

# CONTENUTI DELLA LEZIONE DI OGGI:

## 1. Isomeria

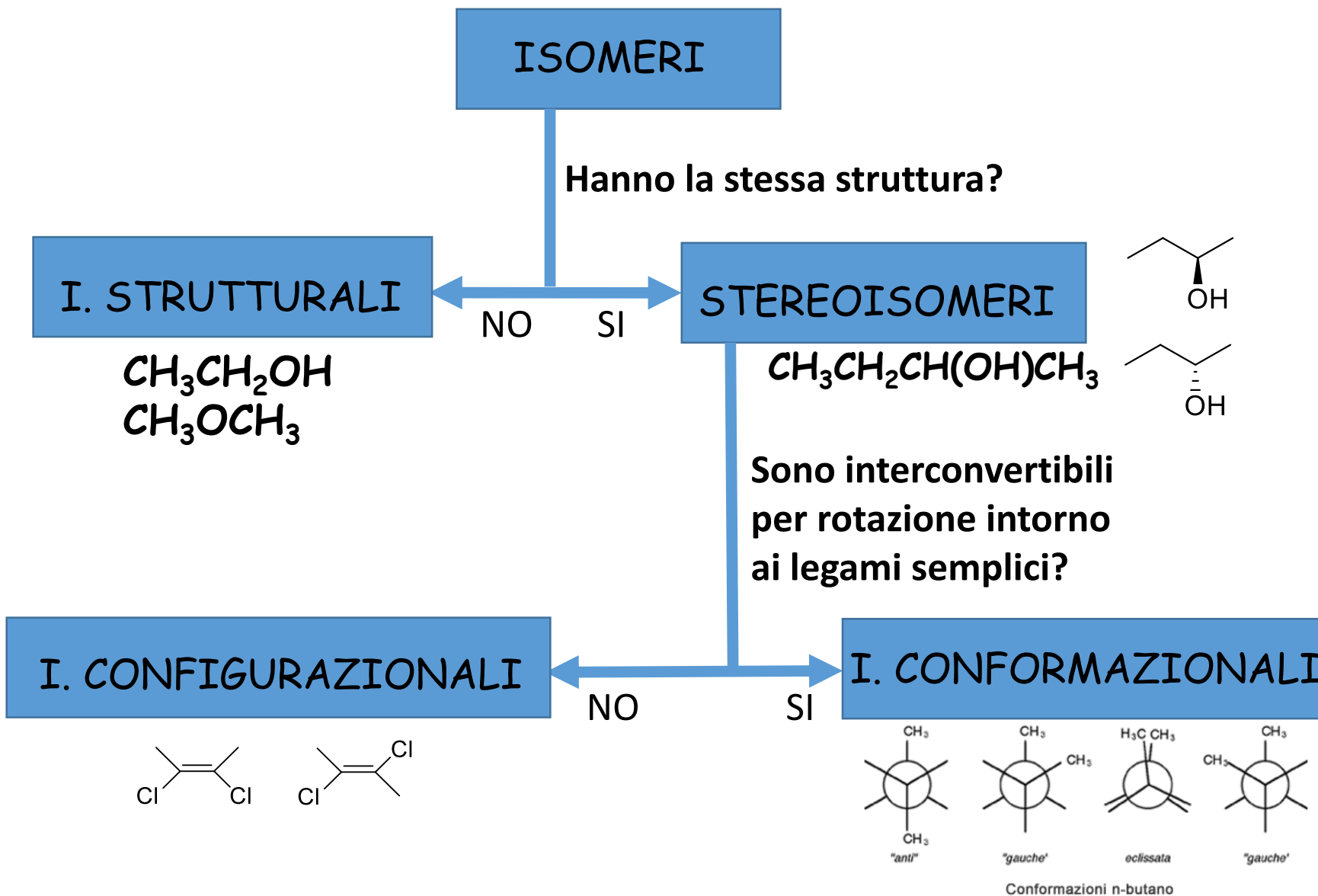
(chiralità, enantiomeri, configurazione assoluta, nomenclatura R, S)

## 2. Risoluzione racemo

## 3. Meccanismo reazione enzimatica (lipasi)

# ISOMERIA

# RIASSUNTO ISOMERIA - parte 1/3



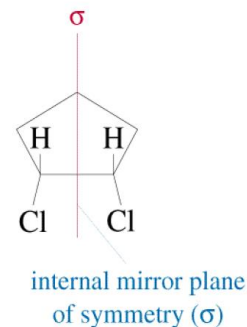
# RIASSUNTO ISOMERIA - parte 2/3

- \* Oggetto/molecola chirale:  
NON sovrapponibile alla sua immagine speculare  
(ENANTIOMERO)
- \* DIASTEREOISOMERI:  
i. configurazionali che NON sono enantiomeri
- \* Tipico centro **CHIRALE** o **STEREOGENICO**:  
atomo di carbonio tetraedrico con 4 sostituenti diversi



Se c'è un centro **CHIRALE** non è detto che la molecola sia chirale, dipende dalla presenza di piani di simmetria (vedi anche composti *meso*)

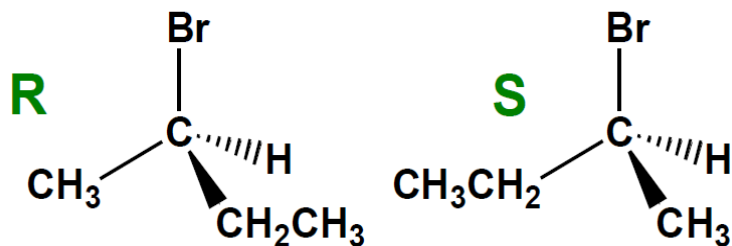
→ *Verificare che l'immagine speculare NON sia sovrapponibile*



# RIASSUNTO ISOMERIA - parte 3/3

\* Enantiomeri sono composti diversi → nomi diversi

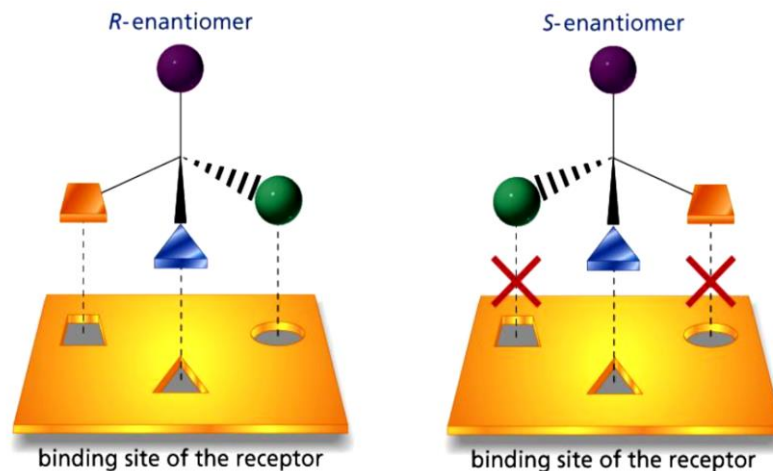
\* NOMENCLATURA R,S  
(indica la configurazione assoluta)  
regole Cahn-Ingold-Prelog



# PROPRIETA' ENANTIOMERI- parte 1/2

- \* Stesse proprietà chimico-fisiche:  
punto ebollizione, punto di fusione, densità, indice di rifrazione, ecc.
- \* Differenti direzioni di rotazione della luce polarizzata (attività OTTICA)  
NON c'è correlazione tra configurazione R,S e +,-
- \* Differenti interazioni con composti e ambienti chirali:  
enzimi, recettori (sapore, odore, ecc.),

*Diastereoisomeri o diastereomeri  
hanno diverse proprietà  
(p.e., p.f., solubilità, ecc.)*



# PROPRIETA' ENANTIOMERI- parte 2/2

## ATTIVITA' OTTICA:

- le molecole chirali sono in grado di ruotare il piano della luce polarizzata
- sono dette «otticamente attive»
- l'effetto si misura con il **POLARIMETRO**
- si definisce «potere rotatorio»  $\alpha$  l'angolo di cui viene ruotato il piano della luce polarizzata in condizioni standard
- enantiomeri ruotano la luce polarizzata dello stesso angolo ma in direzioni opposte

### Potere rotatorio specifico

$c = 1 \text{ g/ml}$

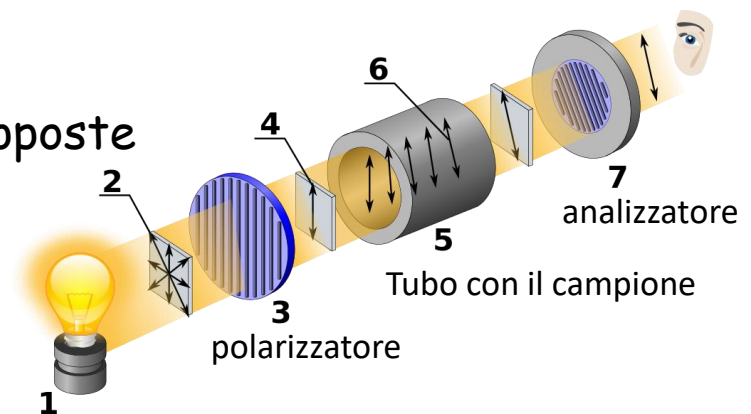
$l = 1 \text{ dm}$

$T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$

$\lambda = 589 \text{ nm}$  (linea D del sodio)

per **soluzioni** tipicamente si usa **c in g/100 ml**

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$



NOTA: per peptidi e proteine si usa invece il **dicroismo circolare** che sfrutta la luce polarizzata circolarmente

# PROPRIETA' ENANTIOMERI- parte 2/2

## ATTIVITA' OTTICA:

Misure polarimetriche forniscono valori di **purezza ottica**

$$P = 100 [\alpha] / [\alpha]_{\max}$$

Con  $[\alpha]_{\max}$  valore di riferimento dell'enantiomero puro

- si definisce «**potere rotatorio**»  $\alpha$  l'angolo di cui viene ruotato il piano della luce polarizzata in condizioni standard

### Potere rotatorio specifico

$c = 1 \text{ g/ml}$

$l = 1 \text{ dm}$

$T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$

$\lambda = 589 \text{ nm}$  (linea D del sodio)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

$$[\alpha]^\lambda = \frac{100 \alpha}{l c}$$

per soluzioni tipicamente si usa  $c$  in g/100 ml

NOTA: per peptidi e proteine si usa invece il **dicroismo circolare** che sfrutta la luce polarizzata circolarmente



MISCELA DI ENANTIOMERI

# RISOLUZIONE E CARATTERIZZAZIONE ENANTIOMERI

Se svolgiamo una reazione stereoselettiva su un racemo, occorre:

- Calcolare eccesso enantiomerico
- Configurazione relativa e/o assoluta dello stereoisomero maggioritario

# RISOLUZIONE E CARATTERIZZAZIONE ENANTIOMERI

Se svolgiamo una reazione stereoselettiva su un racemo, occorre:

- Calcolare **eccesso enantiomerico**

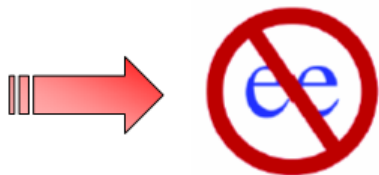
$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100 \text{ (se } R > S)$$

o più semplicemente:

ee = differenza tra % enantiomeri

$$(96,5 \% - 3,5\% = 93\%)$$

$$\%[R] = \frac{[R]}{[R] + [S]} \times 100 = \frac{100 - ee\%}{2} + ee\%$$



Se ee= 93% allora [R] = 96,5 Cioè il 93% è R e il 7% è racemo

Se ee=100% il prodotto viene definito **enantiomericamente puro**

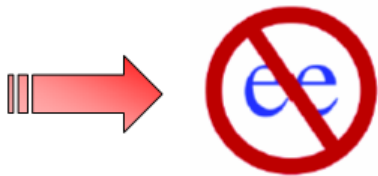
# RISOLUZIONE E CARATTERIZZAZIONE ENANTIOMERI

Se svolgiamo una reazione stereoselettiva su un racemo, occorre:

- Calcolare **rapporto enantiomerico**

Il **rapporto enantiomerico** è stato espresso sia come **numero**:  $q$  (rapporto relativo, cioè con denominatore 1), sia come rapporto normalizzato a percentuale, detto **composizione enantiomerica**, e.c.

La selettività di una reazione  $s$  può essere espressa col rapporto enantiomerico  $E$  che per reazioni irreversibili è riconducibile a  $c$  = conversione della reazione ed  $ee_s$  (substrato) ed  $ee_p$  (prodotto)



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

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

<http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/cgi-bin/enantio.pl>

# RISOLUZIONE E CARATTERIZZAZIONE ENANTIOMERI

## CARATTERIZZAZIONE:

1. Su enantiomeri NON separati (ad es. GC chirale, polarimetria)
2. Su enantiomeri separati ( ad es. GC chirale, polarimetria)
3. Su derivati diastereoisomeri NON separati (ad es. NMR)
4. Su derivati diastereoisomeri separati (ad es. NMR)

OGNI TECNICA HA VANTAGGI/SVANTAGGI ed ERRORI

## RISOLUZIONE:

**Risoluzione diretta** Basata sull'impiego di fasi stazionarie chirali o nel caso della LC fasi mobili chirali

**Risoluzione indiretta** Basata sulla conversione degli enantiomeri in derivati diastereoisomerici mediante reazione con un agente chirale enantiomericamente puro

# CARATTERIZZAZIONE DI ENANTIOMERI

polarimetria

GC

NMR

# Polarimetria

E' il metodo più semplice ma non è molto preciso né molto affidabile.

**Sperimentalmente** si basa sul confronto del potere ottico rotatorio con un valore noto e presunto essere quello del campione puro

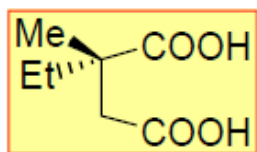
**Teoricamente** si basa sull'esistenza di una relazione lineare tra il potere ottico rotatorio e la composizione enantiomerica secondo l'equazione:

$$ee\% = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{\max}} \times 100$$

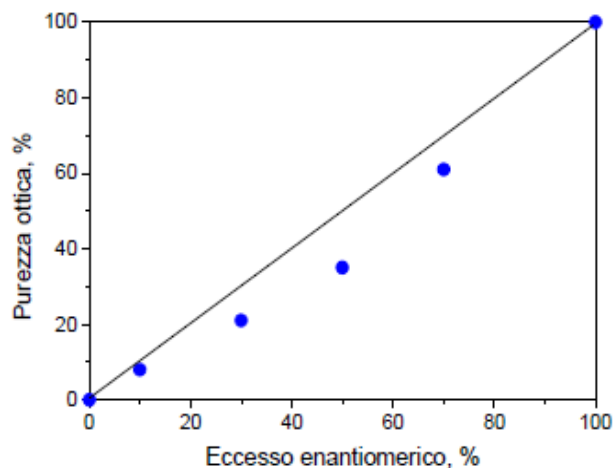
Incertezza circa del 3%

La purezza ottica non sempre è uguale all'eccesso enantiomerico

Perché questo accada non devono essere presenti in soluzione fenomeni di aggregazione



Acido (*S*)-2-etil-2-metil succinico

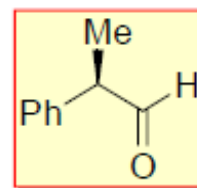
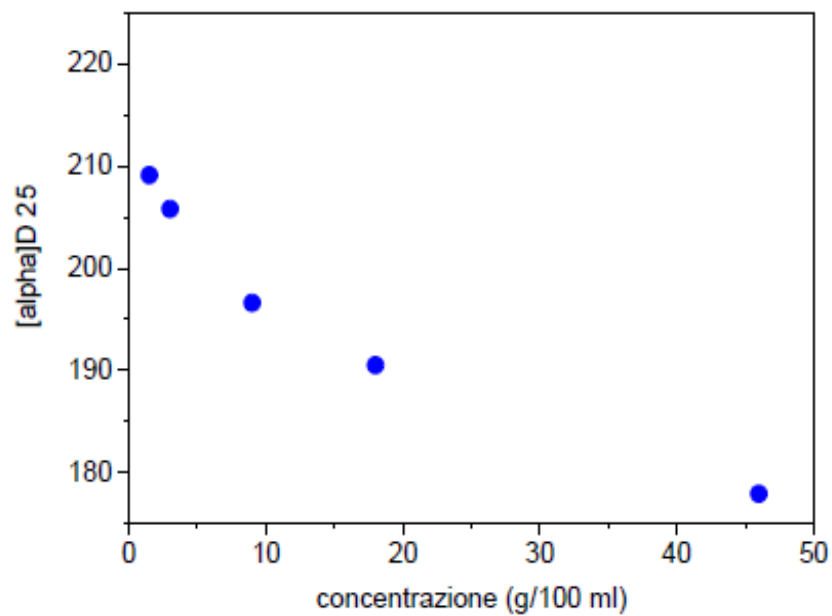


PO non lineare rispetto all'ee

Effetto Horeau



## Variazione del valore dell' $[\alpha]$ al variare della concentrazione



## Cromatografia con fasi chirali (HPLC & GC)

### Vantaggi:

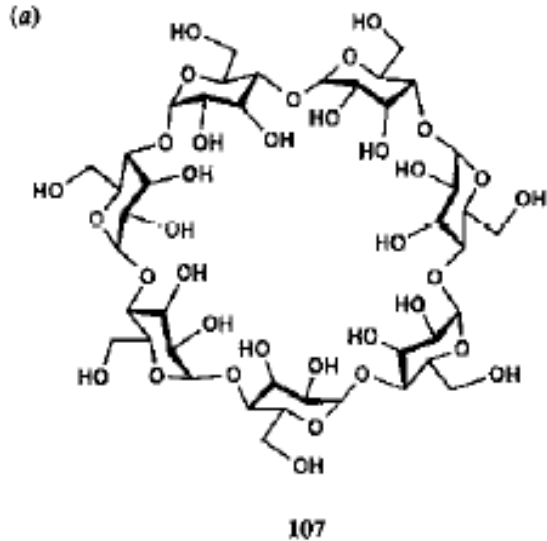
1. Non vi sono problemi di risoluzione cinetica derivanti dalla derivatizzazione con un reagente chirale enantiopuro.
2. L'ordine di eluizione di due enantiomeri può fornirci la configurazione assoluta (se nota o per serie di composti simili).
3. Elevata sensibilità dell'analisi dei rivelatori per HPLC o per GC (eventualmente si può derivatizzare l'analita).
4. Efficace separazione dei due enantiomeri grazie all'uso di tecniche ad elevata efficienza (HPLC e GC) che facilitano l'integrazione. Il metodo è particolarmente adatto per analizzare campioni ad elevato arricchimento enantiomerico.

### Modo d'uso:

1. Analisi del racemo e ottimizzazione della separazione
2. Confronto con un campione a configurazione nota
3. Pre-trattamento del campione da analizzare senza influenzarne le caratteristiche.

# analisi GC: colonne chirali Chiraldex

## Processi di inclusione



Alcune molecole per le caratteristiche strutturali hanno la proprietà di includere al loro interno delle molecole ospiti

Interazioni di inclusione host-guest

La cromatografia chirale sfrutta interazioni host-guest altamente stereoselettive.

$\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - ciclodestrine funzionalizzate

## Fasi chirali contenenti ciclodestrine

Le ciclodestrine sono dei oligosaccaridi ciclici derivanti dall'azione del microorganismo *Bacillus macerans* sull'amido.

Contengono 6 o più unità  $\alpha$ -(D)-glucopiranosidiche legate mediante legami  $\alpha$  1,4-glicosidici.

6 unità  $\rightarrow$   $\alpha$ -ciclodestrina

7 unità  $\rightarrow$   $\beta$ -ciclodestrina

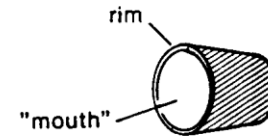
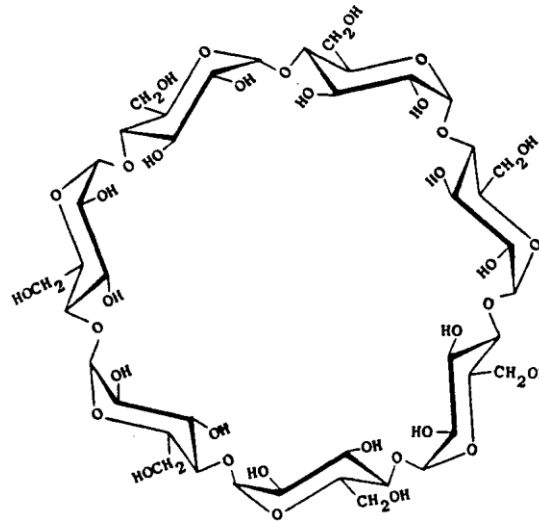
8 unità  $\rightarrow$   $\gamma$ -ciclodestrina

Diametro cavità

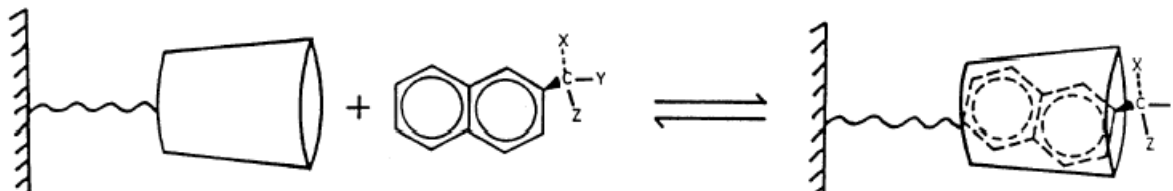
$\alpha$ -CD: 4.7-5.2 Å

$\beta$ -CD: 6.0-6.5 Å

$\gamma$ -CD: 7.5-8.5 Å



- La conformazione del macrociclo presenta una struttura toroidale sia allo stato solido che in soluzione.
- L'apertura più ampia è occupata solo da gruppi ossidrilici secondari
- L'apertura opposta più piccola è occupata da gruppi ossidrilici primari.
- La **cavità interna è idrofobica** per l'assenza di gruppi ossidrilici
- **Le estremità sono idrofile** per la presenza di gruppi ossidrilici.



## Risonanza magnetica nucleare (NMR)

Essendo equivalenti per simmetria due enantiomeri danno Spettri NMR identici

Tuttavia in presenza di un agente enantiopuro che interagisce in modo non-covalente con gli enantiomeri, questi possono dare dei segnali diversi dalla cui integrazione si può risalire all'ee

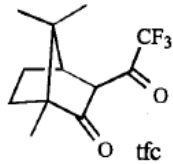
I due principali tipi di additivi chirali enantiopuri sono:

- Chiral Shift Reagents (CSR)
- Chiral Solvating Agents (CSA)

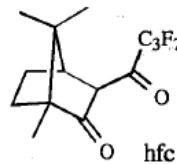
Nelle condizioni migliori il metodo ha un'accuratezza del 2%.

# Chiral Shift Reagents (CSR)

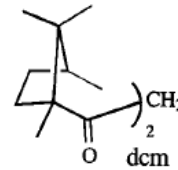
## Leganti



Trifluoroacetil canfora



Eptafluorobutanoil canfora



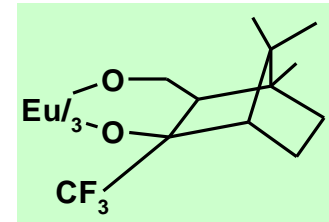
Dicanforil metano

Lantanide shift reagents: tris complessi di β-dichetonati

## Complessi ottaedrici:

Europio (Eu) Praseodimio (Pr); Itterbio (Yb)

**Uso di reagenti di shift otticamente attivi basati su lantanidi:** i complessi paramagnetici formati da β-dichetoni con ioni metallici quali Eu<sup>3+</sup>, Pr<sup>3+</sup> interagiscono con composti contenenti gruppi elettron-donatori come **ammine, alcoli, chetoni, esteri** dando luogo ad uno shift a campi bassi dei nuclei che sono vicini al sito di interazione. Se il complesso è formato da un composto otticamente attivo si creeranno **relazioni diastereoisomeriche** con i due enantiomeri del composto da analizzare



tris(3-trifluoro-  
metilidrossimetileno)(+)  
camforato-europio(III)]

# METODI DI DERIVATIZZAZIONE per caratterizzare e separare una miscela di enantiomeri

enzimi

derivatizzazione (diastereomeri)

# Tecniche enzimatiche

Le reazioni enzimatiche sono altamente stereoselettive .

**Vantaggi:** è possibile determinare un enantiomero presente allo 0.1% in presenza del 99.9 % del suo antipode ottico.

**Svantaggi:** non tutti i composti sono substrati di enzimi.  
Non tutti gli enzimi sono facilmente disponibili.

## Risoluzione cinetica

Resa massima teorica: 50%

In alcuni casi  $k_S \gg k_R$ , si trasforma solo uno dei due enantiomeri

Cinetiche di risoluzioni enzimatiche (Sih)

Selettività di una risoluzione = E = Enantiomeric Ratio

$$\text{Enantiomeric Ratio } E = \frac{v_A}{v_B} = \frac{\left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}\right)_A}{\left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}\right)_B} \quad \Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E$$

**Eutomero:** enantiomero con la massima reattività

**Distomero:** enantiomero con bassa reattività o indesiderata



# Separazione di enantiomeri mediante formazione di diastereoisomeri

## Punti critici :

### ⇒ Purezza ottica del reagente di derivatizzazione

Solo se la p.o. è del 100% i risultati analitici riflettono la composizione enantiomerica.

La presenza dell' enantiomero del reagente chirale altera la determinazione dell'eccesso enantiomerico di A basato sull'integrazione dei picchi dei diastereoisomeri

### ⇒ La reazione di derivatizzazione deve essere quantitativa

### ⇒ Non ci deve essere rischio di

1. epimerizzazioni ed isomerizzazioni
2. arricchimento accidentale di uno dei due diastereomeri (per es. per diversa solubilità)

## Deracemizzazioni

### Svantaggi della risoluzione cinetica

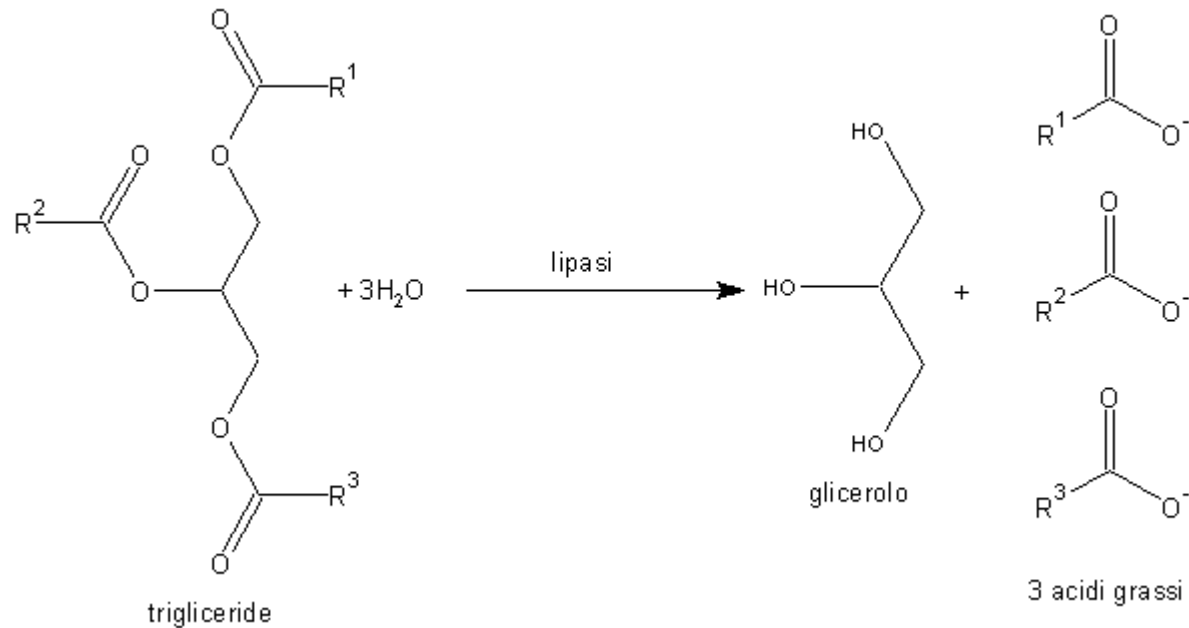
1. Massima resa del 50%.
2. Separazione del prodotto dal substrato può essere complessa e costosa
3. ee dei prodotti non ottimale

Per ovviare a queste problematiche si possono usare diversi approcci:

**Risoluzione ripetuta**  
**Inversione in-situ**  
**Risoluzione dinamica**

Le lipasi tipicamente idrolizzano i trigliceridi in acidi grassi e alcol

Estere carbossilico + acqua  $\rightarrow$  alcol e acido carbossilico



Le lipasi batteriche e fungine sono le più usate a livello industriale perché

- Resistenti
- Facili da produrre tramite fermentazione batterica
- Facili da purificare dal brodo di coltura dei batteri

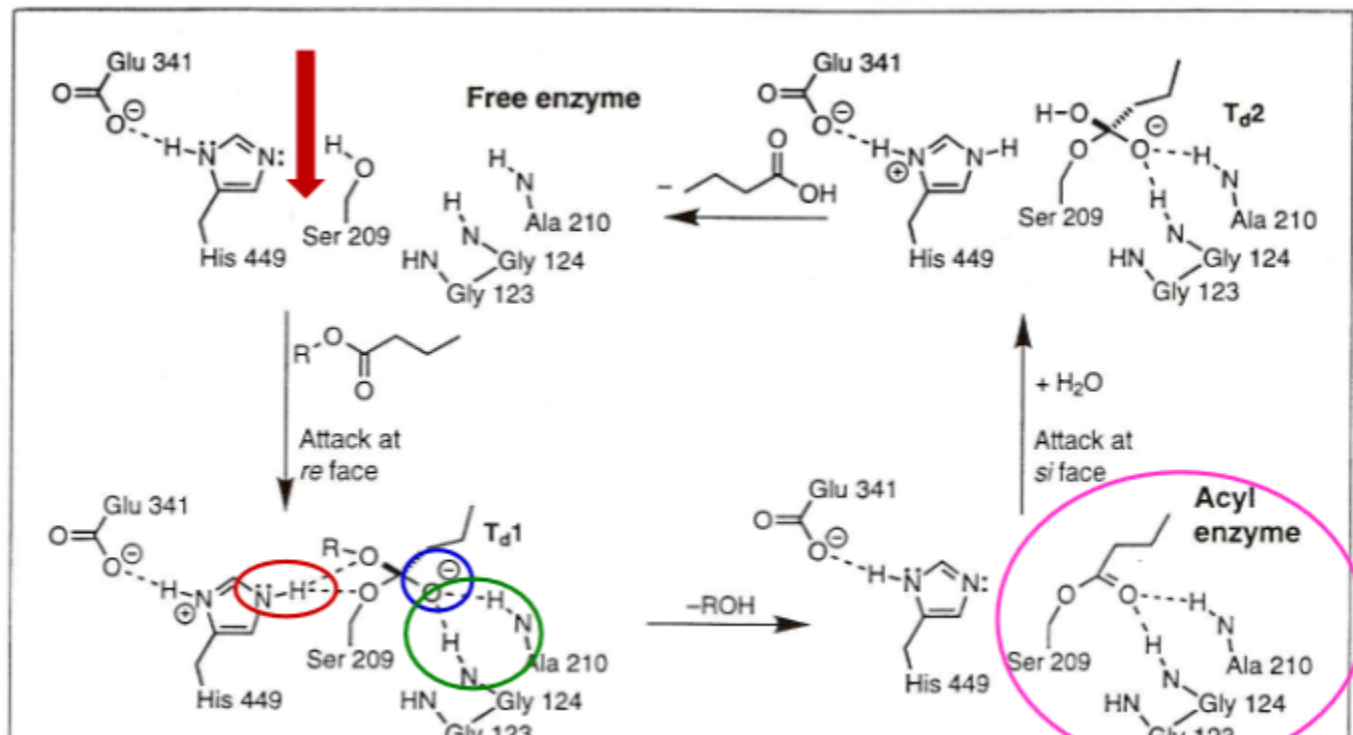
## MECCANISMO D'AZIONE LIPASI

Il sito attivo è formato da una triade catalitica che comprende un nucleofilo, un residuo acido ed un'istidina (come le serin-proteasi ma con un ordine diverso dei residui):

Ser - Asp/Glu - His

1. Il residuo acido protona His
2. His interagisce con la Ser tramite legame H
3. Generazione OSSIANIONE nucleofilo dalla Ser
4. Attacco Nu di Ser sull'estere (substrato)
5. Formazione intermedio tetraedrico stabilizzato da legami H
6. Formazione acyl enzima (His cede H a estere per formare alcol prodotto)
7. Attacco Nu (acqua)

1. Le caratteristiche nucleofile del residuo di Ser sono rafforzate dal **trasferimento di un protone all'His del sito catalitico**, con la formazione di un ossanione che attacca il gruppo carbonilico del legame estereo da idrolizzare. Si forma un intermedio tetraedrico con una **carica negativa sull'atomo di ossigeno carbonilico del legame estereo, che** è stabilizzata attraverso **legami idrogeno** con i gruppi NH della catena principale dell'enzima. Il protone dell'His viene poi trasferito all'ossigeno del legame estereo che viene tagliato e si forma un **acil-enzima** intermedio (residuo di Ser dell'enzima esterificato con l'acido grasso del substrato).
2. La deacilazione dell'enzima avviene ad opera di una molecola d'acqua che idrolizza l'intermedio covalente.



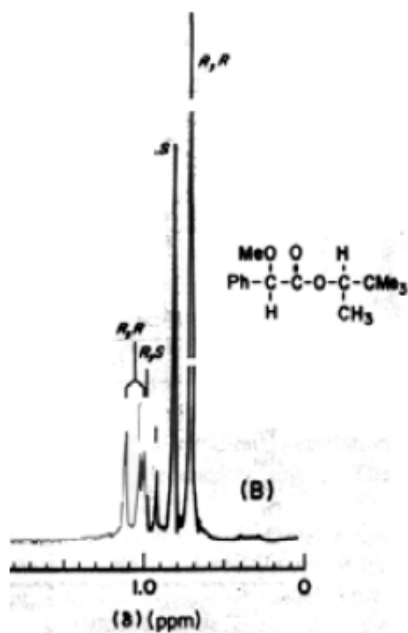
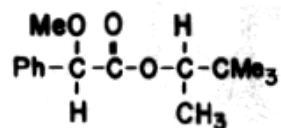
# Chiral Derivating Agents (CDAs)

## Trasformazione degli enantiomeri in diastereoisomeri

### Requisiti:

1. Il CDA deve essere enantiopuro o perlomeno la sua purezza enantiomerica deve essere nota.
2. La reazione del CDA con entrambi gli enantiomeri deve essere quantitativa o perlomeno le velocità relative dei due processi devono essere note
3. Il CDA non deve racemizzare nelle condizioni di derivatizzazione o nel corso dell'analisi e le condizioni di reazioni devono essere sufficientemente blande da non far racemizzare il substrato
4. Per l'analisi NMR il CDA deve avere un gruppo funzionale che fornisce un singoletto e che risuona in zone libere dello spettro per facilitare l'integrazione. Per l'analisi HPLC il CDA deve avere un gruppo cromoforo

## Chiral Derivating Agents (Estere acido mandelico)



$ee = 11.7\%$

