot" des derives indoliziniques en milieu de reaction ecologique, *Septieme Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquee*, 27-29 iunie 2012, Bacau, Romania. (poster)

6. **Ioana-Otilia Ghinea**, Rodica Dinica, Gabriela Bahrim, Geta Carac, Electro-oxidation of new pyridine ring heterocycles on platinum electrode in aqueous medium, *63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, 19-24 august 2012, Praga, Republica Cehia. (poster)
7. **Ioana-Otilia Ghinea**, Andreea Carac, Rodica Dinica, Electrochemical behavior of cefaclor stability and antimicrobial properties, *63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, 19-24 august 2012, Praga, Republica Cehia. (poster)
8. Guillaume Bal-Fontaine, **Ioana Otilia Ghinea**, Grégory Chatel, Nathalie Kardos, Martine Demeunynck, Micheline Draye, Utilisation de liquides ioniques pour la synthèse de 4-hydroxyiminomethyl-1-alkylpyridinium biologiquement actifs, *Journée SCF Rhone-Alpes 2012*. (poster)
9. **Ioana Otilia Ghinea**, Gabriela Bahrim, Rodica Dinica, Martine Demeunynck, "Green" preparation of fluorescent dyes using cell extracts for enzymatic catalysis (La préparation "verte" de colorants fluorescents en utilisant des extraits cellulaires pour la catalyse enzymatique), *Rencontres en Chimie Organique Biologique - Recob14*, Aussois, Franta. (poster)
10. **Ioana Otilia Ghinea**, Gabriela Bahrim, Rodica Dinica, Martine Demeunynck, Fluorescent organic compounds obtained by enzymatic catalysis, *Biotech 2011 & 5th Czech-Swiss symposium with exhibition*, Praga, Republica Cehia. (poster)

### **Membru în echipele proiectelor de cercetare**

1. Programme Hubert Curien-Brancusi nr. 485/2011-2013- cooperare bilaterală România-Franța
2. PN-II-ID-PCE-2011-3-0226/ 2012-2014 – „Accesul la noi molecule bioactive prin dezvoltarea de biocatalizatori originali pentru reacții de tip click chemistry”