

Laboratorio di Chimica Bioorganica – LM in Chimica

Contenuti

Il corso, suddiviso in tre parti, offre una panoramica delle metodologie sperimentali in chimica bioorganica e chimica organica avanzata:

- Sintesi combinatoriale di inibitori enzimatici e saggi di attività enzimatica. Verranno preparate librerie ortogonali di inibitori di secretasi, su scaffold derivante da reazioni di Biginelli. Verranno eseguiti saggi fluorimetrici FRET di attività secretasica.
- Biocatalizzatori in sintesi organica. Verrà effettuata la risoluzione cinetica enzimatica dell'1-feniletanolo e la derivatizzazione del prodotto di reazione con l'acido O-acetil mandelico e determinazione dell'eccesso diastereoisomerico via spettroscopia $^1\text{H-NMR}$.
- Meccanismi di reazioni organiche ed enzimatiche. Saranno affrontati: (a) lo studio del meccanismo di reazione di idrolisi dell'aspirina. (b) Studio della reazione di condensazione benzoinica catalizzata da sali di tiazolio. (c) Studio della reazione di deacilazione di un intermedio acil-enzima (chimotripsina). La prima esperienza sarà comune a tutti gli studenti, la seconda esperienza sarà scelta tra (b) e (c). Ciascuno studente condurrà quindi due esperienze.

Testi di riferimento

Science, **1999**, 286, 735 – 741; *Age Ageing* **2006**, 35, 332 – 335; *QSAR Comb. Sci.* **2003**, 22, 607 – 630; *J. Chem. Educ.* **2011**, 88, 334-336; *J. Chem. Educ.* **2004**, 81, 870-873; *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 4857-4863; *J. Chem. Educ.* **1975**, 52, 410-413; *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5124-5131.

Obiettivi formativi

- Verranno acquisite esperienze nel campo della sintesi supportata e della sintesi combinatoriale, attraverso l'uso di un sintetizzatore parallelo. Verranno esemplificate le problematiche connesse alla sintesi in miscela su scale dell'ordine del mg. Verrà fatta esperienza dell'attività sperimentale con enzimi di relativa stabilità, e delle tecniche di misura della loro attività. Verrà inoltre esemplificato l'approccio all'analisi dei dati di attività biologica.
- Oltre al perfezionamento delle abilità manuali nell'esecuzione di una reazione organica, l'esperimento si propone l'acquisizione di maggiori competenze nel campo delle reazioni enzimatiche, e in particolare delle risoluzioni di composti chirali racemi mediate da enzimi. Un altro obiettivo è l'applicazione della spettroscopia $^1\text{H NMR}$ alla determinazione dell'eccesso enantiomerico di una molecola chirale otticamente attiva.
- Lo scopo di questa parte dell'attività di laboratorio è avvicinare gli studenti all'uso di alcuni strumenti formali e metodologici utilizzati nello studio dei meccanismi delle reazioni organiche con particolare attenzione a processi catalizzati di interesse nella Chimica Bioorganica.

Prerequisiti

E' richiesta la conoscenza della chimica organica di base, della biochimica di base, dei loro meccanismi di reazione, dei fondamenti di stereochimica e di spettroscopia di massa ed $^1\text{H NMR}$.

Programma esteso

- Reazioni di Knoevenagel parallele tra un set di aldeidi ed un set di chetoesteri catalizzate da piperazina supportata su resina di Merrifield. Ottenimento di due librerie ortogonali di prodotti di Knoevenagel. Attivazione di resina di Merrifield con tiourea. Reazioni di Biginelli supportate su resina-tiourea: sintesi di librerie supportate ortogonali di prodotti di Biginelli. Rilascio dei prodotti dalla resina con ammoniaca, per ottenere direttamente le immine dei 3,4-diidropirimidin-2-oni. Caratterizzazione delle librerie mediante spettrometria di massa. Saggi di attività su beta-secretasi commerciale, utilizzando un substrato peptidico fluorogenico. Misura di attività inibitoria delle librerie a concentrazione fissa. Deconvoluzione dei dati e identificazione del migliore inibitore.
- Acetilazione enzimatica dell'1-feniletanolo, separazione cromatografica dei prodotti di reazione. Derivatizzazione dell'alcol otticamente attivo con acido O-acetil mandelico con formazione di esteri diastereoisomeri determinazione dell'eccesso diastereoisomerico via spettroscopia $^1\text{H-NMR}$.
- (a) *Reazione di idrolisi dell'aspirina*. Determinazione della velocità iniziale e delle costanti di velocità del processo di idrolisi a vari pH. Analisi della dipendenza dal pH e identificazione dei processi catalizzati prevalenti nei diversi intervalli di pH esplorati. (b) *Condensazione benzoinica catalizzata da sali di tiazolio*. Determinazione della velocità iniziale di formazione del benzoino al variare della concentrazione di reagente (benzaldehyde) e catalizzatore. Determinazione dell'ordine di reazione rispetto al reagente ed al catalizzatore. Uso di queste informazioni per proporre una legge cinetica approssimata e un possibile intermedio della reazione. (c) *Studio della reazione di deacilazione di un intermedio acil-enzima*. Acilazione della chimotripsina con *trans*-cinnamoil imidazolo. Determinazione delle costanti di velocità di idrolisi dell'intermedio acil-enzima a diversi pH. Analisi della dipendenza delle costanti di velocità in funzione del pH. Identificazione del gruppo coinvolto nel processo catalitico.