



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΑΝΑΓΩΓΕΣ ΑΚΟΡΕΣΤΩΝ
ΚΑΡΒΟΝΥΛΟ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΤΟΥΣ

ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2013



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GRADUATE PROGRAM
ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS
WITH BIOLOGICAL ACTIVITY

BIOCATALYTIC REDUCTIONS OF
UNSATURATED CARBONYL COMPOUNDS
AND THEIR APPLICATIONS

STERGIOU ANASTASIOS

SUPERVISOR: ASSOS. PROFESSOR SMONOY IOULIA

HERAKLION 2013

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

1. **Σμόνου Ιουλία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
2. **Στρατάκης Εμμανουήλ**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
3. **Κατερινόπουλος Χαράλαμπος**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα», στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας - Βιοκατάλυσης, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, καθώς χωρίς την στήριξη των ανθρώπων αυτών, τίποτε από αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με έκανε δεκτό στο Μεταπτυχιακό του Πρόγραμμα και μου παρείχε την απαραίτητη υλικοτεχνική υποδομή.

Κυρίως, ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ιουλία Σμόνου, η οποία με δέχτηκε στο εργαστήριο, για τις πολύτιμες συμβουλές της σε κάθε βήμα.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κ. Στρατάκη Εμμανουήλ και Κατερινόπουλο Χαράλαμπο, που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή μου επιτροπή.

Θέλω να αναφερθώ ξεχωριστά και να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Άννα Μπαριωτάκη και τον Δρ. Δημήτρη Καλαϊτζάκη. Με βοήθησαν και με στήριξαν στο να εγκλιματιστώ στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο μέρος της παρούσας διατριβής στηρίζεται στη συνεργασία μας, η οποία ήταν υποδειγματική και τους ευχαριστώ που με εμπιστεύθηκαν από τον πρώτο κιόλας καιρό, συμβουλευόντάς με και καθοδηγώντας με.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους και φίλους, εντός και εκτός του Τμήματος Χημείας, με τους οποίους μοιραστήκαμε καλές και δύσκολες στιγμές και που με τον ένα ή τον άλλο τρόπο με στήριξαν ή βοήθησαν στην πραγμάτωση της διατριβής αυτής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Στεργίου Αναστάσιος

Ημ/α Γέννησης: 18 Ιουνίου 1987

Τόπος Γέννησης: Χολαργός, Αθήνα, Ελλάδα

Email: tasos_mo@yahoo.gr , tasos.chemistry@gmail.com

Εκπαίδευση

2010-έως σήμερα: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Οργανική Χημεία,
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, Ιουλία Σμόνου

2005-2010: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πάτρας

Ξένες Γλώσσες

2010: E.C.D.L. ισότιμο (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πάτρας)

2002: Mittelstufe Prüfung, Goethe Institut

2001: 1ST Certificate in English, Cambridge

2000: Zertifikat Deutsch, Goethe

Εμπειρία

2010-2013: Μεταπτυχιακή Διατριβή “ *Βιοκαταλυτικές αναγωγές ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων και εφαρμογές τους*” υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

2009-2010: Πτυχιακή Διπλωματική Εργασία “*Εφαρμογή και σύγκριση της βιοχημικής μεθόδου FACE και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης για ανάλυση θειικής χονδροϊτίνης σε βιολογικά δείγματα*”, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Νίκου Καραμάνου, Τμήμα Χημείας,

Πανεπιστήμιο Πάτρας

Παράδοση τριών διαλέξεων με θέματα: “στοχευμένη γονιδιακή θεραπεία”, “αντικατάσταση των σημερινών βιομηχανικών μεθόδων σύνθεσης, με νέες «πράσινες» μεθόδους”, “παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω βακτηρίων”.

2008-2009: Εργαστηριακός βοηθός στα προπτυχιακό Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πάτρας

2011-2012: Εργαστηριακός βοηθός στα προπτυχιακό Εργαστήριο Οργανικής Χημείας II και Γενικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Συνέδρια

26-28 Απρίλη 2010: “11th Symposium of Medicinal Chemistry (Drug Discovery and Design)”, Patras, Greece

10-11 Ιούλη 2009: “10th Greek Symposium of Connective Tissue and Matrix”, Patras, Greece

8-10 Μαρτίου 2009: “2nd Greek Symposium of Green Chemistry and Sustainable Development”, Patras, Greece

7-12 Ιουλίου 2013: “18th European Symposium on Organic Chemistry”, Marseille, France

“A highly efficient Oxone Mediated synthesis of α -ketoesters and 1,2-diketones”-Poster Title

Δημοσιεύσεις

“Oxone Mediated Oxidative Cleavage of β -Ketoesters and 1,3-Diketones to α -Ketoesters and 1,2- Diketones in Aqueous Medium.” Stergiou A., Bariotaki A., Kalaitzakis D. and Smonou I. *Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 78 (14), 7268-7273

CURRICULUM VITAE

Full name: Stergiou Anastasios
Date of Birth: 18 June 1987
Place of birth: Holargos, Athens, Greece
Email: tasos_mo@yahoo.gr , tasos.chemistry@gmail.com

Education

2010-present: MSc student in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Supervisor Prof. I. Smonou.
2005-2010: Bs in Chemistry, Department of Chemistry, University of Patras

Languages

2010: E.C.D.L. equivalent (Department of Chemistry, University of Patras)
2002: Mittelstufe Prüfung, Goethe Institut
2001: 1ST Certificate in English, Cambridge
2000: Zertifikat Deutsch, Goethe

Experience

2010-2013: MSc Diploma Thesis “*Biocatalytic reductions of unsaturated carbonyls and their applications*” elaborated under the supervision of Assos. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete
2009-2010: Senior undergraduate Diploma Thesis “*Implementation and comparison of the biochemical processes of fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) and capillary electrophoresis (CE), for the analysis of chondroitin sulfate, in biological samples*” elaborated under the supervision of Prof. N. Karamanos, Department of Chemistry, University of Patras

I delivered three lectures: “*targeted gene therapy*”, “*replacement of existing industrial methods of synthesis from new "green" methods*”, “*electricity generation by bacteria*”.

2008-2009: Laboratory Assistant in the undergraduate Organic Chemistry and Biochemistry laboratories, Department of Chemistry, University of Patras

2011-2012: Laboratory Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory II and General Chemistry Undergraduate Laboratory

Conferences

26-28 April 2010: “11th Symposium of Medicinal Chemistry (Drug Discovery and Design)”, Patras, Greece

10-11 July 2009: “10th Greek Symposium of Connective Tissue and Matrix”, Patras, Greece

8-10 March 2009: “2nd Greek Symposium of Green Chemistry and Sustainable Development”, Patras, Greece

7-12 July 2013: “18th European Symposium on Organic Chemistry”, Marseille, France

“A highly efficient Oxone Mediated synthesis of α -ketoesters and 1,2-diketones”-Poster Title

Publications

“Oxone Mediated Oxidative Cleavage of β -Ketoesters and 1,3-Diketones to α -Ketoesters and 1,2- Diketones in Aqueous Medium.” Stergiou A., Bariotaki A., Kalaitzakis D. and Smonou I.. *Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 78 (14), 7268-7273

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από δυο μέρη.

Στο **Πρώτο Μέρος** παρουσιάζονται η μελέτη της βιοκαταλυτικής αναγωγής του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα α,β-ακόρεστων καρβόνυλο-ενώσεων και η εναντιοεκλεκτική αναγωγή των κετο-ομάδων α,β-ακόρεστων καρβόνυλο- ενώσεων, με απομονωμένες κετορεδουκτάσες.

Στο **Κεφάλαιο 1** παρουσιάζεται η μελέτη της εναντιοεκλεκτικής αναγωγής α,β-ακόρεστων κετονών, γ,δ-ακόρεστων 1,3-δικετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων με χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών, προς σχηματισμό οπτικώς ενεργών ακόρεστων υδρόξυ ενώσεων. Παράχθηκαν οπτικώς ενεργά προϊόντα με υψηλές έως εξαιρετικές μετατροπές (86 - 100%) και εξαιρετική οπτική καθαρότητα (>99% ee).

Στο **Κεφάλαιο 2** παρουσιάζεται η μελέτη της βιοκαταλυτικής αναγωγής του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα, σε συστήματα α,β-ακόρεστων κετονών, α,β-ακόρεστων 1,3-δικετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων με τη χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών. Τα κορεσμένα προϊόντα σχηματίστηκαν σε μέτριες έως εξαιρετικές αποδόσεις.

Με βάση τις διαφορετικές αυτές δράσεις των κετορεδουκτασών στα συγκεκριμένα υποστρώματα, επιχειρείται μια νέα συνθετική προσέγγιση για την παρασκευή υψηλής καθαρότητας β-κετοεστέρων αρχίζοντας από γ,δ-ακόρεστους κετοεστέρες, μέσω δυο διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot).

Στο **Δεύτερο Μέρος**, περιγράφεται για πρώτη φορά η χρήση του οξειδωτικού συστήματος Oxone / AlCl₃ σε υδατικό διάλυμα, ενός νέου συστήματος που αναπτύχθηκε για την σύνθεση απλών α-κετοεστέρων και 1,2-δικετονών από τους αντίστοιχους β-κετοεστέρες και τις αντίστοιχες 1,3-δικετόνες. Η αποδοτικότητα του συστήματος αυτού ήταν υψηλή έως πολύ υψηλή και με σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις έως τώρα αναφερθείσες συνθετικές μεθόδους.

SUMMARY

This graduate Diploma Thesis consists of two parts.

In the **First Part** the biocatalytic reduction of carbon – carbon double bond of α,β -unsaturated carbonyl compounds and the enantioselective reduction of the keto group of α,β -unsaturated carbonyl compounds with isolated ketoreductases are presented.

In **Chapter 1**, the enantioselective reductions of α,β -unsaturated ketones, α,β -unsaturated 1,3-diketones, γ,δ -unsaturated β -ketoesters and ϵ,ζ -unsaturated β,δ -diketoesters yielding the corresponding hydroxy compounds with high optical purity are presented. These biocatalytic reductions gave optically active products in very good to high conversions (86 – 100%) and excellent optical purity (>99% ee).

In **Chapter 2**, the biocatalytic reduction of carbon–carbon double bonds of α,β -unsaturated ketones, α,β -unsaturated 1,3-diketones, γ,δ -unsaturated β -ketoesters and ϵ,ζ -unsaturated β,δ -diketoesters is presented. The enzymatically derived saturated products were formed in good to excellent yield.

Based on the differences in enzymatic activity of ketoreductases with the specific substrates described above, a new approach for the one pot conversion of γ,δ -unsaturated β -ketoesters to optically active saturated β -hydroxy esters, by the sequential use of two ketoreductases, is also presented.

In the **Second Part**, the oxidative cleavage of β -ketoesters and 1,3-diketones with a new system consisting of Oxone/ AlCl_3 in aqueous medium is first presented. In this oxidative cleavage process, safe and environmentally benign reagents were used. By this straightforward method, various simple α -ketoesters and 1,2-diketones were formed in excellent yields, after a simple purification process. The advantages of the methodology compared to the known synthetic routes are also presented.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α΄ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή	
Ένζυμα στην Οργανική Σύνθεση	2
Κύρια χαρακτηριστικά των Βιοκαταλυτών	3
Η εκλεκτικότητα στις βιοκαταλυτικές μετατροπές	5
Κετορεδουκτάσες (Ketoreductases)	8
Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες	10
Συστήματα αναγέννησης νικοτιναμιδικών συνενζύμων	12
Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής	13
Ene-ρεδουκτάσες (Ene-reductases)	16
Συζήτηση – Αποτελέσματα	
Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων	31
Κεφάλαιο 1	
Εναντιοεκλεκτική αναγωγή α,β-ακόρεστων κετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων, προς σχηματισμό οπτικώς ενεργών ακόρεστων υδρόξυ-προϊόντων με τη χρήση κετορεδουκτασών.	33
Κεφάλαιο 2	
Μελέτη της χρήσης κετορεδουκτασών ως βιοκαταλύτες για την αναγωγή του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα α,β-ακόρεστων κετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων.	46
Σύνθεση οπτικώς καθαρών β-υδρόξυ εστέρων, από γ,δ-ακόρεστους β-κετοεστέρες με τη χρήση δυο κετορεδουκτασών στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot).	61
Πειραματικό μέρος	
Αντιδραστήρια	64
Όργανα	64
Γενικές συνθετικές Μέθοδοι	64

Σύνθεση υποστρωμάτων	68
Προϊόντα ενζυμικών αναγωγών με τις κετορεδουκτάσες	73
Βιβλιογραφία	78

Παράρτημα

Φάσματα ^1H και ^{13}C NMR	86
--	----

B' ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Συνθετικές μέθοδοι 1,2-δικετονών και 1,3-κετοεστέρων	105
--	-----

Συζήτηση – Αποτελέσματα

Το οξειδωτικό σύστημα Oxone / AlCl_3 σε υδατικό διάλυμα ως ένα νέο σύστημα για την σύνθεση απλών α -κετοεστέρων και 1,2- δικετονών από τους αντίστοιχους β -κετοεστέρες και 1,3-δικετόνες	107
---	-----

Μηχανιστική προσέγγιση της αντίδρασης	111
---------------------------------------	-----

Πειραματικό Μέρος

Όργανα και αντιδραστήρια	114
--------------------------	-----

Γενικές μέθοδοι σύνθεσης των αρχικών ενώσεων	114
--	-----

Γενική πειραματική πορεία για την οξειδωτική διάσπαση των β -κετοεστέρων και των 1,3-δικετονών προς τους αντίστοιχους α -κετοεστέρες και 1,2-δικετόνες	119
---	-----

Βιβλιογραφία	124
--------------	-----

Παράρτημα

Φάσματα ^1H και ^{13}C NMR	128
--	-----

ΜΕΡΟΣ Α΄

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένζυμα στην οργανική σύνθεση.

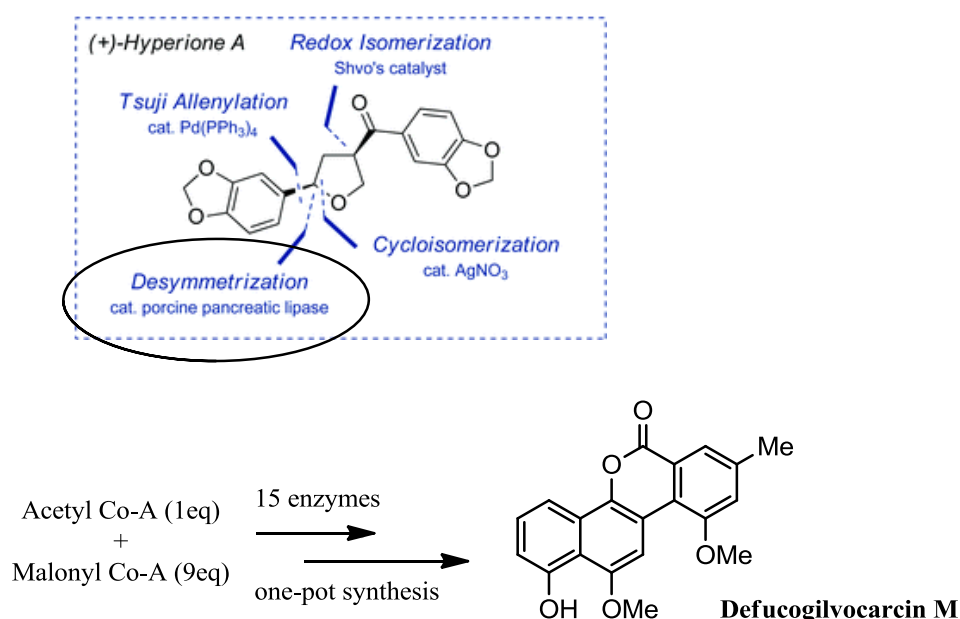
Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την σύνθεση οργανικών μορίων, φυσικών ή μη, με βιολογικό ενδιαφέρον, ωθεί στην σημαντική ανάπτυξη του κλάδου της συνθετικής οργανικής χημείας. Η προσπάθεια για την αύξηση της ταχύτητας και της εκλεκτικότητας των χημικών αντιδράσεων, οδηγεί συνεχώς στην ανάπτυξη νέων καταλυτών για να επιτευχθούν οι στόχοι αυτοί. Το μεγαλύτερο ερευνητικό βάρος, ειδικά τις προηγούμενες δεκαετίες, πέφτει στην σύνθεση χημικών καταλυτών, που συνήθως αποτελούν σύμπλοκα των μετάλλων μετάπτωσης, όπως Co, Ni, Fe, Mn, Os, Ir, λανθανίδια κλπ.¹ Ειδικά στις περιπτώσεις που οι καταλύτες αυτοί εμπλέκονται σε αντιδράσεις ασύμμετρης σύνθεσης διαθέτουν, ένα ή παραπάνω οπτικά ενεργούς υποκαταστάτες. Η πλειοψηφία των καταλυτών αυτών έχουν το πλεονέκτημα ότι διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες και είναι σχετικά σταθεροί σε απαιτητικές συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης κλπ.²

Την τελευταία όμως δεκαετία, τόσο οι ερευνητικές προσπάθειες, όσο και οι βιομηχανικές εφαρμογές, προσανατολίζονται στον περιορισμό των μεθόδων που επιβαρύνουν ή ευθύνονται για τη μόλυνση του περιβάλλοντος, κατ'επέκταση οι οργανικές συνθετικές μέθοδοι, έχουν αρχίσει να προσαρμόζονται στα νέα δεδομένα. Μεγάλες προσπάθειες καταβάλλονται για τον περιορισμό των οργανικών διαλυτών και την αντικατάστασή τους από υδατικούς διαλύτες και ιδανικά από το νερό, τον περιορισμό τοξικών αντιδραστηρίων και καταλυτών. Ένας άλλος επιπλέον παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο είναι η κατά το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση του κόστους των διεργασιών αυτών. Οι χημικοί καταλύτες εμπíπτουν, συνήθως, σε όλες τις απαγορεύσεις και περιορισμούς.

Η νέα πρόκληση και πραγματική δυνατότητα στις μέρες μας, είναι η χρήση πρωτεϊνικών καταλυτών και κυρίως ενζύμων. Τα ένζυμα, πολλές φορές είναι δύσκολο έως αδύνατο να καταλύσουν αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες και γι αυτό δεν χρησιμοποιούνταν επί δεκαετίες. Πλέον, η δυνατότητά τους να καταλύουν χημικές μετατροπές με υψηλή χημειο-, τοπο- και στερεο- εκλεκτικότητα, σε ρυθμιστικά υδατικά διαλύματα, τα φέρνει στην πρώτη γραμμή του ερευνητικού ενδιαφέροντος, στις νέες συνθήκες που διαμορφώνονται.³ Η συνεχής απομόνωση και χαρακτηρισμός νέων ενζύμων, οι τεχνικές του ανασυνδυσμένου DNA, η πρωτεϊνική βιοτεχνολογία και όλα τα μεγάλα βήματα που έχουν γίνει στους κλάδους αυτούς, δημιουργούν μεγάλες δυνατότητες και νέα εργαλεία για τους οργανικούς συνθετικούς χημικούς. Η

ανάπτυξη χημειοενζυμικών μεθόδων (chemoenzymatic processes), αλλά και η αποκλειστική χρήση ενζύμων για την ολική σύνθεση φυσικών προϊόντων (enzymatic total synthesis) είναι πλέον δυνατές.

Στο Σχήμα 1, παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (+)-Hyperione A,⁴ που εντοπίζεται στον μικροοργανισμό *Hypericum chinense* και η πλήρως ενζυμική και στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot) σύνθεση του προϊόντος Defucogilvocarcin, που εμφανίζει αντιβακτηριδιακή, αντι-φλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση.⁵



Σχήμα 1. Η χημειοενζυμική και ενζυμική σύνθεση των φυσικών προϊόντων (+)-Hyperione A και Defucogilvocarcin M.

Κύρια χαρακτηριστικά των βιοκαταλυτών.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των βιοκαταλυτών και τα οποία τους διαφοροποιούν από τους υπόλοιπους χημικούς καταλύτες είναι τα εξής⁶:

- Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Γενικά οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι μεγαλύτερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του 10^8 – 10^{10} . Σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της ταχύτητας μπορεί να υπερβεί τον παράγοντα 10^{12} , τιμή την οποία οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να επιτύχουν.⁷ Γενικά οι χημικοί καταλύτες χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 0,1% - 1% σε

σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται για αντίστοιχες ταχύτητες, σε συγκεντρώσεις της τάξης του $10^{-3}\%$ - $10^{-4}\%$, γεγονός που καθιστά τα ένζυμα ιδιαίτερα αποτελεσματικούς καταλύτες.

- Τα ένζυμα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μεταβατικών μετάλλων καθώς είναι αποικοδομήσιμα και λειτουργικά σε υδατικά διαλύματα.

- Είναι ενεργά κάτω από ήπιες συνθήκες όπως σε θερμοκρασία 20–40 °C καθώς και σε pH 5–8. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων μη επιθυμητών αντιδράσεων όπως οι αποικοδομήσεις, ισομεριώσεις, αντικαταστάσεις και ρακεμοποιήσεις.

- Το γεγονός ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες, δίνει τη δυνατότητα της χρήσης ενός αριθμού ενζύμων ταυτόχρονα πραγματοποιώντας πολλά στάδια αντίδρασης σε ένα μόνο εργαστηριακό σκεύος. Αυτό είναι ιδιαίτερα πρακτικό και χρήσιμο στην περίπτωση όπου ένα ενδιάμεσο προϊόν είναι αρκετά ασταθές και είναι αδύνατη η απομόνωσή του ή στην περίπτωση όπου μια ανεπιθύμητη ισορροπία μπορεί να οδηγηθεί προς το επιθυμητό προϊόν συνδυάζοντας δυο συνεχόμενα ενζυμικά στάδια μεταξύ τους.

- Έχουν αρκετά μεγάλη ποικιλία ως προς τα υποστρώματα που μπορούν να δεχτούν, καθώς καταλύουν αντιδράσεις είτε φυσικών είτε τεχνητών μη φυσικών υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση. Μόλις τη δεκαετία του 1980 άρχισε η δυναμική εφαρμογή των φυσικών καταλυτών για τη μετατροπή μη φυσικών οργανικών ενώσεων και από τότε συνεχίζεται με επιτυχία, με αποτέλεσμα την ραγδαία εξέλιξη του πεδίου της βιοκατάλυσης και των βιομετασχηματισμών.

- Με την ύπαρξη αρκετών διαφορετικών ενζύμων, οι βιοκαταλύτες μπορούν να καταλύσουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών αντιδράσεων. Έτσι, τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί από τη Διεθνή Ένωση Βιοχημείας (International Union of Biochemistry) σε έξι κύριες ομάδες:

1. Τις **οξειδοοικοκτάσεις**, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.

2. Τις **τρανσφεράσες** που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων, όπως άκυλο και φωσφορικών ομάδων ή σακχάρων, από ένα μόριο σε άλλο.

3. Τις **υδρολάσες** που καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και

πεπτιδίων.

4. Τις **λυάσεις** που καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.

5. Τις **ισομεράσεις** που καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού όπως τη μετακίνηση διπλών δεσμών, *Z/E* ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.

6. Τις **λιγκάσεις** που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.

Η εκλεκτικότητα στις βιοκαταλυτικές μετατροπές.

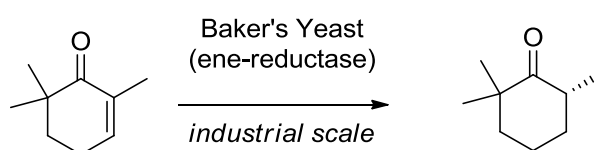
Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα ένζυμα λειτουργούν κυρίως σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, τα αμινοξέα της εξωτερικής επιφάνειας, φέρουν πολικές πλευρικές αλυσίδες, οι οποίες μέσω δεσμών υδρογόνου με το νερό, διαλυτοποιούνται. Το ένζυμο αποκτά την ενεργή μορφή του όταν βρεθεί στο διάλυμα, όταν αποκτήσει την κατάλληλη τρισδιάστατη δομή μέσω των αλληλεπιδράσεων με τα μόρια του διαλύτη. Το ένζυμο μέσα στο διάλυμα, αποκτά ένα εξωτερικό στρώμα νερού που ισούται με το 10% w/w του ξηρού ενζύμου. Ολόκληρη η δομή που αποκτά το ένζυμο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις Van-Der-Waals των αλειφατικών αλυσίδων, π-π αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή γέφυρες αλάτων μεταξύ φορτισμένων ομάδων του μορίου. Εκτός από τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που αποτελούν τον σκελετό του ενζύμου (πρωτεΐνη), ισχυροί τέτοιοι δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ ατόμων S (S – S) και ονομάζονται δισουλφιδικοί δεσμοί.⁸ Τέτοιοι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί, καθώς ανάλογα με τον αριθμό δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο επηρεάζεται η σταθερότητά του στη θερμοκρασία. Μεγάλη επιρροή στη θερμοσταθερότητα του ενζύμου έχουν επίσης και οι δεσμοί αλάτων καθώς και τα κατάλοιπα ασπαραγινικού οξέος.

Το ενεργό κέντρο των ενζύμων αποτελείται από αμινοξέα και μόρια νερού που έχουν εισέλθει σε αυτό και αλληλεπιδρούν με ασθενείς δεσμούς, κυρίως υδρογόνου, με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων. Κάθε υπόστρωμα που εισέρχεται στο ενεργό κέντρο, αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα και αποκτά κατάλληλο προσανατολισμό για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Σε πολλές περιπτώσεις οι δυνατοί προσανατολισμοί είναι λίγοι ή ένας μόνο. Αυτό έχει συνέπεια στην εκλεκτικότητα των μετατροπών που καταλύουν τα ένζυμα. Λόγω αυτής της διαμόρφωσης των ενεργών κέντρων των ενζύμων (η οποία στις ημέρες μας μπορεί να σχεδιάζεται εκ

νέου ή να προσαρμόζεται, ως προς το επιθυμητό χαρακτηριστικό), οι βιοκαταλύτες εμφανίζουν την υψηλή χημειο-, τοπο- εναντιο- και στερεο- εκλεκτικότητα.

α) χημειο- εκλεκτικότητα

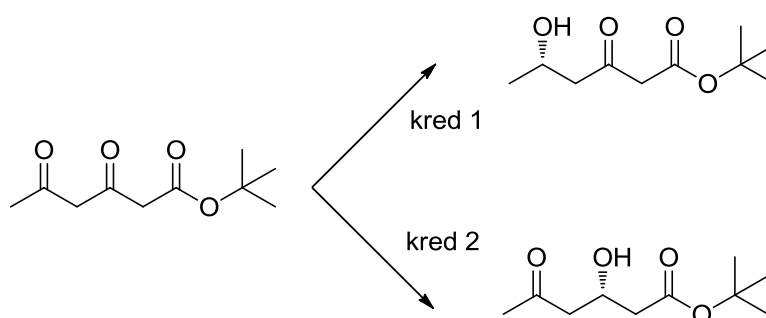
Ο όρος χημειο- εκλεκτικότητα περιγράφει την ικανότητα ενός καταλύτη να επιδρά μόνο σε μια χαρακτηριστική λειτουργική ομάδα, όταν βρίσκονται και άλλες δραστικές λειτουργικές ομάδες στο ίδιο μόριο. Αυτό σημαίνει ότι η μετατροπή οδηγεί σε ένα μοναδικό προϊόν, άρα απουσία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων.⁹



Σχήμα 2. Εκλεκτική αναγωγή της 2,6,6-τριμεθυλκυκλοεξεν-2-ονης με ene-ρεδουκτάσες.

β) τοπο- εκλεκτικότητα

Η τοποεκλεκτικότητα σε μια καταλυτική μετατροπή σημαίνει ότι όταν στο

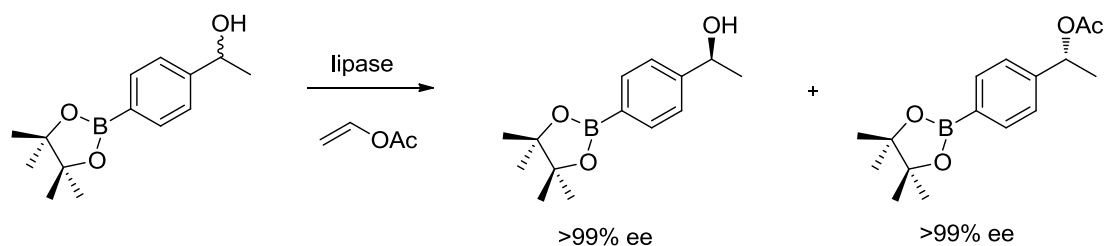


Σχήμα 3. Τοποεκλεκτική αναγωγή β.δ-δικετοεστέρων με κετορεδουκτάσες.

ίδιο μόριο υπάρχουν δυο όμοιες χαρακτηριστικές ομάδες, ο καταλύτης μπορεί να τις διακρίνει ως ξεχωριστές και να μετατρέψει μόνο τη μια (Σχήμα 3).¹⁰ Στην περίπτωση των βιοκαταλυτών, αυτή η ιδιότητα απαντάται συχνότερα σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες.

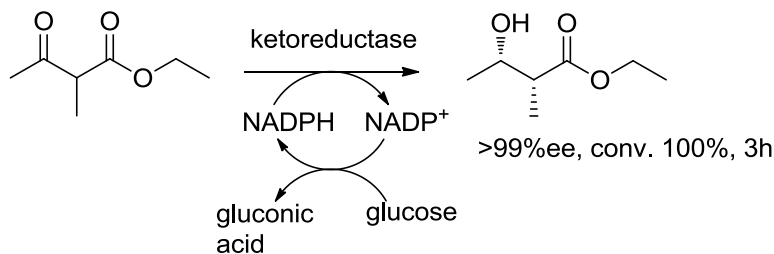
γ) εναντιο- εκλεκτικότητα

Σε πολλές καταλυτικές αντιδράσεις η παραγωγή ενός μοναδικού εναντιομερούς είναι μεγάλης σημασίας. Η εκλεκτικότητα ως προς τη σύνθεση του επιθυμητού εναντιομερούς, ειδικά στην σύνθεση μορίων βιολογικής σημασίας, μπορεί να ικανοποιηθεί από βιοκαταλύτες.¹¹



Σχήμα 4. Χρήση λιπασών για την εναντιο- εκλεκτική εστεροποίηση ρακεμικών αλκοολών.

δ) στερεο- εκλεκτικότητα



Σχήμα 5. Χρήση κετορεδουκτασών για την στερεοεκλεκτική αναγωγή α -υποκατεστημένων β -κετοεστέρων.

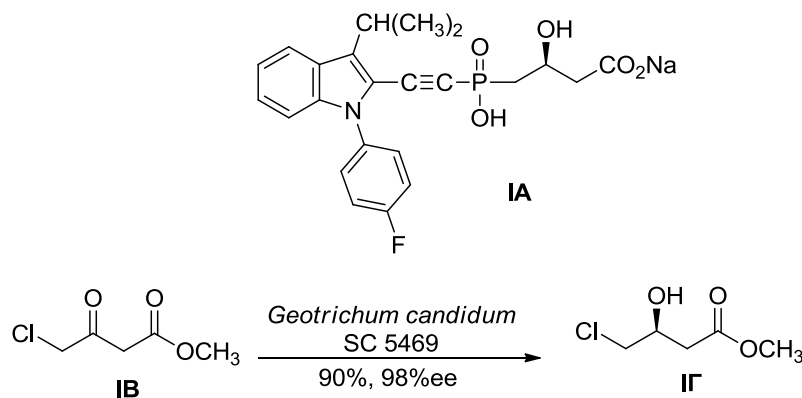
Η υψηλή στερεο- εκλεκτικότητα, στις καταλυτικές μετατροπές, είναι επίσης μεγάλης σημασίας. Η αποκλειστική σύνθεση π.χ. του ενός από τα τέσσερα πιθανά προϊόντα (Σχήμα 5), είναι μια πρόκληση στην οποία οι βιοκαταλύτες ανταποκρίνονται πολλές φορές με τρόπο σχεδόν απόλυτο.¹²

Κετορεδουκτάσες (Ketoreductases)

Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μονομερή ένζυμα, όμως σε μικρό ποσοστό έχουν απομονωθεί και τετραμερείς κετορεδουκτάσες, κυρίως από θηλαστικά.¹³ Ορισμένοι από αυτούς τους βιοκαταλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μέσα στο φυσικό τους περιβάλλον, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και τα κύτταρα (whole cell), οπότε σε αυτή την περίπτωση το απαραίτητο συνένζυμο προμηθεύεται συνεχώς από τα κύτταρα, είτε μετά από την απομόνωσή τους, όπου και απαιτείται η προσθήκη συνενζύμου. Σήμερα τέτοια ένζυμα είναι εμπορικά διαθέσιμα και σε κάποιες περιπτώσεις παράγονται εργαστηριακά σε μικρούς βιο-αντιδραστήρες.

Η φυσική αποστολή αυτών των βιοκαταλυτών είναι η κατάλυση της αναγωγής καρβονυλικών ενώσεων. Τα φυσικά τους υποστρώματα είναι αλκοόλες όπως αιθανόλη, λακτικό, γλυκερόλη κ.τ.λ. καθώς και οι αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά έχουν τη ικανότητα να ανάγουν εναντιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα.

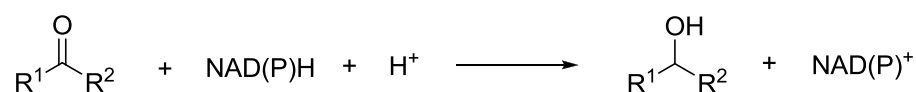
Οι κετορεδουκτάσες έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές συνθετικές πορείες φυσικών προϊόντων,¹⁴ σε φαρμακευτικές ουσίες όπως το αντικαρκινικό φάρμακο Taxol (Paclitaxel),¹⁵ στην σύνθεση ενός αναστολέα της HIV-1 πρωτεάσης¹⁶ και άλλα.¹⁷ Η ένωση ΙΑ είναι ανταγωνιστής της χοληστερόλης. Όπως βλέπουμε στο σχήμα, η ένωση ΙΓ που είναι πρόδρομη χειρόμορφη ένωση της ΙΑ, παράγεται με την ενζυμική αναγωγή του καρβονυλίου του χλωρο-κετοεστέρα ΙΒ.¹⁸



Σχήμα 6. Εναντιοεκλεκτική αναγωγή του 4-χλωρο-3-οξο-βουτανοϊκού μεθυλεστέρα, ως βήμα κλειδί στη σύνθεση του προϊόντος ΙΑ.

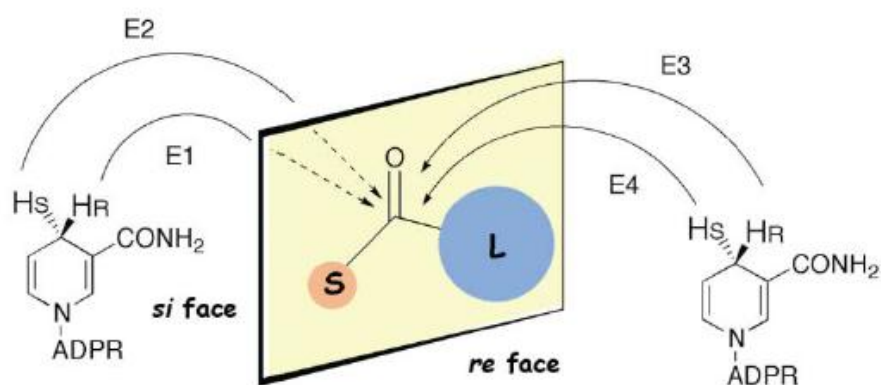
Σε όλες τις περιπτώσεις συνθέσεων που αναφέρθηκαν, τα ποσοστά μετατροπής (conversions) είναι άνω του 75% και συνήθως φτάνουν έως το 100%, η απόδοση των απομονωμένων προϊόντων (yield) είναι άνω του 80% και η εναντιομερική περίσσεια (enantiomeric excess ή ee) από 98% έως >99%.

Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα ένζυμα αυτά απαιτούν τη χρήση συνενζύμων όπως NADH ή NADPH. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του παρακάτω σχήματος:



Σχήμα 7. Γενική ενζυμική αντίδραση αναγωγής μιας καρβόνυλο- ένωσης παρουσία NADPH.

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα¹⁹. Υπάρχουν τα ένζυμα τύπου E1 και E2, με τα οποία η προσβολή του υδριδίου γίνεται από την *si*-επιφάνεια της καρβονυλομάδας και τα τύπου E3 και E4, με τα οποία η προσβολή γίνεται από την *re*-επιφάνεια, προκύπτοντας αντίστοιχα οι *R* και *S* αλκοόλες. Μηχανιστικά τα ένζυμα τύπου E1 και E3 μεταφέρουν το *pro*-(*R*)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ τα τύπου E2 και E4 χρησιμοποιούν το *pro*-(*S*)-υδρίδιο.



Σχήμα 8. Αναγωγή του καρβονυλίου από το συνένζυμο NADPH.

Παραδείγματα ενζύμων τύπου E1 – E3 είναι:

E1: *Pseudomonas* sp. alcohol Dehydrogenase,¹⁹ *Lactobacillus kefir* alcohol Dehydrogenase.²⁰

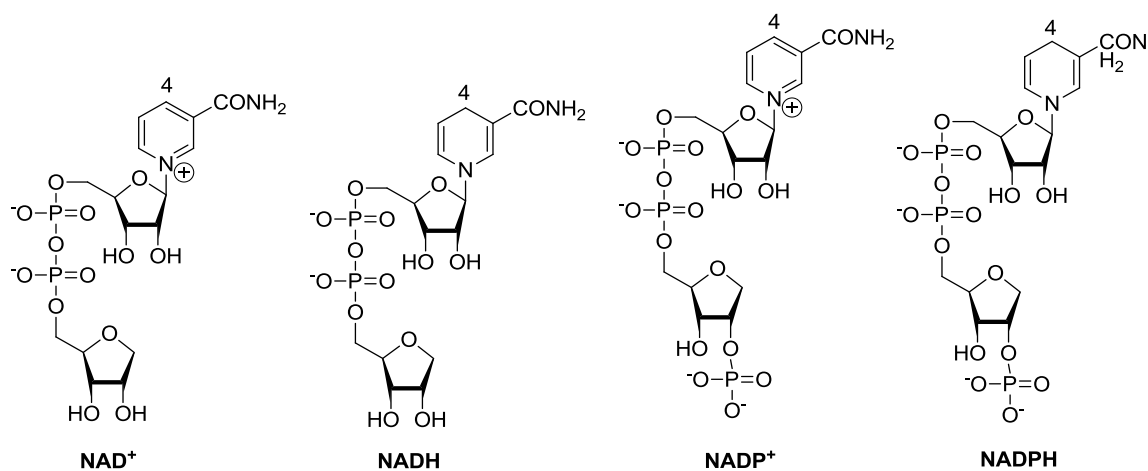
E2: *Geotrihum candidum* glycerol Dehydrogenase,²¹ *Mucor javanicus* dihydroxyacetone reductase.

E3: Yeast alcohol dehydrogenase, Horse liver alcohol Dehydrogenase,²² *Moraxella* sp. alcohol dehydrogenase.²³

E4: Άγνωστη.

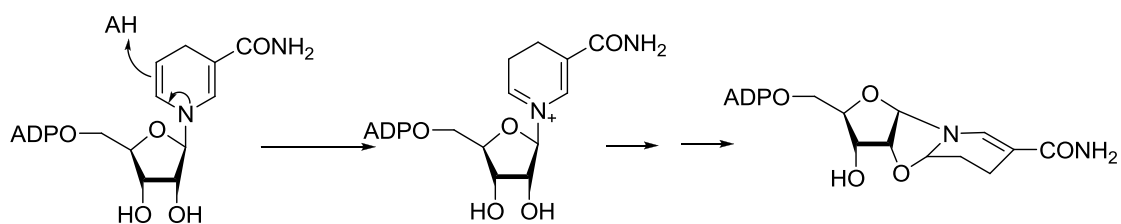
Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες

Το νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD^+) και το 2'-φωσφορυλιωμένο άλας (NADP^+) συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από αφυδρογονάσες. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος των ενώσεων αυτών είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, μπορώντας να δεχτεί ένα υδρίδιο (ή δυο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο) για το σχηματισμό των υδρογονωμένων παραγώγων NADH και NADPH . Η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο NAD(P)^+ , και αυτή από το NAD(P)H σε ένα οξειδωτικό, είναι στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Κάθε ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση C-4 του NAD(P)H σε μια καρβονυλομάδα ενός υποστρώματος.⁸



Σχήμα 9. Το νικοτιναμιδο- αδενινο- δινουκλεοτίδιο και το 2-φωσφορυλιωμένο άλας, στην ανηγμένη και οξειδωμένη τους μορφή.

Η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή των νικοτιναμιδικών συμπαραγόντων είναι και οι δυο αποικοδομήσιμες σε υδατικά διαλύματα. Γενικά οι ανηγμένες μορφές είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, σε αντίθεση με τις οξειδωμένες μορφές που είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα και ασταθείς σε βασικά.²⁴ Γι' αυτό οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7, σε μια ενδιάμεση δηλαδή τιμή σταθερότητας. Η αποικοδόμηση του NAD(P)H σε pH 5-9 κυρίως οφείλεται σε όξινη κατάλυση.^{8, 25}



Σχήμα 10. Αποικοδόμηση των νικοτιναμιδικών συνενζύμων.

Έτσι, πραγματοποιείται πρωτονίωση του νικοτιναμιδικού δακτυλίου στον άνθρακα-5, ακολουθούμενη από γρήγορη μετάθεση σχηματίζοντας κυκλικό αιθέρα.²⁵ Στην περίπτωση του NADPH πραγματοποιείται μια επιπλέον ενδομοριακή κυκλοποίηση στη θέση της 2-φωσφορικής ομάδας. Έτσι σε ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής των συνενζύμων είναι περιορισμένοι. Οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M φωσφορικό νάτριο, σε pH 7.0, 25 °C είναι 27 και 13 ώρες αντίστοιχα. Σε οργανικά όμως ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής αυξάνονται αρκετά. Τέτοια διαλύματα είναι ιμιδαζόλιο, τριαιθανολαμίνη, HEPES και Tris. Έτσι οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M Tris σε pH 7.0 και 25°C είναι 330 και 31 ώρες αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των NAD(P)⁺ το κυριότερο στάδιο για την αποικοδόμησή τους είναι η πυρηνόφιλη προσθήκη στον άνθρακα-4 για το σχηματισμό 1,4-διυδροξυπυριδινικής δομής, πορεία η οποία μπορεί να καταλύεται από ένζυμο. Τα πυρηνόφιλα μπορεί να είναι υποστρώματα ή κάποιες άλλες ενώσεις του διαλύματος. Για παράδειγμα, παρουσία 0,1M πυρουβικού σε pH 7.0 το NAD⁺ έχει χρόνο ημιζωής 6,9 ώρες.²³

Τα συνένζυμα είναι ενώσεις εμπορικά διαθέσιμες εδώ και πολλά χρόνια. Παρόλα αυτά, το κόστος τους είναι αρκετά υψηλό και για αυτό το λόγο απαιτούνται

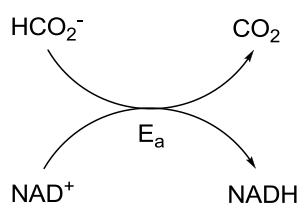
τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού. Ένας τέτοιος τρόπος είναι η χρήση συστημάτων αναγέννησης των συνενζύμων.

Συστήματα αναγέννησης των νικοτιναμιδικών συνενζύμων

Οι εξαρτώμενες από το NAD(P)H ενζυμικές αντιδράσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην οργανική σύνθεση. Παρόλα αυτά όμως οι απαραίτητοι συμπαράγοντες είναι δαπανηροί και αρκετά ασταθείς στο διάλυμα και για οικονομικούς λόγους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στοιχειομετρικές αντιδράσεις μόνο σε μικρή κλίμακα. Για να είναι μια μέθοδος αναγέννησης συνενζύμων αποτελεσματική θα πρέπει να είναι αρκετά εκλεκτική ως προς το υπόστρωμα, σε σχέση με την επιθυμητή ενζυμική αντίδραση, και να έχει την ικανότητα να ανακυκλώνει τον συμπαράγοντα 10^2 – 10^5 φορές. Προς το παρόν, μόνο η ενζυμική κατάλυση παρέχει τέτοια μεγάλη εκλεκτικότητα για την αναγωγή του NAD(P)⁺ σε NAD(P)H. Το μόνο μειονέκτημα των ενζυμικών ανακυκλώσεων είναι η δαπάνη και η περιορισμένη σταθερότητα των ενζύμων.

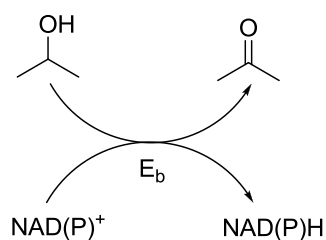
Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση του NADH και NADPH. Τα πιο χρήσιμα συστήματα αναγέννησης είναι:

1. Άλας του μυρμηκικού οξέος/αφυδρογονάση του μυρμηκικού (E_a) από *Candida boidinii*.²⁶



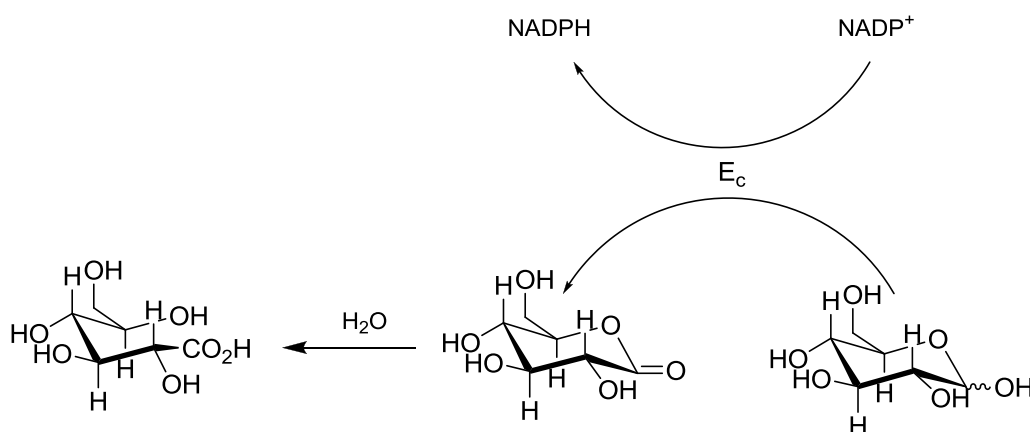
Σχήμα 11. Σύστημα ανακύκλωσης του NADH.

2. Ισοπροπανόλη/αλκοολική αφυδρογονάση (E_b) από *Theromoanaerobium brockii*²⁷ ή *Pseudomonas sp*¹⁸



Σχήμα 12. Σύστημα ανακύκλωσης για το NADH και το NADPH.

3. Γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης (E_c) από *Bacillus*.²⁸



Σχήμα 13. Σύστημα ανακύκλωσης για το NADPH.

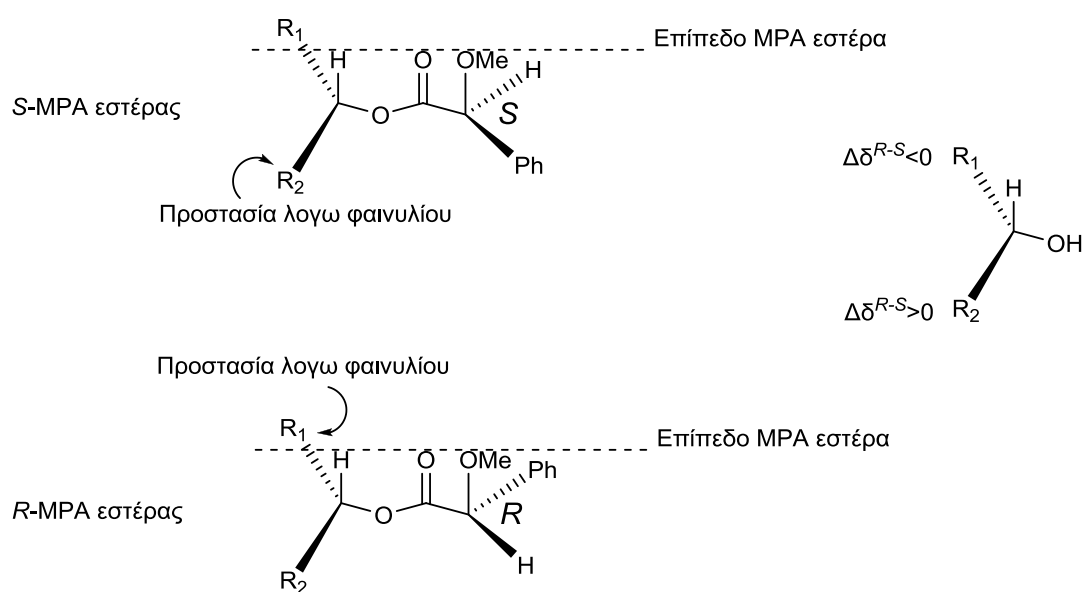
Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται και μια νέα κατηγορία ανακυκλωτικών συστημάτων που δεν περιλαμβάνουν ένα ένζυμο (ένα βιοκαταλύτη), αλλά ένα χημικό καταλύτη. Προς το παρόν δεν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι, τέτοιου τύπου, για τα συνένζυμα NADH και NADPH, περιορίζονται στην ανακύκλωση του φλαβινο-μονονουκλεοτιδίου (FMN) και αποτελούνται από βαρέα μέταλλα που συνήθως απενεργοποιούν την πρωτεΐνη.²⁹

Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων βασίζεται ολοένα και περισσότερο σε απλές και αξιόπιστες μεθόδους. Η κλαστική μέθοδος ανισοτροπίας, την οποία εισήγαγαν και αξιοποίησαν οι Dale και Mosher,³⁰ ο Trost και οι συνεργάτες του³¹ και άλλοι ερευνητές³² συνεχίζει να αποτελεί την απλούστερη και πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών.³¹ Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση

των χημικών μετατοπίσεων στο φάσμα ^1H NMR των δυο διαστερομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστήριου ανισοτροπίας, όπως το α -μεθοξυ- α -τριφθορομεθυλοφαινυλοξικό οξύ (MTPA) ή το α -μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA).

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα διαμόρφωσης για διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας που να εξηγούν τα φάσματα ^1H NMR και να προβλέπουν την απόλυτη στερεοχημεία των ενώσεων. Το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το α -μεθοξυ φαινυλοξικό οξύ (MPA).



Σχήμα 14. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (R)-MPA και (S)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

Το μοντέλο διαμόρφωσης που προτείνεται για το αντιδραστήριο αυτό φαίνεται στο Σχήμα 14. Μετά την εστεροποίηση της δευτεροταγούς αλκοόλης και με τα δυο εναντιομερή του MPA, η διαμόρφωση των MPA-εστέρων βρίσκει το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και την μεθοξυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι κάθε ομάδα της αλκοόλης (R_1 , R_2) έχει απέναντί της ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, είτε υδρογόνο, είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα, η ομάδα R_1 του (R)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα φαινύλιο, ενώ η R_2 ένα υδρογόνο. Αντιθέτως, η ομάδα R_1 του (S)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η R_2 ένα φαινύλιο.

Γενικά οι ομάδες οι οποίες είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο

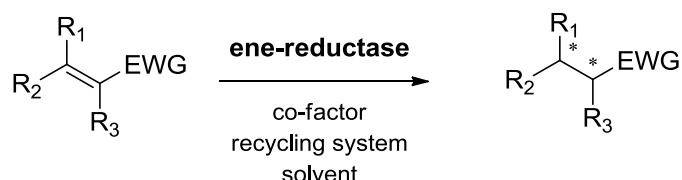
εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα ^1H NMR, λόγω προστασίας. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομάδα R_1 του (*R*)- MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλότερα ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη του (*S*)- MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις στο φάσμα ^1H NMR για την ομάδα R_1 μεταξύ του (*R*)- MPA και του (*S*)- MPA εστέρα να είναι αρνητική ($\Delta\delta^{R-S} < 0$).

Αντιθέτως, για την ομάδα R_2 , στον (*S*)- MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με την αντίστοιχη του (*R*)- MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις για την ομάδα R_2 μεταξύ του (*R*)- MPA και του (*S*)- MPA εστέρα να είναι θετική ($\Delta\delta^{R-S} > 0$). Εξαιτίας των διαφοροποιήσεων αυτών στο φάσμα ^1H NMR μεταξύ του (*R*)- MPA και του (*S*)- MPA εστέρα είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοχημείας των δευτεροταγών αλκοολών.

Η μέθοδος αποδείχθηκε ικανοποιητική για τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς όλες οι κορυφές και οι διαφορές στις μετατοπίσεις ήταν ευδιάκριτες. Επίσης οι διαφορές στις μετατοπίσεις των κορυφών ανάμεσα στα δυο φάσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απόκλιση από το μοντέλο. Εκτός της αξιοπιστίας και της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αυτής, σημαντικά πλεονεκτήματα της είναι και η ευκολία και η ταχύτητα της. Όλα αυτά την καθιστούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής χειρόμορφων δευτεροταγών αλκοολών.

Ene-ρεδουκτάσες (Ene-reductases)

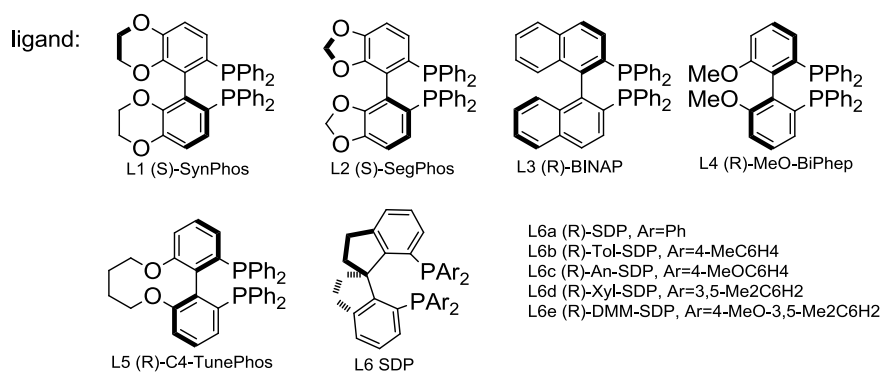
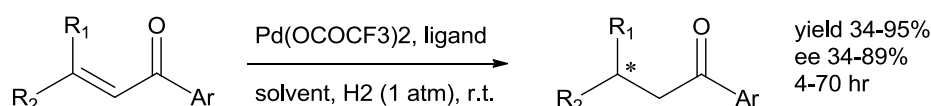
Οι ene-ρεδουκτάσες ⁶, είναι αναγωγικά ένζυμα που εμπλέκονται στην μετατροπή μορίων με ενεργοποιημένους διπλούς δεσμούς άνθρακα – άνθρακα, στα αντίστοιχα κορεσμένα προϊόντα (Σχήμα 15).



EWG: -NO₂, C(O), C(O)OH, C(O)OR₄, F, Cl, Br, I etc

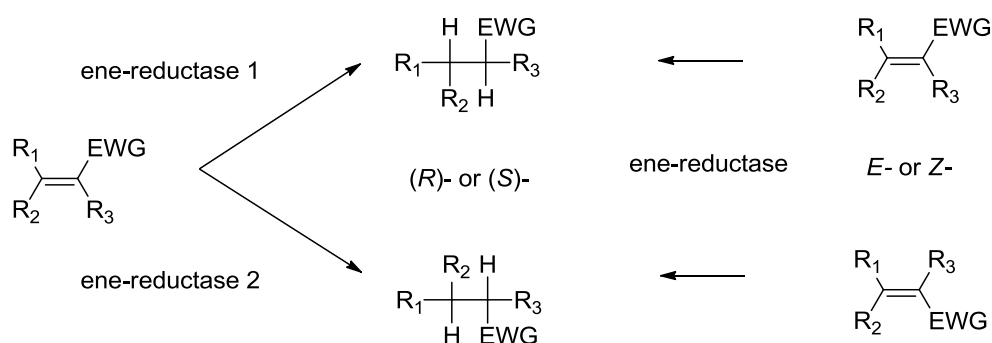
Σχήμα 15. Αναγωγή ενεργοποιημένων διπλών δεσμών με τα ένζυμα ene- reductases προς υψηλής καθαρότητας κορεσμένα προϊόντα με δυο ασύμμετρα κέντρα.

Σε τέτοιες διεργασίες, συνήθως εμπλέκονται χημικοί καταλύτες βαρέων και τοξικών μετάλλων (Ru, Pd, La κλπ), που φέρουν χειρόμορφους υποκαταστάτες (chiral ligands).³³ Μια περίπτωση χημικής ασύμμετρης κατάλυσης παρουσιάζεται και στο Σχήμα 16.³⁴



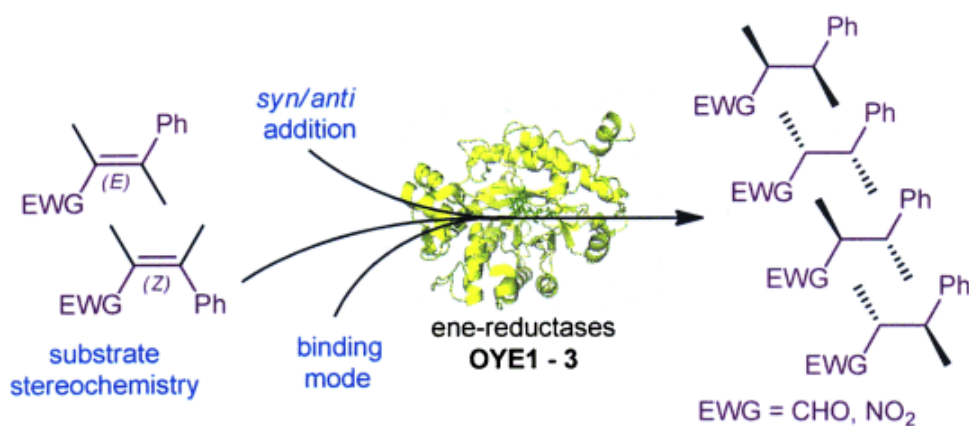
Σχήμα 16. Αναγωγή με χημικούς καταλύτες, α,β- ακόρεστων άρυλο- κετονών προς κορεσμένα προϊόντα με μικρή έως υψηλή οπτική καθαρότητα.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετά παραδείγματα τέτοιων καταλυτών και διεργασιών απλής χημικής αναγωγής³⁵ αλλά και ασύμμετρης αναγωγής³⁶ του διπλού δεσμού άνθρακα – άνθρακα. Αντίστοιχα υπάρχουν και αρκετές εφαρμογές, στις οποίες χρησιμοποιούνται ene-reductases. Περιπτώσεις δηλαδή, όπου ο καταλύτης είναι βιολογικός και συγκεκριμένα ένα ένζυμο.



Σχήμα 17. Εκλεκτική αναγωγή τετρα- υποκατεστημένων ενεργοποιημένων διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα με ene-ρεδουκτάσες. Η μια πορεία είναι εξαρτώμενη από το ένζυμο και η δεύτερη πορεία εξαρτώμενη από την στεreoχημεία (E ή Z) του διπλού δεσμού.³⁸

Η εκλεκτική αναγωγή μόνο του trans ή μόνο του cis διαστερομερούς, δηλαδή μέθοδοι κινητικού διαχωρισμού³⁷ η εναντιο-, τοπο-, διαστερο- εκλεκτική αναγωγή μονο-, δι-³⁸ (Σχήμα 17) τρι- και τετρα-³⁹ (Σχήμα 18) υποκατεστημένων διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα βρίσκονται σήμερα στην ερευνητική αιχμή.



Σχήμα 18. Σύνθεση όλων των πιθανών διαστερομερών και εναντιομερών με τη χρήση ene-ρεδουκτασών.³⁹

Οι διεργασίες αυτές αποτελούν ισχυρά εργαλεία στην συνθετική πορεία πολλών χρήσιμων ενδιάμεσων, χειρόμορφων κυρίως, οργανικών μορίων εργαστηριακής ή ακόμα και βιομηχανικής χρήσης και σημασίας.⁴⁰ Οι ενζυμικές μέθοδοι εμφανίζουν υψηλά πλεονεκτήματα, όπως η απουσία τοξικότητας, οι γενικώς ήπιες συνθήκες αντίδρασης, οι υψηλές αποδόσεις στο επιθυμητό προϊόν, όταν τα πιθανά προϊόντα είναι παραπάνω από ένα. Μοναδικό ίσως μειονέκτημα είναι ότι είναι δύσκολο έως αδύνατο να επαναχρησιμοποιηθούν. Το τελευταίο διάστημα επιχειρείται η προσρόφηση ή σύνδεση των ενζύμων αυτών (αλλά και γενικότερα) σε υλικά όπως silica gel κλπ, με στόχο την αξιοποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων σε συνθήκες ετερογενούς κατάλυσης, με στόχο την εύκολη απομάκρυνση του βιοκαταλύτη από το μίγμα της αντίδρασης και τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης (reusability) του για πέραν του ενός καταλυτικού κύκλου, για εργαστηριακές και βιομηχανικές παρασκευές.⁴¹ Να σημειωθεί εδώ πως, η ακινητοποίηση των ενζύμων δεν είναι πάντα επιθυμητή, καθώς, ορισμένες φορές, κατά την ακινητοποίησή του το ένζυμο στερείται την ικανότητα να αλληλεπιδρά πλήρως με τον διαλύτη (κυρίως νερό), με συνέπεια να μην έχει την ιδανική διαμόρφωση, πράγμα που έχει επιπτώσεις στην δραστηριότητά του. Ωστόσο, αποτελεί λύση για να ξεπεραστούν προβλήματα όπως, η μειωμένη σταθερότητα ορισμένων ενζύμων σε διάφορους διαλύτες, η επαφή με άλλα αντιδραστήρια κλπ.

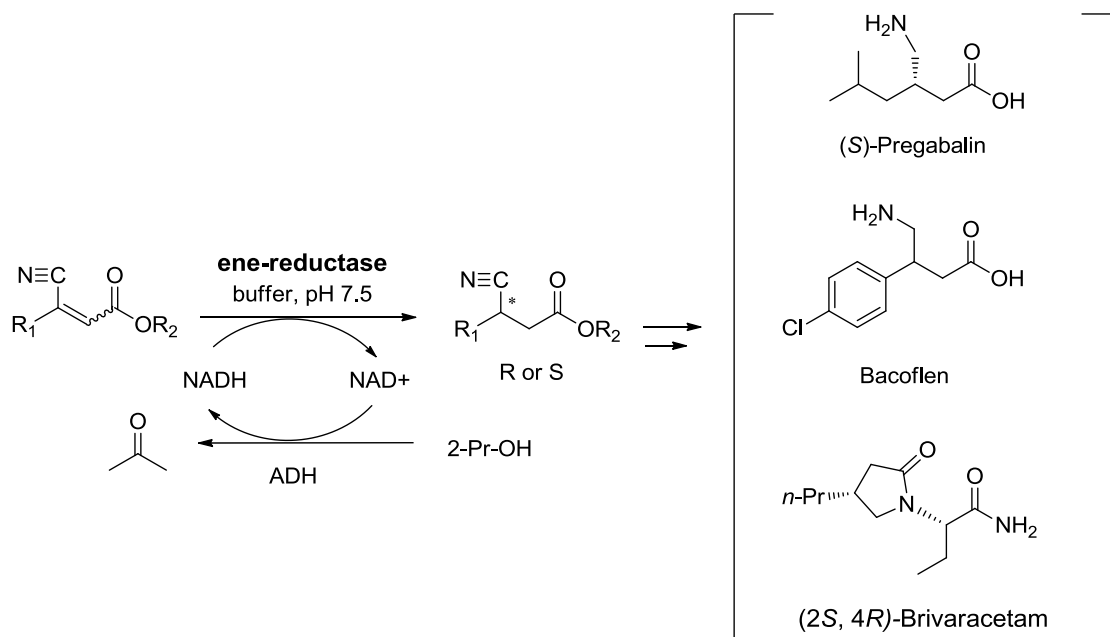
Σε κάθε περίπτωση όμως, γίνεται φανερό ότι μια τέτοια βιοκαταλυτική μετατροπή ενεργοποιημένων διπλών δεσμών, οδηγεί είτε σε απλά κορεσμένα προϊόντα (στην περίπτωση που $R_1, R_2, R_3 = H$, Σχήμα 15), είτε σε χειρόμορφα προϊόντα με ένα ή δυο ασύμμετρα κέντρα. Ειδικά, η δυνατότητα σύνθεσης δυο ασύμμετρων κέντρων⁴² από ένα αρχικό μη χειρόμορφο αντιδρών, σε ένα συνθετικό βήμα και με υψηλή στερεο- εκλεκτικότητα είναι μια μεγάλη πρόκληση. Η αναγωγή ενεργοποιημένων διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα, είτε πραγματοποιούνται από τις ene-ρεδουκτάσες, παρουσία ολόκληρου του κυττάρου (whole cell procedures)⁴³, διεργασίες που συχνά εμφανίζουν και παραπροϊόντα λόγω της επίδρασης και άλλων ενζύμων πάνω στο υπόστρωμα, είτε μόνο με το απομονωμένο ένζυμο (isolated enzymes procedures),⁴⁴ διεργασίες που εμφανίζουν το ισχυρό πλεονέκτημα ότι είναι πιο εύχρηστα από τα κύτταρα και δευτερευόντως απουσιάζουν οι παράπλευρες αντιδράσεις. Τα τελευταία χρόνια, συνεχώς απομονώνονται και χαρακτηρίζονται νέα τέτοια ένζυμα⁴⁵ με αποτέλεσμα, πλήθος εξειδικευμένων εφαρμογών να γίνονται πλέον εφικτές.

Συνεχώς αυξάνεται το ενδιαφέρον για την κατάλυση αναγωγικών αντιδράσεων μέσω ενζύμων, φυσικών (wild type) ή γενετικά τροποποιημένων (mutants). Ειδικά τα ένζυμα που σχεδιάζονται (μέσω τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA) για μια επιθυμητή καταλυτική δράση, κατά τη διαδικασία που ονομάζεται directed evolution (απευθείας εξέλιξη)⁴⁶, εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον, γιατί έτσι είναι δυνατό να αυξάνεται το εύρος υποστρωμάτων που μπορεί να μετατραπεί από τα ένζυμα,⁴⁷ αλλά εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα να βελτιωθεί η δράση του ενζύμου κάτω από πλήθος διαφορετικών συνθηκών θερμοκρασίας, πίεσης, pH κλπ.⁴⁸

Οι μετατροπές που καταλύουν οι ene-ρεδουκτάσες, εμφανίζουν μεγάλη χημική εκλεκτικότητα, καθώς το ένζυμο στοχεύει μόνο το διπλό δεσμό άνθρακα – άνθρακα, αφήνοντας ανέπαφες άλλες λειτουργικές ομάδες, όπως κετονικές ομάδες, εστερικές ομάδες, νιτρίλια, νιτρο- ομάδες κλπ.⁴⁹ Επίσης, εμφανίζουν μεγάλη εναντιοεκλεκτικότητα, σχηματίζοντας υψηλής οπτικής καθαρότητας κορεσμένα προϊόντα. Τα περισσότερα ένζυμα, αυτής της κατηγορίας, δρουν κάτω από γενικώς ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, σε pH 6.0 – 9.0, συνήθως σε διαλύτη υδατικό (ρυθμιστικά διαλύματα), σπανίως σε διαφασικά συστήματα ρυθμιστικού διαλύματος / οργανικού διαλύτη⁵⁰ και εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων που πραγματοποιούν.

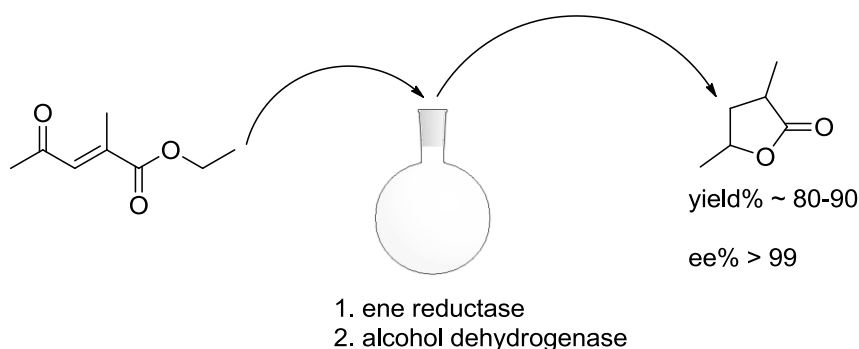
Υπάρχουν και περιπτώσεις που τέτοιες μετατροπές, δηλαδή αναγωγή ενεργοποιημένων διπλών δεσμών άνθρακα–άνθρακα, συναντιόνται σε ένζυμα ως δευτερεύουσα δραστηριότητα.⁵¹

Οι ene-ρεδουκτάσες, έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνθετικές πορείες παρασκευής σημαντικών χειρόμορφων ενδιαμέσων.⁵² Μια πρόσφατη χρήση των ενζύμων αυτών στην σύνθεση μορίων με μεγάλη φαρμακευτική αξία είναι η εργασία της ερευνητικής ομάδας του Kurt Faber, στη σύνθεση του φαρμάκου (S)- Pregabalin, που μαζί με τα προϊόντα Bacoflen και (2S, 4R)- Brivaracetam (Σχήμα 19), αποτελούν ανάλογα μια κατηγορίας φαρμάκων γνωστά ως GABA (ανταγωνιστές του γ- αμινο-βουτυρικού οξέος, Gamma Amino- Butyric Acid agonists).⁵³



Σχήμα 19. Ενζυμική αναγωγή α,β- ακόρεστων β-κυανο- εστέρων προς β-κυανο-εστέρες, ως ενδιάμεσα στη σύνθεση αναστολέων του άμινο- βουτυρικού οξέος (GABA agonists).

Τα ένζυμα αυτά είναι συμβατά για διαδοχικές ενζυμικές αντιδράσεις στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot procedures). Δηλαδή, διαδοχική μετατροπή ενός αρχικού υποστρώματος προς το επιθυμητό προϊόν, με τη δράση ενζύμων διαφορετικής δραστηριότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση γ-βουτυρολακτονών, που πραγματοποίησε η ερευνητική ομάδα του Jörg Pietruszka με τη χρήση μιας ene-ρεδουκτάσης και μιας αλκοολικής αφυδρογονάσης (Σχήμα 20).⁵⁴

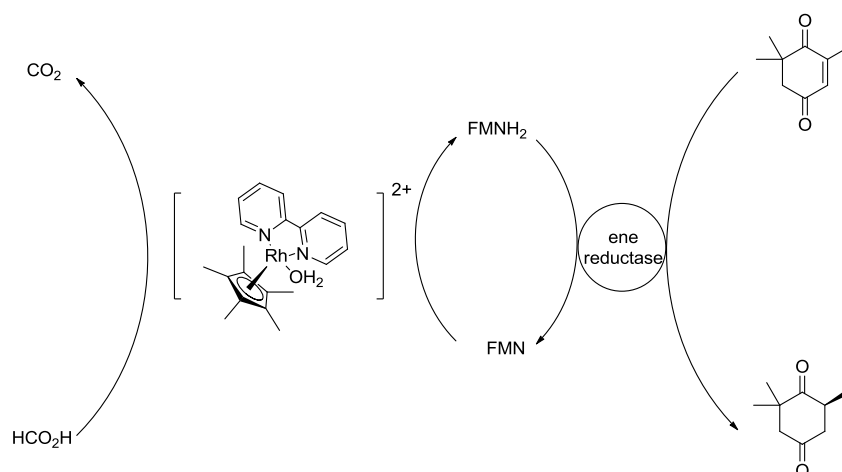


Σχήμα 20. Σύνθεση γ-βουτυρολακτονών, με την χρήση μιας ene-ρεδουκτάσης και μιας αλκοολικής αφυδρογονάσης στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot).

Τέτοιες διεργασίες είναι πολύ μεγάλης αξίας στην οργανική σύνθεση και συνεχώς εμφανίζονται σχετικές νέες δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία.⁵⁵

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι, υπάρχουν ένζυμα αυτής της οικογένειας, τα οποία μπορούν να πραγματοποιούν τις μετατροπές αυτές απουσία συνενζύμου.⁵⁶

Ωστόσο, δίνεται μεγάλη βαρύτητα στην πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αναγωγών υποκατεστημένων διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα, με χημειοενζυμικές μεθόδους, συγκεκριμένα με το συνδυασμό βιοκατάλυσης και χημειοκατάλυσης, όπου ο χημικός καταλύτης παίζει τον κρίσιμο ρόλο στην ανακύκλωση του συνενζύμου. Δηλαδή, αντί να συμμετέχουν δυο ένζυμα, όπου το ένα ανακυκλώνει το συνένζυμο και το άλλο πραγματοποιεί τη μετατροπή, μόνο ένα ένζυμο πραγματοποιεί την εξειδικευμένη μετατροπή και ένα χημικός καταλύτης ανακυκλώνει το συνένζυμο. Στο Σχήμα 21, παρουσιάζεται μια τέτοια διεργασία όπου, ένα καταλύτης Rh ανακυκλώνει το φλαβινο-συνένζυμο και μια ene- reductase ανάγει το διπλό δεσμό άνθρακα – άνθρακα, της ακόρεστης ενόνης.⁵⁷



Σχήμα 21. Ανακυκλωτικό σύστημα του συνενζύμου FMNH₂ που βασίζεται σε καταλύτη Rh και όχι σε άλλο ένζυμο, όπως συνηθίζεται (Hollman *et. al.*).

Σε κάθε περίπτωση, γίνεται αντιληπτό ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα, είναι εξαιρετικά χρήσιμα στη σύγχρονη οργανική χημεία, επιτελούν με μεγάλη εκλεκτικότητα χημικές μετατροπές, που οι συμβατικοί καταλύτες δύσκολα επιτυγχάνουν, με υψηλές αποδόσεις, σε συνθήκες ήπιες και χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία στον καθαρισμό των προϊόντων. Γενικώς, είναι εύχρηστα ένζυμα και το πεδίο εφαρμογής τους συνεχώς διευρύνεται, είτε μέσω της ανακάλυψης νέων ενζύμων, είτε

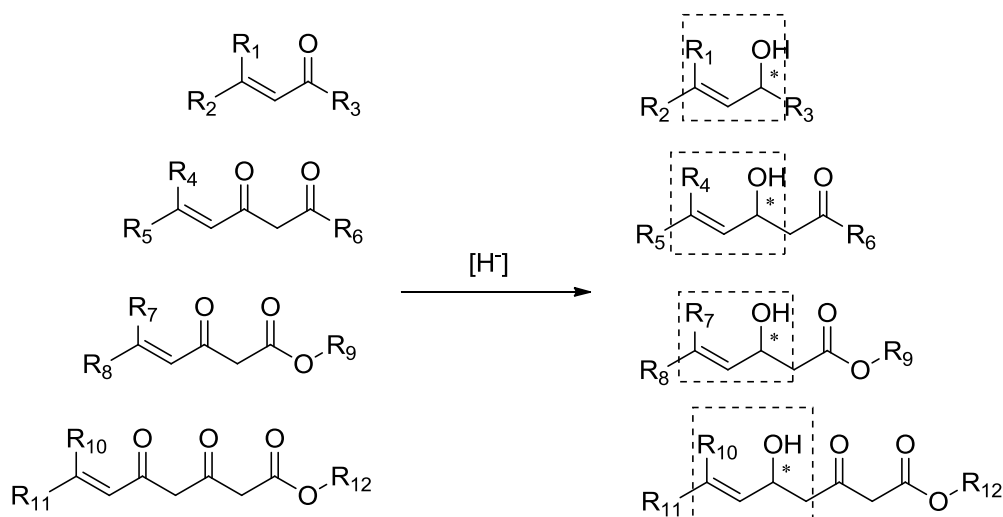
με την γενετική τροποποίηση των ήδη γνωστών οικογενειών. Η εισαγωγή τους σε οργανικές συνθετικές πορείες συγκεντρώνει για όλους τους παραπάνω λόγους την προσοχή πολλών ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με τον τομέα της Βιοκατάλυσης, της Βιοτεχνολογίας, της Φαρμακευτικής Χημείας κλπ, όσο και πολλών βιομηχανιών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο μέρος αυτό παρουσιάζεται η μελέτη της βιοκαταλυτικής εναντιοεκλεκτικής αναγωγής διαφόρων ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων με τη χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών για την σύνθεση πολύτιμων οπτικώς ενεργών ενδιάμεσων (**Κεφάλαιο 1**) και η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων (**Κεφάλαιο 2**). Τέλος, μελετάται μια συνθετική προσέγγιση για την ενζυμική μετατροπή γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων σε υψηλής οπτικής καθαρότητας κορεσμένους β-υδρόξυ εστέρες με την εφαρμογή δυο ενζύμων στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

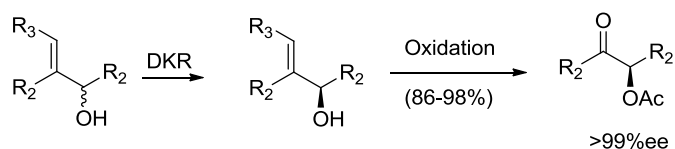
Η σύνθεση οπτικώς ενεργών ακόρεστων αλκοολών, ακόρεστων υδρόξυ-κετονών και ακόρεστων υδρόξυ-εστέρων, συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον στην σύγχρονη συνθετική οργανική χημεία. Ως επί το πλείστον, τα χημικά αυτά μόρια είναι οπτικώς ενεργές αλλυλικές αλκοόλες (Σχήμα 22).



Σχήμα 22. Γενική παρουσίαση της ενζυμικής αναγωγής α,β -ακόρεστων κετο-ενώσεων.

Οι αλλυλικές αλκοόλες συμμετέχουν ως πρόδρομα μόρια ή ως δομικές μονάδες σε πλήθος φυσικών προϊόντων και φαρμακευτικών ενώσεων. Η βιβλιογραφία είναι πλούσια σε καθαρά χημικές μεθόδους σύνθεσης αλλυλικών αλκοολών, τόσο ασύμμετρης σύνθεσης, όσο και ρεκεμικής.⁵⁸

Μια ιδιαίτερη συνθετική πορεία για την παραγωγή οπτικώς ενεργών αλλυλικών αλκοολών είναι ο δυναμικός κινητικός διαχωρισμός (Dynamic Kinetic Resolution). Η διαδικασία αυτή είναι δυνατή να επιτευχθεί με καθαρά χημικούς τρόπους,⁵⁹ αλλά και μέσω ενζυμικών διεργασιών, κυρίως μέσω λιπασών (Σχήμα 23).⁶⁰

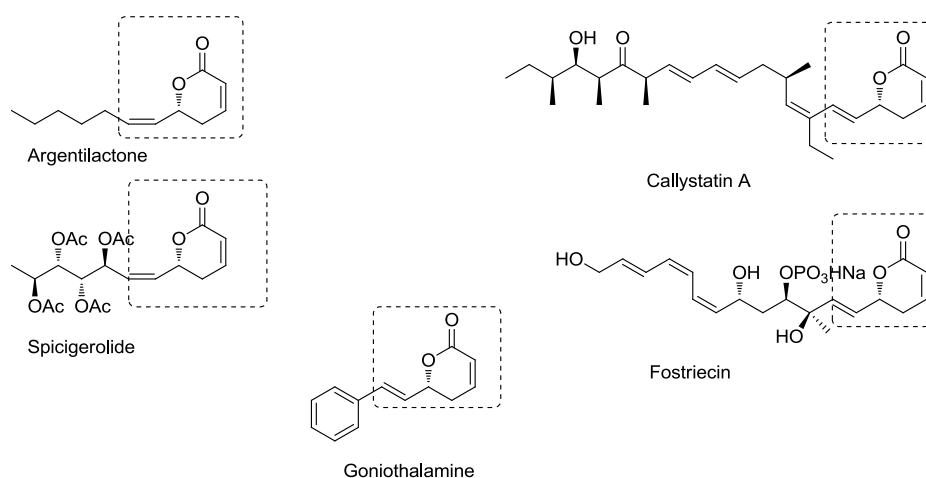


Σχήμα 23. Δυναμικός κινητικός διαχωρισμός μιας ρακεμικής αλλυλικής αλκοόλης προς υψηλής καθαρότητας αλλυλικό ακετυλο-εστέρα.

Οι γνωστές στη βιβλιογραφία ενζυμικές και χημειοενζυμικές μέθοδοι, για τη σύνθεση άκυκλων αλλυλικών αλκοολών, είναι λίγες και περιορίζονται στην χρήση κυρίως λιπασών με την εναντιοεκλεκτική εστεροποίηση του ενός εναντιομερούς της αλκοόλης και την διατήρηση του δεύτερου ανέπαφου.

Ωστόσο, το ενδιαφέρον για την εκλεκτική σύνθεση τέτοιων μορίων είναι ιδιαίτερα αυξημένο καθώς εντοπίζονται σε διάφορες κατηγορίες πολύτιμα συνθετικά μορίων, όπως σε ακόρεστες χειρόμορφες λακτόνες,⁶¹ σε κορεσμένες χειρόμορφες λακτόνες,⁶² ως απλές χειρόμορφες αλλυλικές αλκοόλες και 1,2- ακόρεστες 3,5-διόλες, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

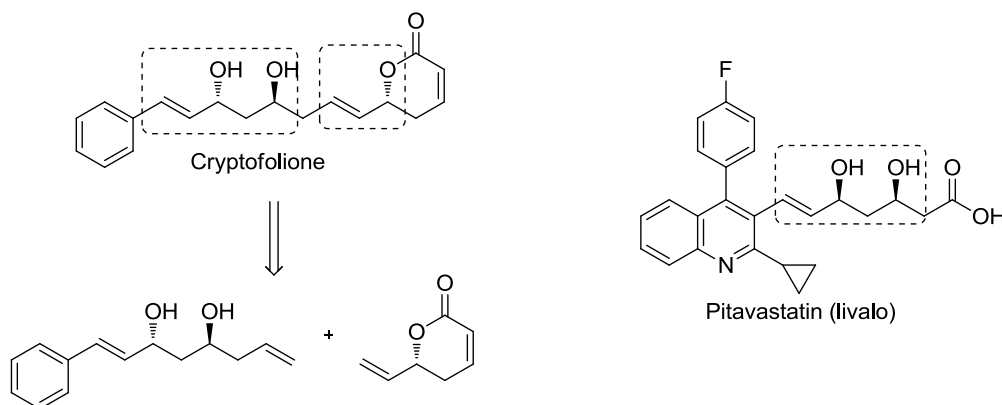
Οι δομικές μονάδες των αλλυλικών αλκοολών εντοπίζονται σε πλήθος φυσικών προϊόντων και φαρμακευτικής αξίας χημικών μορίων. Μια σημαντική κατηγορία τέτοιων ενώσεων φέρει ως τμήμα τους έναν βασικό λακτονικό δακτύλιο ((R)-6-βινυλο-5,6-διυδρο-2H-πυραν-2-ονης). Στο Σχήμα 24 παρουσιάζονται κάποια χαρακτηριστικά φυσικά προϊόντα που μπορούν να προέλθουν από οπτικές καθαρές αλλυλικές αλκοόλες.



Σχήμα 24. Τα φυσικά προϊόντα argentilactone, callystatin A, spicigerolide, fostriecin και goniotalamine.

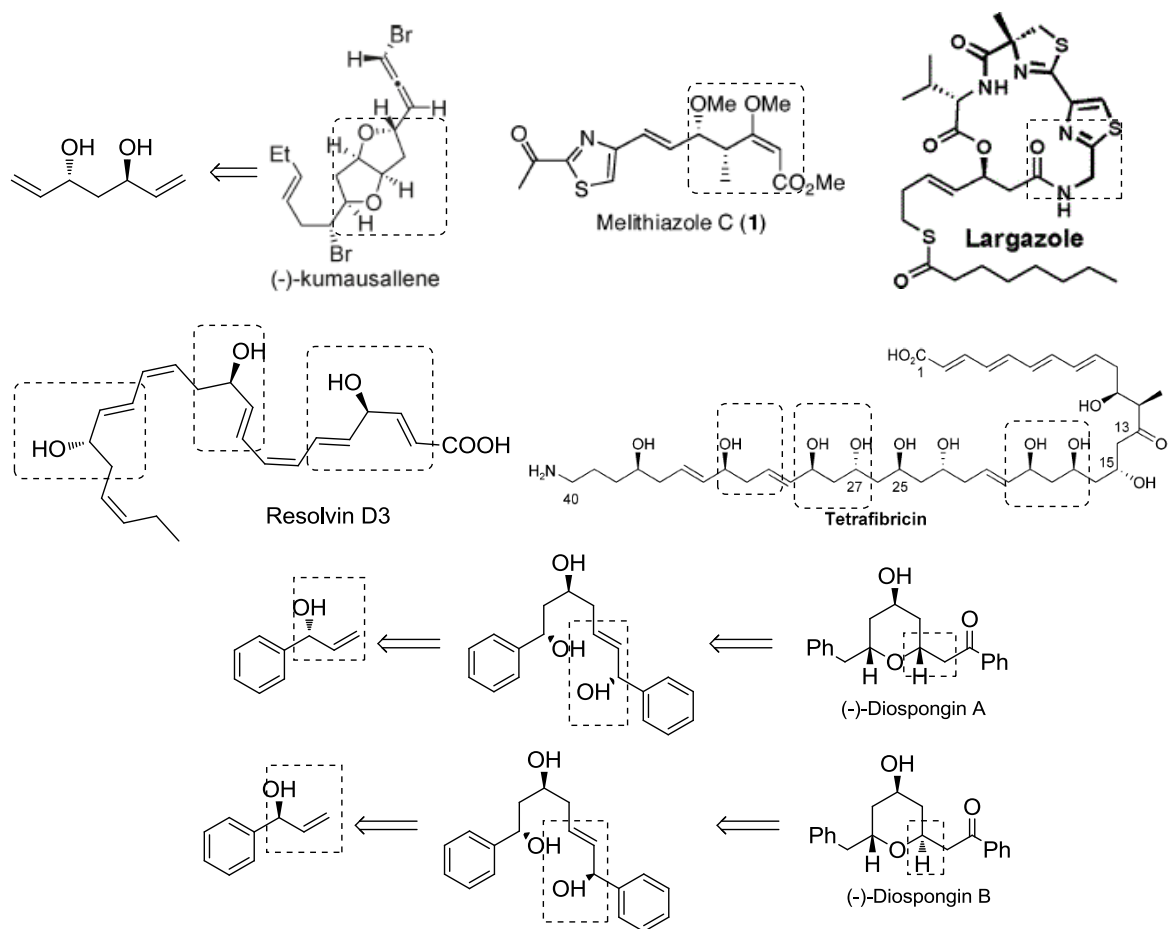
Η argentilactone εμφανίζει *in vitro* δράση ενάντια στα πρωτόζωα,⁶³ η callystatin A και η spicigerolide εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση,⁶⁴ η fostriecin είναι αντικαρκινικός παράγοντας⁶⁵ και η goniothalamine εμπλέκεται στην διαδικασία της απόπτωσης⁶⁶. Στην ίδια οικογένεια φυσικών προϊόντων ανήκει και η (+)-strictifolione.⁶⁷

Φυσικά προϊόντα όπως η cryptofolione,⁶⁸ αποτελούνται από την ίδια λακτονική μονάδα σε συνδυασμό με μια δομική μονάδα μιας αλλυλικής 1,3- διόλης. Μια επίσης αλλυλική 1,3- διόλη είναι δομικό στοιχείο της pitavastatin, αναστολέα της HMG-αναγωγάσης (αναγωγάση του 3-υδρόξυ-3- μεθυλο- γλουταρυλο-CoA), που παίζει το βασικό ρόλο στο μεταβολισμό του μεβαλονικού και κατ επέκταση στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Το μόριο αυτό χορηγείται για την αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας και του καρδιακού εμφράγματος.⁶⁹ Στο εμπόριο βρίσκεται με τη μορφή άλατος του νατρίου και στην Αμερικανική αγορά κυκλοφορεί με την επωνυμία Livalo.⁷⁰ Αντίστοιχης δομής χημικά μόρια εμφανίζουν αντίστοιχη δράση και συγκεντρώνουν υψηλό ερευνητικό ενδιαφέρον.⁷¹



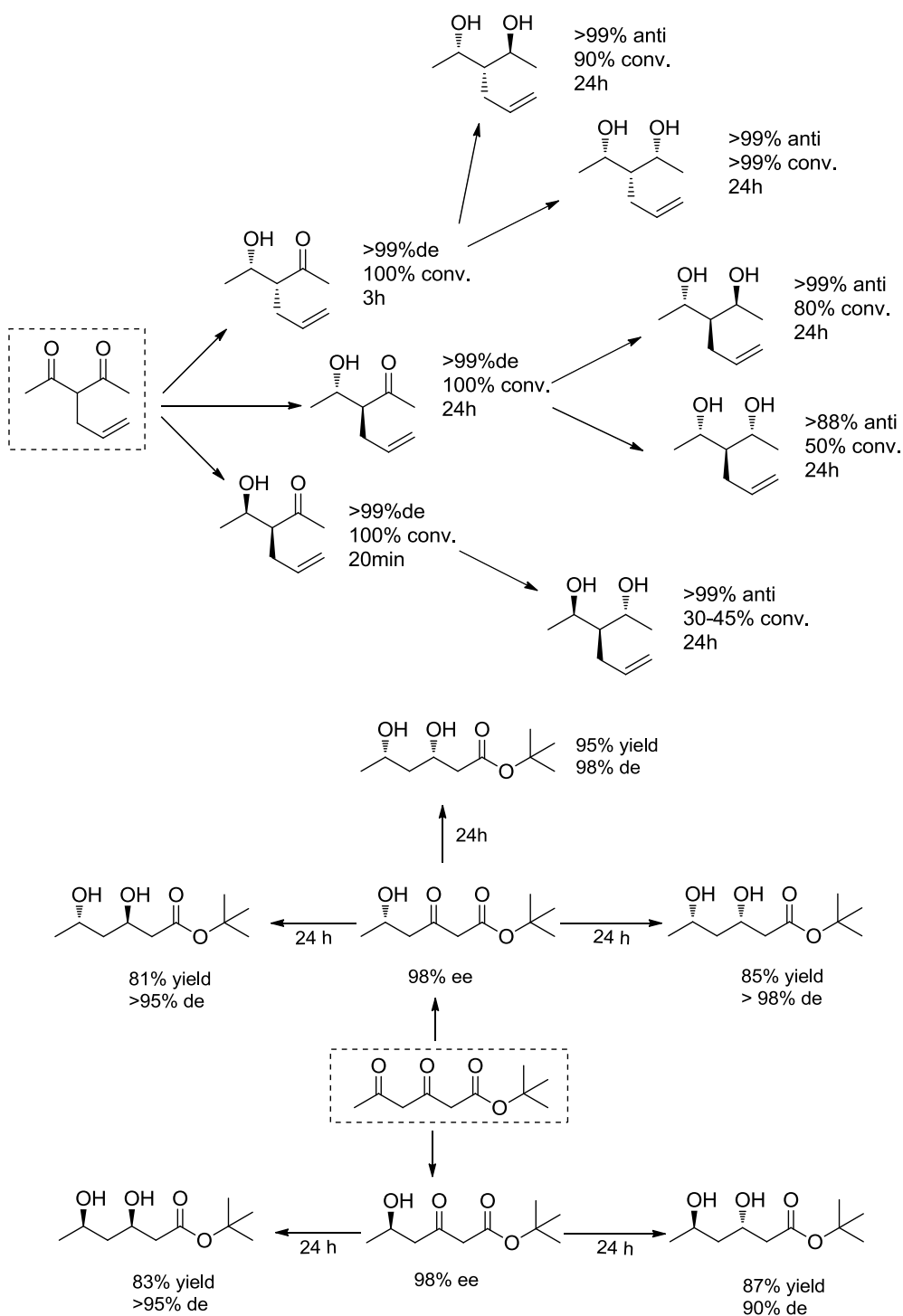
Σχήμα 25. Cryptofolione και pitavastatin: Φυσικά προϊόντα που αποτελούνται από απλές αλλυλικές αλκοόλες ή 1,2-ακόρεστες 3,5-διόλες.

Μικρές αλλυλικές αλκοόλες, ασύμμετρες β-λακτόνες κλπ απαντώνται ως δομικοί λίθοι ή ως πρόδρομα χειρόμορφα μόρια στη σύνθεση αρκετών φυσικών προϊόντων. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι το kumausallene,⁷² το melithiazole C,⁷³ η resolvin D3,⁷⁴ οι diospongins A και B,⁷⁵ η tetrafibricin,⁷⁶ η calsipotriol (ή calsipotriene ή dononex)⁷⁷ η largazol⁷⁸ και μόρια από την οικογένεια των προσταγλανδινών⁷⁹ (Σχήμα 26).



Σχήμα 26. Τα φυσικά προϊόντα (-)-kumausallene, melithiazole C, resolvin D3, diospongins A και B, tetrafibricin, calsipotriol και largazol.

Την τελευταία δεκαετία, στο εργαστήριο Βιοκατάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης έχει γίνει εκτενής μελέτη των βιοκαταλυτικών αναγωγών πλήθους κορεσμένων δικετονών, β-κετοεστέρων, β,δ-δικετοεστέρων με απομονωμένες κετορεδουκτάσες και θα παρουσιαστούν παρακάτω. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν με εξαιρετική εκλεκτικότητα την σύνθεση πολύ χρήσιμων χειρόμορφων προϊόντων. Έχουν συντεθεί υψηλής οπτικής καθαρότητας α-υποκατεστημένες υδρόξυ-κετόνες και α-υποκατεστημένες 1,3-διυδροξυ κετόνες, β-υδρόξυ εστέρες και δ-υδρόξυ β-κετοεστέρες και β,δ-διυδροξυ εστέρες (Σχήμα 27).

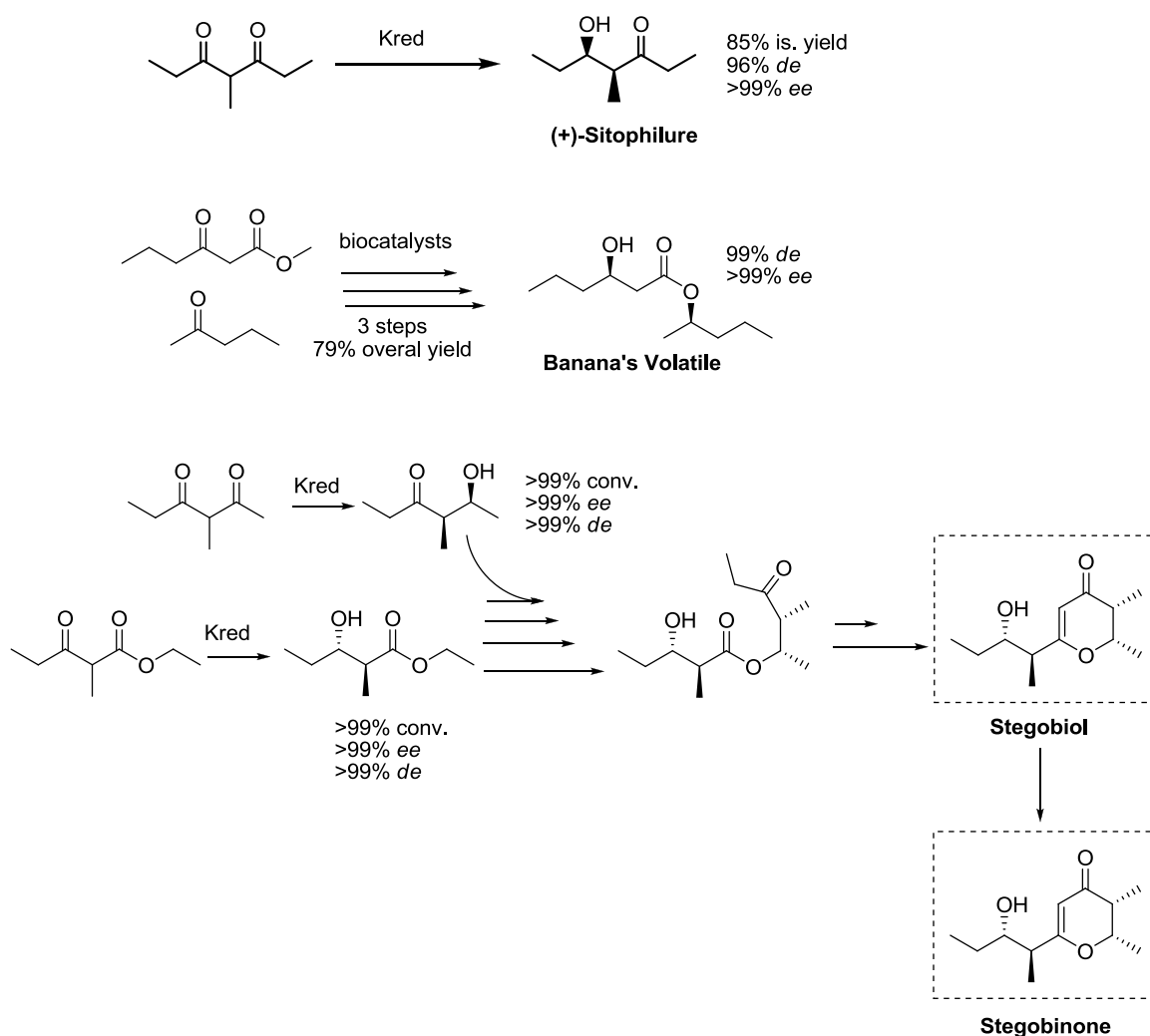


Σχήμα 27. Βιοκαταλυτικές αναγωγές α-υποκατεστημένων δικετονών και υδρόξυ κετονών και β,δ-δικετοεστέρων, β-υδρόξυ-δ-κετοεστέρων και δ-υδρόξυ-β-κετοεστέρων.

Οι κετορεδουκτάσες καταλύουν με εξαιρετική εκλεκτικότητα τέτοιου τύπου μετατροπές, με υψηλές αποδόσεις και υψηλή χημική καθαρότητα. Για το λόγο αυτό

αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην οργανική σύνθεση και ειδικά στην ασύμμετρη σύνθεση φυσικών προϊόντων και μορίων φαρμακευτικής αξίας και σημασίας. Επιπλέον, αποτελούν καταλύτες που είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί, εύκολοι στο χειρισμό και δρουν κάτω από εξαιρετικά ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, πίεσης, κλπ.

Για όλους τους παραπάνω λόγους οι καταλυτικές αυτές μέθοδοι έχουν ήδη εφαρμοστεί, από την ερευνητική μας ομάδα, στη σύνθεση φυσικών προϊόντων, όπως τα προϊόντα stegobinone και stegobiol, και sitophilure, και ο (*R*)-3-υδροξυ εξανοϊκός- (*S*)-2-πεντυλεστέρας (banana's volatile).^{14,80} Τα φυσικά αυτά προϊόντα συντέθηκαν με υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα, σε υψηλές αποδόσεις και με υψηλή χημική καθαρότητα.



Σχήμα 28. Τα φυσικά προϊόντα (+)-sitophilure, banana's volatile, stegobiol και stegobinone.

Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων

Οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (Κεφάλαιο 1 και Κεφάλαιο 2) ήταν απομονωμένες κετορεδουκτάσες, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία Codexis (Inc., Pasadena CA, USA).⁸¹ Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι επέδειξαν αναγωγική δραστηριότητα σε αντιδράσεις σε ολόκληρο κύτταρο. Μετά την απομόνωση τους, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και υπερέκφραση σε ξενιστή *E. coli*, όπου μετά από καθαρισμό προέκυψαν τα ένζυμα σε στερεή μορφή και με καθαρότητες που αγγίζουν το 70%. Όλες οι κετορεδουκτάσες αποδείχτηκαν εξαιρετικά σταθερές για πολλούς μήνες μετά από την αποθήκευσή τους στους -20°C .

Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν NADPH-εξαρτώμενες. Το συνένζυμο είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμο. Για την αναγέννηση του συνενζύμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανακύκλωσης γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης από *Bacillus cereus*.⁸² Στο σύστημα αυτό έλαβαν μέρος η D-γλυκόζη και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH), ένζυμο το οποίο και αυτό είναι εμπορικά διαθέσιμο. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνει τη D- γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ ανάγοντας ταυτόχρονα το NADP^+ σε NADPH (Σχήμα 11). Η GDH είναι καθαρά εξειδικευμένο ένζυμο στην D- γλυκόζη, οπότε δεν οξειδώνει το προϊόν της αντίδρασης (αλκοόλη). Έτσι με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων.

Εξαιτίας της παραγωγής γλυκονικού οξέος κατά την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για τη διατήρηση του pH σε σταθερά επίπεδα. Το pH των αντιδράσεων ήταν 6.9, τιμή στην οποία τα ένζυμα εμφανίζουν αρκετά καλή δραστηριότητα και σταθερότητα. Επίσης σε αυτή την τιμή το συνένζυμο ήταν σταθερό για περίπου 18 – 24 ώρες. Η θερμοκρασία των αντιδράσεων διατηρήθηκε στους 37°C , τιμή αρκετά ικανοποιητική για τη διατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων και συνενζύμων, αλλά και για την αποφυγή παράπλευρων χημικών αντιδράσεων, που πιθανώς να οδηγούσαν σε παραπροϊόντα.

Πριν από τις ενζυμικές αντιδράσεις, για λόγους ταυτοποίησης, παρασκευάστηκε όλη η σειρά των πιθανών προϊόντων σε ρακεμική μορφή, με χημική μέθοδο. Για την εύρεση των πιο δραστικών και εκλεκτικών ενζύμων, το υπόστρωμα εξετάστηκε με σειρά κετορεδουκτασών.

Ο έλεγχος της πορείας των ενζυμικών αντιδράσεων, της εναντιοεκλεκτικότητας και της διαστεροεκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε είτε με αέρια χρωματογραφία (GC) με χειρόμορφη τριχοειδή στήλη, είτε με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), με στήλη χειρόμορφη. Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία (NMR) πρωτονίου και άνθρακα.

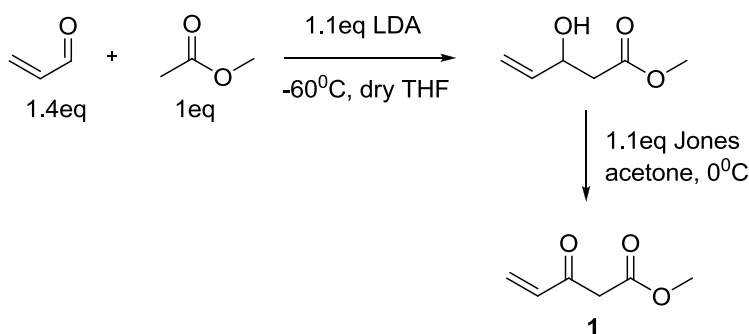
Τέλος, μετά από την δοκιμή κάθε υποστρώματος με τις κετορεδουκτάσες, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός σχετικής και απόλυτης στερεοδομής όλων των οπτικά ενεργών προϊόντων.⁸³

Εναντιοεκλεκτική αναγωγή α,β-ακόρεστων κετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων, προς σχηματισμό οπτικώς ενεργών ακόρεστων υδρόξυ-προϊόντων με τη χρήση κετορεδουκτασών

Αναφέρθηκε ήδη ότι κορεσμένες 1,3-δικετόνες, β-κετοεστέρες και β,δ-δικετοεστέρες είναι υποστρώματα που έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό στο εργαστήριο Βιοκατάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η παρούσα διατριβή στόχευε στη μελέτη και εφαρμογή αυτών των ενζυμικών μεθόδων σε ακόρεστες καρβόνυλο ενώσεις προς σχηματισμό υψηλής καθαρότητας αλλυλικών αλκοολών, οι οποίες όπως παρουσιάστηκε απαντώνται σε πλήθος φυσικών προϊόντων και αποτελούν πολύτιμα ενδιάμεσα χειρόμορφα μόρια.

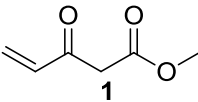
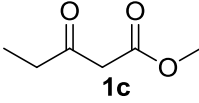
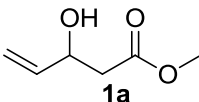
Οι α,β- ακόρεστες καρβόνυλο ενώσεις δεν είναι συνήθως εμπορικά διαθέσιμες. Για το λόγο αυτό συντέθηκε μια σειρά α,β-ακόρεστων καρβόνυλο-ενώσεων με στόχο τη μελέτη της βιοκαταλυτικής αναγωγής τους με απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις στο Μέρος Α' πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες 37 °C και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH= 6.9.

Το πρώτο υπόστρωμα που συντέθηκε ήταν ο γ,δ-ακόρεστος β-κετοεστέρας, 3-οξο-πεντ-4-ενοϊκός μεθυλεστέρας **1**. Το υπόστρωμα **1** συντέθηκε με αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης της ακρυλαλδεΐδης με τον οξικό μεθυλεστέρα και στη συνέχεια οξείδωση της ακόρεστης υδρόξυ κετόνης με το αντιδραστήριο Jones (Σχήμα 29). Τα αποτελέσματα της βιοκαταλυτικής αναγωγής του φαίνονται στον Πίνακα 1.



Σχήμα 29. Αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης και οξείδωσης με το αντιδραστήριο Jones.

Πίνακας 1. Ενζυμική αναγωγή του ακόρεστου κετοεστέρα **1**.

Υπόστρωμα ^a	α/α^b	Kred	Προϊόν ^c
	1	101	
	2	105	
	3	108	
	4	118	
	5	107	
	6	A1B B1F	

^a Το υπόστρωμα είναι ασταθές στις συνθήκες της αντίδρασης. Μετά τις 3 ώρες καταστρέφεται, οπότε δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί η μετατροπή του υποστρώματος προς τα προϊόντα.

^b Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C λόγω της πιο αργής καταστροφής του υποστρώματος.

^c Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR.

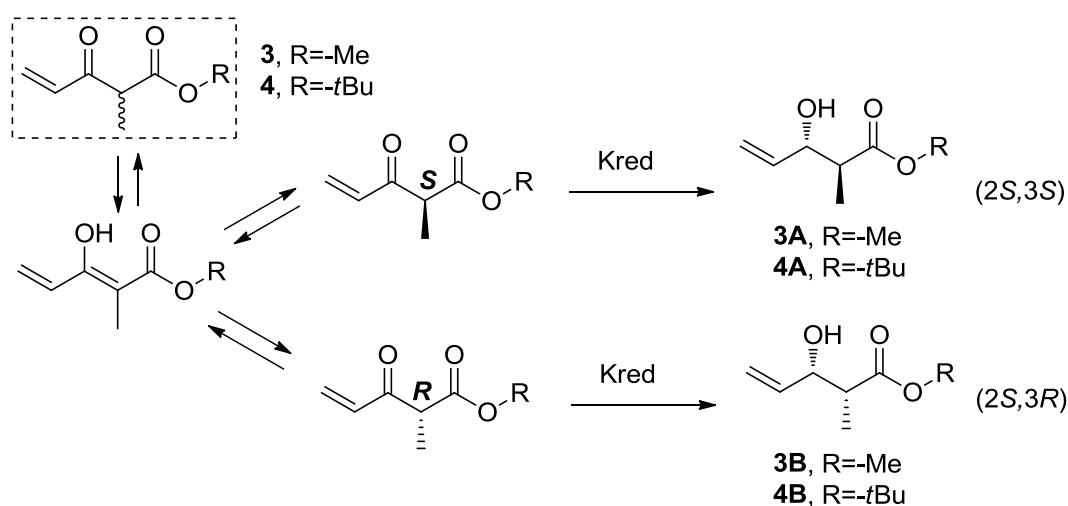
Ο κετοεστέρας **1** είναι ασταθής στις συνθήκες του πειράματος και δεν ήταν δυνατό να μελετηθεί με ακρίβεια η αντίδρασή του. Τα πρώτα συμπεράσματα ήταν ότι η ενζυμική αντίδραση οδήγησε σε προϊόντα αναγωγής του κετονικού καρβονυλίου αλλά και του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα. Συγκεκριμένα, οι Kreds 101, 105, 108 και 118 έδωσαν ως μοναδικό προϊόν τον κορεσμένο κετοεστέρα **1c** και οι Kreds 107, A1B και B1F επέδειξαν την αναμενόμενη συμπεριφορά και οδήγησαν στον υδρόξυ εστέρα **1a**, δεν μελετήθηκε περαιτέρω η εναντιοεκλεκτικότητα της ενζυμικής αναγωγής. Η παραγωγή κορεσμένου κετοεστέρα ήταν μη αναμενόμενη και δεν έχει αναφερθεί έως τώρα η κατάλυση της αναγωγής δεσμών άνθρακα-άνθρακα από κετοροδουκτάσες. Για να επιβεβαιωθούν οι παρατηρήσεις αυτές, συντέθηκε στη συνέχεια, με όμοιο τρόπο, ένα υπόστρωμα ανάλογο του **1**, ο κετοεστέρας **2** (Πίνακας 2 σελ. 37), ο οποίος είναι ο αντίστοιχος τριτ-βούτυλο εστέρας του κετοεστέρα **1**, ο οποίος αναμέναμε να είναι σταθερότερος στις συνθήκες της αντίδρασης.

Ο κετοεστέρας **2**, είναι πράγματι σταθερός στις συνθήκες της αντίδρασης και επιβεβαιώθηκαν οι παρατηρήσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η μελέτη της βιοκαταλυτικής αναγωγής του δεσμού άνθρακα-άνθρακα θα παρουσιαστεί αυτοτελώς στο Κεφάλαιο 2. Ο κετοεστέρας **2** με την Kred 112 έδωσε τον υψηλής καθαρότητας (*S*)-υδρόξυ εστέρα **2ai** και με την Kred A1B τον (*R*)-υδρόξυ εστέρα **2aii** (Πίνακας 2

σελ. 37).

Τα αποτελέσματα αυτά ήταν ενθαρρυντικά και δείχνουν ότι οι κετορεδουκτάσες μπορούν να ανάξουν τέτοια υποστρώματα. Επίσης δεν παρατηρήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου, γεγονός γνωστό από τη βιβλιογραφία στην περίπτωση της αναγωγής ακόρεστης καρβόνυλο ένωσης από μια αλκοολική αφυδρογονάση.⁶¹ Σε επόμενο επίπεδο μελετήθηκε η διαστερεοεκλεκτικότητα της βιοκαταλυτικής αναγωγής. Συντέθηκαν οι α-μεθυλιωμένοι εστέρες του **1** και **2**, οι εστέρες **3** και **4**. Ο λόγος που συντέθηκαν δυο νέοι εστέρες είναι η σύγκριση της διαστερεοεκλεκτικότητας στις δυο περιπτώσεις, καθώς γνωρίζουμε πως η εστερική ομάδα επηρεάζει αυτό τον παράγοντα.

Η διαστερεοεκλεκτικότητα σε αυτά τα δυο απλά υποστρώματα είναι μη ικανοποιητική (Σχήμα 30). Η εναντιοεκλεκτικότητα παραμένει υψηλή, αλλά τα προϊόντα είναι δυο: ο *anti* ακόρεστος υδρόξυ εστέρας (2*S*,3*S*)-3-υδροξυ-2-μεθυλο-πεντ-4-ενικός μεθυλεστέρας/τριτ-βουτυλεστέρας (**3A** και **4A**) και ο *syn* ακόρεστος υδρόξυ εστέρας (2*R*,3*S*)-3-υδροξυ-2-μεθυλο-πεντ-4-ενικός μεθυλεστέρας/τριτ-βουτυλεστέρας (**3B** και **4B**). Οι α-υποκατεστημένες 1,3-δικετόνες ή οι α-υποκατεστημένοι β-κετοεστέρες με ένζυμο που δίνουν εκλεκτική αναγωγή στο καρβονύλιο μπορούν να οδηγήσουν είτε στο *anti*, είτε στο *syn* υδρόξυ προϊόν μέσω του δυναμικού κινητικού διαχωρισμού του κετοεστέρα (ή της δικετόνης, κατά περίπτωση) με την α-υποκατάσταση σε *R* διαμόρφωση και σε *S* διαμόρφωση.

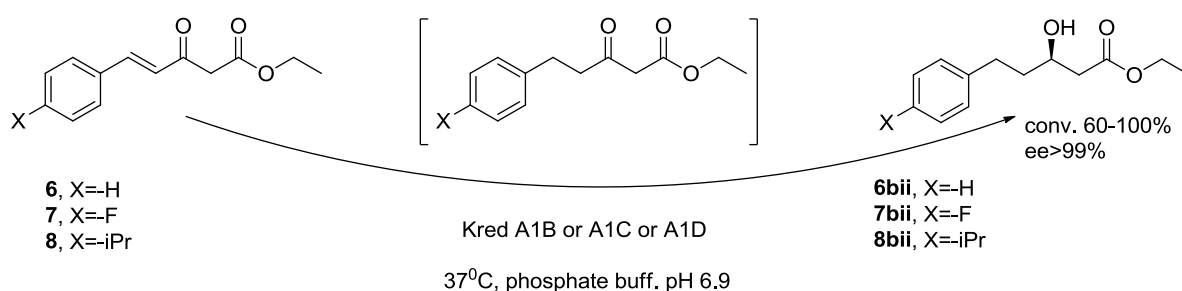


Σχήμα 30. Ενζυμική αναγωγή των υποστρωμάτων **3** και **4**.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες 37 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=6.9. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας και του pH συνήθως μεταβάλλει την διαστερεοεκλεκτικότητα, ωστόσο δεν ερευνήθηκε περαιτέρω η βελτίωση της διαστεροεκλεκτικότητας. Δεν παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων έναντι των υποστρωμάτων **1-4**, οι μετατροπές ήταν συνήθως 90-100% (στα υποστρώματα **2-4**), ούτε παρατηρήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου, όπως ήδη αναφέραμε.

Η εμπορικά διαθέσιμη ακόρεστη κετόνη **5**, έδωσε αποκλειστικά την *R* αλλυλική αλκοόλη **5a_{ii}** σε ικανοποιητικό χρόνο, με εξαιρετική μετατροπή και υψηλή οπτική και χημική καθαρότητα.

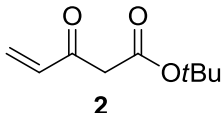
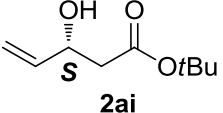
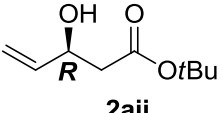
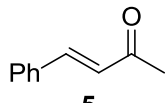
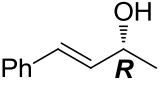
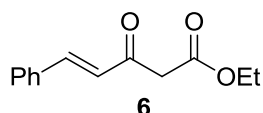
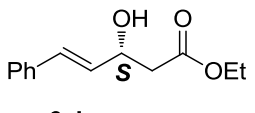
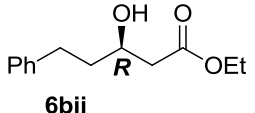
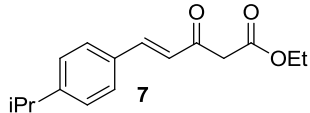
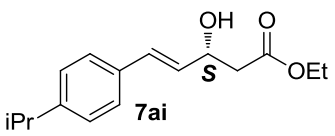
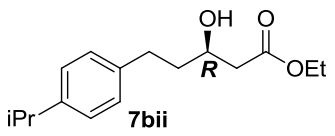
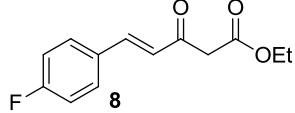
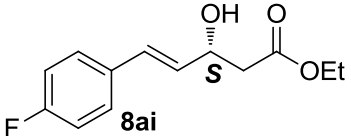
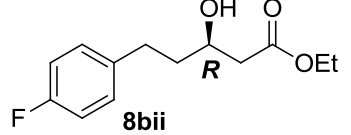
Κατόπιν συντέθηκαν τρεις κετοεστέρες οι οποίοι έχουν ως υποκατάσταση στο διπλό δεσμό ένα υποκατεστημένο ή μη βενζολικό δακτύλιο. Το υπόστρωμα **6** με την Kred 112 έδωσε τον υψηλής καθαρότητας υδρόξυ εστέρα **6a_i**. Εντυπωσιακό είναι πως η Kreds A1B, A1C, A1D έδωσαν ως αποκλειστικό προϊόν τον κορεσμένο υδρόξυ εστέρα **6b_{ii}**. Αναμέναμε ότι το προϊόν της αναγωγής με τις A1B, A1C, A1D θα είναι ένας ακόρεστος *R* υδρόξυ εστέρας. Αυτό δείχνει πως πιθανόν η αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα να προηγείται της αναγωγής του κετονικού καρβονυλίου και όπως θα παρουσιαστεί στο Κεφάλαιο 2, οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από την κετορεδουκτάση (Σχήμα 31). Δεν εντοπίστηκε ο κορεσμένος εστέρας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ούτε στο τελικό μίγμα της αντίδρασης στις περιπτώσεις των Kred A1C, A1D που δεν μετέτρεψαν όλο το υπόστρωμα προς προϊόν.



Σχήμα 31. Ενζυμική αναγωγή των εστέρων **6**, **7** και **8**.

Τα καλύτερα αποτελέσματα των βιοκαταλυτικών αναγωγών των υποστρωμάτων **2**, **5-8** παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

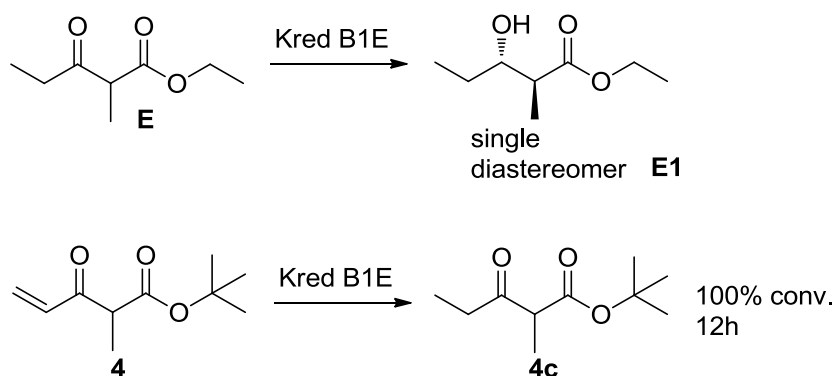
Πίνακας 2. Ενζυμική αναγωγή των υποστρωμάτων υποστρωμάτων 2, 5-8.

Υπόστρωμα	a/ α	Kred	Ποσοστό μετατροπή ς (χρόνος)	e.e. %	Προϊόν ^c
 2	1	112	100% ^d (3h)	>99 ^a	 2ai
	2	107	100% ^d (3h)	>99 ^a	 2aii
 5	3	107	100% ^d	>99 ^b	 5aii
	4	112	86% ^d		
	5	A1B	100% ^d		
	6	A1C	100% ^d		
	7	A1D	100% ^d		
 6	8	112	100% ^d	>99 ^b	 6ai
	9	A1B	100% ^d	>99 ^b	 6bii
 7	10	112	100% ^d	>99 ^b	 7ai
	11	A1B	100% ^d	>99 ^b	 7bii
 8	12	112	100% ^d	>99 ^b	 8ai
	13	A1B	100% ^d	>99 ^b	 8bii

^a Ο υπολογισμός της εναντιομερικής περιέσεως έγινε με εστεροποίηση των υδρόξυ προϊόντων με τρίφθοροξικό οξύ και σύγκριση με ρακεμικό μίγμα εστεροποιημένης υδρόξυ ένωσης σε αέριο χρωματογράφο (GC) με χειρόμορφη κολώνα. ^b Ο υπολογισμός της εναντιομερικής περιέσεως έγινε με HPLC με χειρόμορφη στήλη. ^c Τα προϊόντα προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR. ^d 24h.

Οι βιοκαταλυτικές μετατροπές πραγματοποιήθηκαν σε ικανοποιητικό χρόνο (3-12 ώρες) και στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων επιτεύχθηκε η 100% μετατροπή του υποστρώματος προς υψηλής οπτικής καθαρότητας (μεγαλύτερη του 99%) υδρόξυ ένωση. Σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, η ενζυμική αντίδραση δεν έδωσε ως μοναδικό προϊόν το ακόρεστο υδρόξυ προϊόν, όπως ήδη αναφέρθηκε. Παρατηρήθηκε ότι ορισμένα ένζυμα καταλύουν την εκλεκτική αναγωγή του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα, αφήνοντας ανέπαφη την κετονική ομάδα.

Οι κετοεστεράσες που χρησιμοποιήθηκαν, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, με εξαίρεση την Kred 112 που επέδειξε σταθερή δράση, εμφανίζουν διαφορετική δράση ανάλογα με τη δομή του υποστρώματος με το οποίο αλληλεπιδρούν. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά, με πειραματικά δεδομένα από τη χρήση του ίδιου πειραματικού πρωτοκόλλου, με τα ίδια ένζυμα, σε παρόμοιας δομής κορεσμένα υποστρώματα, παρατηρούμε πως η ενζυμική δραστηριότητα ως προς την αναγωγή των κετονικών ομάδων, διαφοροποιείται αρκετά. Μια τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση φαίνεται στο Σχήμα 32. Ο κετοεστέρας **E** οδηγεί στον αποκλειστικό σχηματισμό του διαστερομερούς **E1**, το οποίο είναι πρόδρομο μόριο στη σύνθεση των φυσικών προϊόντων stegobiol και stegobinone όπως είδαμε νωρίτερα. Αντίθετα όμως ο κετοεστέρας **4**, οδηγεί στο προϊόν αναγωγής του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα.

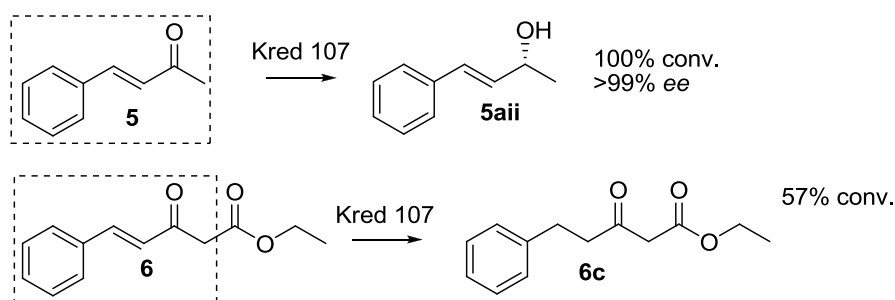


Σχήμα 32. Συγκριτική παρουσίαση της ενζυμικής αναγωγής των υποστρωμάτων **E** και **4** με την Kred B1E.

Η παρουσία του διπλού δεσμού σε α-θέση ως προς το κετονικό καρβονύλιο, περιορίζει αρκετά τις διαθέσιμες επιλογές ενζύμων, για την παραγωγή του επιθυμητού εναντιομερούς για δυο κύριους λόγους. Είτε γιατί η ενζυμική αντίδραση

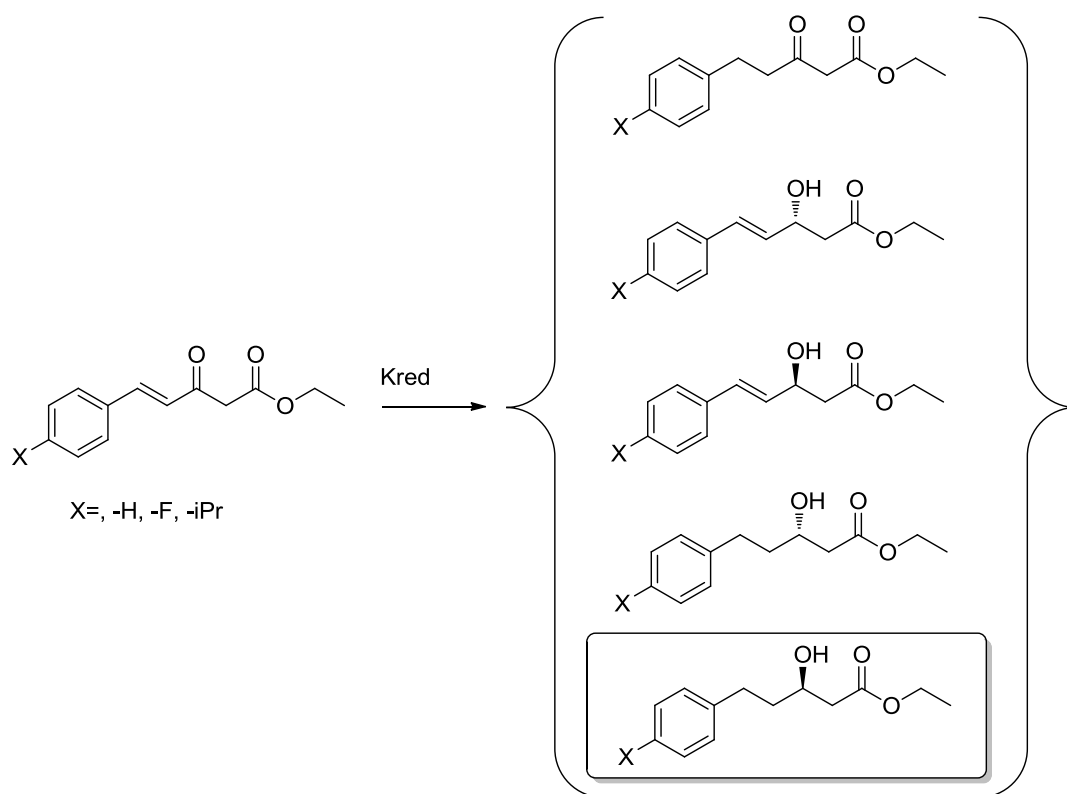
οδηγεί σε μίγμα προϊόντων (προϊόν αναγωγής στο καρβονύλιο, προϊόν αναγωγής στο διπλό δεσμό, ή προϊόν διπλής αναγωγής σε καρβονύλιο και διπλό δεσμό, αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2, αυτού του μέρους), είτε γιατί η μετατροπή είναι χαμηλή (κάτω του 30%) έως αμελητέα.

Η ενζυμική αναγωγή του **5**, έδωσε αποκλειστικά, σε όλες τις περιπτώσεις, το εναντιομερές **5aii**, (*R,E*)-4-φαινυλο-βουτανο-3-εν-2-όλη). Το δεύτερο εναντιομερές δεν σχηματίστηκε με κάποιο από τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν. Μια επίσης σημαντική σημείωση αφορά στα υποστρώματα **5** και **6** κατά την αντίδρασή τους με την κετορεδουκτάση 107. Η κετόνη **5** έδωσε προϊόν αναγωγής στο καρβονύλιο, ενώ στον κετοεστέρα **6** σχηματίστηκε αποκλειστικά προϊόν αναγωγής στο διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα, παρά το γεγονός ότι τα δυο υποστρώματα έχουν μεγάλη δομική συγγένεια (Σχήμα 33). Εντυπωσιακό είναι πως, η αντίδραση των υποστρωμάτων **6**, **7** και **8** με την Kred A₁B οδήγησε σε υψηλής οπτικής καθαρότητας κορεσμένο β-υδρόξυ εστέρα, αντί του αναμενόμενου ακόρεστου β-υδρόξυ εστέρα.



Σχήμα 33. Συγκριτική παρουσίαση της βιοκαταλυτικής αναγωγής των υποστρωμάτων **5** και **6** με την Kred 107.

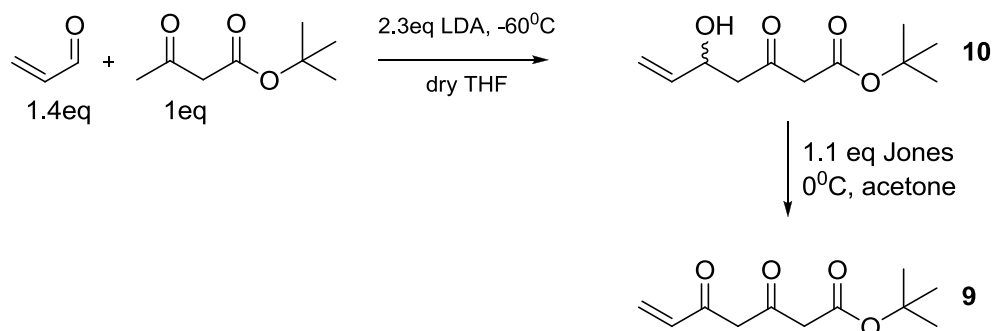
Αναφέρθηκε ήδη ότι η ικανότητα των ενζύμων να πραγματοποιούν την αναγωγή του διπλού δεσμού που γειτνιάζει με μια κετο-ομάδα παρατηρήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις που παρουσιάζονται αναλυτικά στο επόμενο Κεφάλαιο. Όμως, στην περίπτωση αυτή διαπιστώνουμε ότι, η διπλή αυτή δράση οδηγεί στην παραγωγή ενός μοναδικού προϊόντος, από τα 5 πιθανά προϊόντα (*R* και *S* ακόρεστος υδρόξυ-εστέρας, *R* και *S* κορεσμένος υδρόξυ-εστέρας, κορεσμένος κετοεστέρας, Σχήμα 34).



Σχήμα 34. Τα πιθανά προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής ακόρεστων κετοεστέρων.

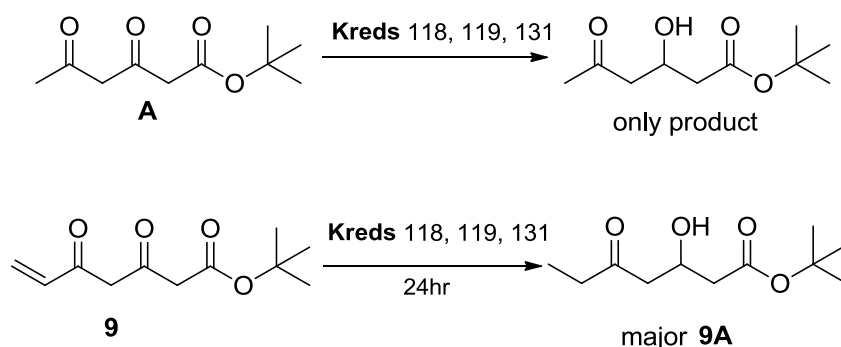
Στις περιπτώσεις αυτές πραγματοποιήθηκε πιθανότατα η αναγωγή και του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα και η αναγωγή της κετονικής ομάδας. Το ίδιο ένζυμο πραγματοποίησε δηλαδή δυο διαφορετικές μετατροπές στο ίδιο υπόστρωμα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, οι συγκεκριμένες ενζυμικές αντιδράσεις πιθανότατα πραγματοποιούνται διαδοχικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και το καθοριστικό βήμα (αργό βήμα) είναι η αναγωγή του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα ενώ το γρήγορο βήμα είναι η αναγωγή του β-καρβονυλίου του κορεσμένου εστέρα.

Από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας¹⁰ έχειδειχθεί ότι συστήματα όπως ο δικετοεστέρας **A** στο Σχήμα 36 δρουν αυστηρά τοποεκλεκτικά ανάγοντας το β-καρβονύλιο σε κορεσμένους β,δ-δικετοεστέρες. Συντέθηκε, για το λόγο αυτό, ο ακόρεστος δικετοεστέρας **9** (Σχήμα 35) για να μελετηθεί η αναγωγή του από τις κετορεδουκτάσες που γνωρίζουμε ότι παρέχουν μεγάλη τοποεκλεκτικότητα.



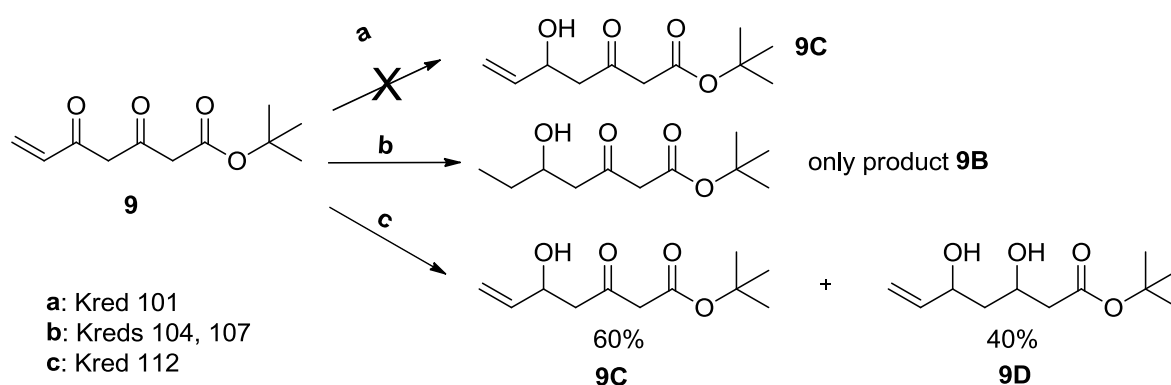
Σχήμα 35. Σύνθεση του ακόρεστου δικετοεστέρα **9**.

Οι κετορεδουκτάσες είχαν σημαντική δραστικότητα ως προς την αναγωγή του β-καρβονυλίου στο υπόστρωμα **9**, αλλά σε αυτές τις περιπτώσεις, κύριο προϊόν της ενζυμικής μετατροπής του **9**, είναι ο κορεσμένος β-υδρόξυ δ-κετοεστέρας **9A** και όχι ο ακόρεστος β-υδρόξυ δ-κετοεστέρας (Σχήμα 36).



Σχήμα 36. Συγκριτική παρουσίαση της ενζυμικής αναγωγής του κορεσμένου δικετοεστέρα **A** και του ακόρεστου δικετοεστέρα **9** με τις κετορεδουκτάσες 118, 119 και 131.

Παρατηρήθηκε η αδυναμία των ενζύμων να δράσουν ως κετορεδουκτάσες στο δ-καρβονύλιο. Ένζυμα που, αναμέναμε¹⁰ ότι, μπορούν να μετατρέψουν το δ-καρβονύλιο προς υψηλής οπτικής καθαρότητας ακόρεστη δ-υδρόξυ ένωση (Kreds 101, 112, 104, 107), είτε δεν εμφανίζουν καθόλου δραστικότητα ως προς αυτό (Kred 101), είτε η μετατροπή είναι χαμηλή και το κύριο προϊόν είναι ο κορεσμένος δ-υδρόξυ β-κετοεστέρας **9B**, είτε οδηγούμαστε σε μίγμα προϊόντων όπως στην περίπτωση της Kred 112 που δίνει ως κύριο προϊόν τον υδρόξυ εστέρα **9C** και δευτερεύον τον διυδρόξυ εστέρα **9D** (Σχήμα 37).



Σχήμα 37. Ενζυμική αναγωγή του ακόρεστου δικετοεστέρα **9** με τις Kred 101, 104, 107 και 112.

Δεν έγινε δυνατό να διαπιστωθεί, στις συγκεκριμένες περιπτώσεις (Σχήματα 35 και 36), αν η αναγωγή του διπλού δεσμού και του β-καρβονυλίου γίνονται ταυτόχρονα ή αν η μια μετατροπή προηγείται της άλλης. Αναλυτικά, τα καλύτερα αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **9**.

Υπόστρωμα	a/a	Kred	Χρόνος ^a	Προϊόντα ^b
 9	1	118	12hr	 ~ 70% 9A
	2	119	12h	 ~ 30% 9c
	3	120	12h	 + 80% 9A
	4	131	12h	 20% 9D
	5	112	12h	 + 60% 9C 40% 9D

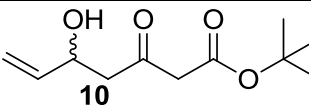
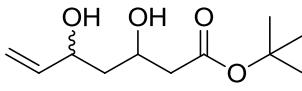
^aΟ υπολογισμός της μετατροπής δεν ήταν δυνατόν να είναι ακριβής γιατί το υπόστρωμα, όπως διαπιστώθηκε μέσω ενός τυφλού (blind) πειράματος, δεν ήταν σταθερό στο ρυθμιστικό διάλυμα και ένα μέρος του καταστρεφόταν. ^bΤα προϊόντα προσδιορίστηκαν με φασματογραφία ¹H NMR.

Μια πιθανή εξήγηση αυτού του αποτελέσματος είναι ότι ο ακόρεστος δικετοεστέρας δεν μπορεί να προσανατολιστεί ή να δεσμευτεί εύκολα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σε αντίθεση με τον κορεσμένο β,δ-δικετοεστέρα **A**.¹⁰ Η παρουσία του διπλού δεσμού σε συζυγιακή θέση δημιουργεί επιπλέον - ή μειώνει τις - αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποστρώματος και ενεργού κέντρου, οπότε περιορίζεται ή αποκλείεται η δυνατότητα του ενζύμου να μετατρέψει την ακόρεστη καρβόνυλο ένωση στον επιθυμητό ακόρεστο δ-υδρόξυ β-κετοεστέρα (πρόδρομο μόριο στη σύνθεση λακτονών) ή στον επίσης επιθυμητό ακόρεστο β-υδρόξυ δ-κετοεστέρα.

Επειδή χημικές ενώσεις όπως ο εστέρας **9** μπορούν να αναπτύξουν εκτεταμένη συζυγία π-ηλεκτρονίων, μέσω του διπλού δεσμού και των ενολικών μορφών των δυο καρβονυλίων, πιθανώς η ιδιότητα αυτή να ευθύνεται για τα αποτελέσματα των βιοκαταλυτικών αναγωγών. Το μέγεθος του μορίου δεν είναι μεγάλο ώστε να δημιουργεί πρόβλημα, αλλά μπορεί υπό συνθήκες συζυγίας π-ηλεκτρονίων να γίνει δύσκαμπτο και κατά συνέπεια να δυσκολεύεται να προσανατολιστεί σωστά στο ενεργό κέντρο.

Επομένως, δοκιμάστηκε η βιοκαταλυτική αναγωγή του υδρόξυ κετοεστέρα **10**, ο οποίος είναι το πρόδρομο μόριο που χρησιμοποιήσαμε για τη σύνθεση του δικετοεστέρα **9**. Επαναλάβαμε την ίδια σειρά πειραμάτων για τον ε,ζ-ακόρεστο δ-υδρόξυ β-κετοεστέρα **10**, που έχει ίδιο μέγεθος αλλά δεν υπάρχει η δυνατότητα για εκτεταμένη συζυγία π-ηλεκτρονίων, συνεπώς έχει περισσότερη ελευθερία για να προσανατολιστεί μέσα στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Το μοναδικό προϊόν της αντίδρασης ήταν ο ακόρεστος διυδρόξυ εστέρας **10D** και ήταν το προϊόν που αναμέναμε να σχηματιστεί. Επομένως, το α,β-ακόρεστο κετο-σύστημα, σε συνδυασμό με την εκτεταμένη συζυγία πιθανώς προκαλεί την αλλαγή στη δραστηριότητα των κετορεδουκτασών.

Πίνακας 4. Ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **10**.

Υπόστρωμα	<i>α/α</i>	Kred	Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν ^a
 10	1	118	100% (12h)	 10D
	2	119	100% (12h)	
	3	131	100% (12h)	

^a Ο προσδιορισμός του προϊόντος έγινε με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Ο αρχικός επομένως στόχος για την εφαρμογή της ενζυμικής αυτής μεθόδου για τη σύνθεση χρήσιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων, όπως λακτόνες, *syn* και *anti* ακόρεστες διόλες, μπορεί να επιτευχθεί μέσω τροποποίησης της συνθετικής πορείας, ή με τροποποίηση του υποστρώματος, με χρήση και άλλων ενζύμων όπως λιπάσες με μεθόδους δυναμικού κινητικού διαχωρισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Μελέτη της ενζυμικά καταλυόμενης αναγωγής του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα α,β-ακόρεστων κετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων.

Η αναγωγή του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα γενικά σε οργανικά μόρια και ειδικά σε καρβόνυλο ενώσεις, όπως αυτές που θα παρουσιαστούν παρακάτω, αποτελεί πρόκληση για κάθε συνθετικό χημικό. Απαιτείται μεγάλη εκλεκτικότητα, ώστε να αναχθεί αποκλειστικά ο διπλός δεσμός και να μείνει ανέπαφη η κετονική ή κετονικές ομάδα/ες.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι μελέτες ομογενούς βιοκατάλυσης, μιας σειράς ακόρεστων κετο-ενώσεων, με στόχο την εκλεκτική αναγωγή του διπλού δεσμού αυτών. Είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζεται παρόμοια καταλυτική δράση, από μια σειρά ενζύμων που δρουν ως κετο-ρεδουκτάσες και όχι ως ene-ρεδουκτάσες. Ένζυμα δηλαδή, που μέχρι σήμερα ήταν γνωστό ότι ανάγουν με μεγάλη εναντιο-, τοπο- και διαστεreo- εκλεκτικότητα κετο-ενώσεις στις αντίστοιχες υδρόξυ ενώσεις, διαπιστώθηκε ότι εμφανίζουν και μια δευτερεύουσα δράση ως ene-ρεδουκτάσες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο από συνθετική άποψη, όσο και από το γεγονός ότι η μη αναμενόμενη αυτή δράση των ενζύμων από τη μια επιβεβαιώνει ότι τα ένζυμα μπορούν (υπό συνθήκες) να καταλύουν διαφορετικές μετατροπές (και να δέχονται ως υποστρώματα μια πληθώρα χημικών μορίων). Επιπλέον δημιουργείται η δυνατότητα για το σχεδιασμό (direct evolution) ενζύμων που θα αλλάζουν δραστικότητα μέσω της εξωγενούς παρέμβασης του ερευνητή. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο και χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά κετορεδουκτάσες για την βιοκαταλυτική αναγωγή όλων των υποστρωμάτων που παρουσιάζονται παρακάτω.

Όπως είναι γνωστό, η πλειοψηφία των γνωστών στη βιβλιογραφία ενζύμων είναι πρωτεΐνες. Αυτό σημαίνει ότι παράγονται σε διάφορους οργανισμούς μέσω της έκφρασης γονιδίων. Ένζυμα που εκφράζονται από γονίδια με υψηλή ομολογία DNA, δύναται να εμφανίζουν την ίδια, παραπλήσια ή και εντελώς διαφορετική δραστικότητα. Στις περιπτώσεις της ίδιας ή παραπλήσιας δραστικότητας σημαίνει ότι υπάρχει συντήρηση του DNA στις κρίσιμες, για την καταλυτική δράση, περιοχές του ενζύμου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει σε ένζυμα διαφορετικών οργανισμών, αλλά μπορεί εξίσου (ίσως και συχνότερα) να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις βιβλιοθηκών

γονιδίων (γονίδια-mutants - που προκύπτουν από τυχαίες ή στοχευμένες μεταλλάξεις ενός μητρικού γονιδίου -wild type-), που οδηγούν στην έκφραση πληθώρας πρωτεϊνών-ενζύμων (ή γενικά πρωτεϊνών), με στόχο την επιλογή των ιδανικών γονιδίων και για την επιθυμητή εξειδικευμένη δράση του ενζύμου.⁸⁵

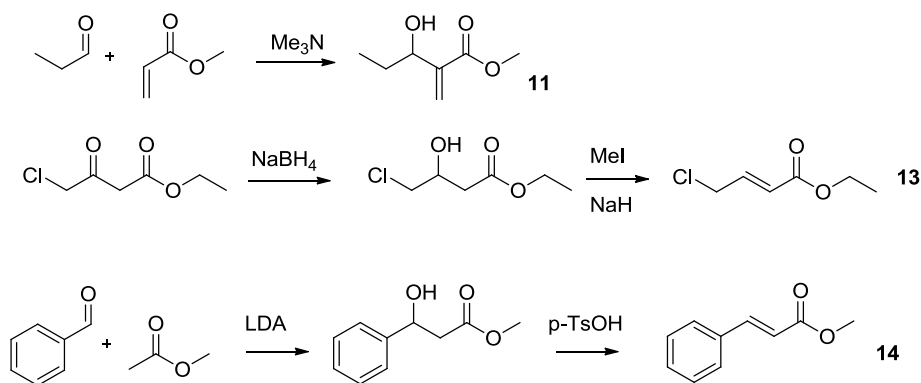
Η συντήρηση τμημάτων του DNA, στα διάφορα γονίδια που εκφράζουν ένζυμα, μπορεί να εξηγήσει όχι μόνο την ομοιότητα στην επιθυμητή δραστηριότητα, αλλά και την ομοιότητα στην εμφάνιση παράπλευρων καταλυτικών ή άλλων ιδιοτήτων.

Η πειραματική διαπίστωση, πως τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε, για την βιοκαταλυτική αναγωγή μιας σειράς χημικών μορίων με συνθετικό ενδιαφέρον, συμπεριφέρονται όχι, όπως αναμενόταν, ως κετορεδουκτάσες, αλλά αντίθετα ως επερεδουκτάσες, φαίνεται πως οφείλεται ακριβώς στην ύπαρξη διατηρημένων τμημάτων DNA στα γονίδια των ενζύμων αυτών, που οδηγούν στην δευτερεύουσα αυτή δράση τους. Βεβαίως τα ένζυμα-πρωτεΐνες, που εμφανίζουν καταλυτική δράση, έχουν συνήθως την ικανότητα, από τη μια να πραγματοποιούν με υψηλή εκλεκτικότητα και δραστηριότητα, εξειδικευμένες χημικές μετατροπές, από την άλλη όμως μπορούν να εμφανίζουν και δευτερεύουσες δράσεις. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί η περίπτωση των ρεδουκτασών των κετοστεροειδών (ketosteroids reductases), ένζυμα της υπεροικογένειας των αλδο-κετορεδουκτασών (aldo-ketoreductases superfamily) και κυρίως το ένζυμο AKR1D1 που συμμετέχει στους μηχανισμούς μεταβολισμού της κορτισόλης και άλλων εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών (Inhaled Cortico-Steroids ή ICS).^{86a} Η AKR1D1, είναι μια αλδο-κετορεδουκτάση (που διαθέτει ο άνθρωπος) η οποία έχει ως φυσική αποστολή την αναγωγή του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα (σε α -θέση ως προς μια κετο-ομάδα) στη θέση 5' της κορτισόλης προς το σχηματισμό της 5 β -διυδροκορτισόλης, αφήνοντας ανέπαφη την κετόνη.^{86a} Εν προκειμένω δηλαδή, όχι μόνο δεν δρα ως αναγωγίαση καρβόνυλο-ομάδων αλλά επιπλέον καταλύει την αναγωγή του διπλού δεσμού στερεοεκλεκτικά προς το 5 β -προϊόν (τα υδρογόνα των εφαιπτόμενων κυκλοεξανικών δακτυλίων είναι σε *anti*-θέση) και γι αυτό χαρακτηρίζεται και ως β -ρεδουκτάση (β -reductase).^{86a} Η δυνατότητα του ενζύμου, όντας κετορεδουκτάση, να ανάγει το δεσμό C-C και η εμπλοκή του στον μεταβολισμό της κορτισόλης και της ίασης του άσθματος προκαλεί το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητικών ομάδων.^{86b} Είναι γνωστό πως η μετάλλαξη ενός μονάχα αμινοξέος, του γλουταμικού στη θέση 120 και αντικατάστασή του από την ιστιδίνη, αρκεί ώστε το ένζυμο να δρα πλέον αποκλειστικά ως αναγωγίαση των καρβόνυλο-

ομάδων των στεροειδών.^{86b} Για το λόγο αυτό η ερευνητική ομάδα που σύνθεσε το τροποποιημένο αυτό ένζυμο χαρακτήρισε την περίπτωση ως «example of perfect enzyme engineering» (παράδειγμα τέλει ενζυμικής μηχανικής).^{86b}

Στο Κεφάλαιο 1 έχει γίνει αναφορά στην ικανότητα ορισμένων απομονωμένων κετορεδουκτασών να δρουν ως ene-ρεδουκτάσες. Στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν στο κεφάλαιο αυτό, διαπιστώνεται ότι η δράση του ενζύμου ως κετορεδουκτάση ή ene-ρεδουκτάση, εξαρτάται καθαρά από τη φύση της δομής των μορίων. Σε αυτό συνηγορούν τόσο τα πειραματικά αποτελέσματα, που παραθέτονται στο κεφάλαιο αυτό σε σύγκριση με τα πειραματικά αποτελέσματα που ήδη γνωρίζουμε, από την εφαρμογή του ίδιου πειραματικού πρωτοκόλλου σε πληθώρα υποστρωμάτων, με πραγματικά εξαιρετικά αποτελέσματα σε αντιδράσεις μικρής και μεγάλης κλίμακας.¹⁴

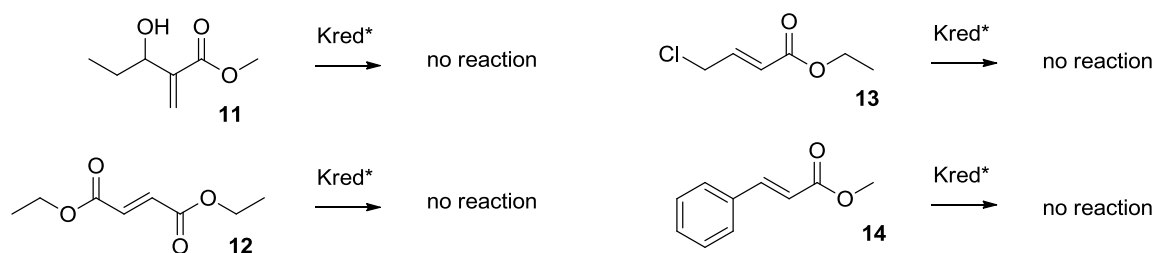
Έχοντας κάποιες πρώτες ενδείξεις για την δράση ορισμένων κετορεδουκτασών ως ene-ρεδουκτάσες, μελετήσαμε την δράση αυτή σε ακόρεστους εστέρες. Χρησιμοποιήσαμε τον εμπορικά διαθέσιμο διεστέρα **12** (Σχήμα 39) και συντέθηκαν (Σχήμα 38) οι εστέρες **11** (με αντίδραση Baylis-Hillman), ο εστέρας **13** (με αντίδραση αναγωγής και αφυδάτωσης) και ο εστέρας **14** (με αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης και αφυδάτωσης).



Σχήμα 38. Συνθετική πορεία των εστέρων **11**, **13** και **14**.

Στο Σχήμα 39 βλέπουμε τις βιοκαταλυτικές αυτές αναγωγές των ενώσεων **11-14**. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, δεν μετατρέπουν μόρια όπως α,β-ακόρεστοι εστέρες, παρά μόνο α,β-ακόρεστες κετο-ενώσεις (Σχήμα 39). Στο Σχήμα 30, παραθέτονται 6 Kreds, οι οποίες όπως θα δούμε στη συνέχεια (Πίνακας 5), είναι τα

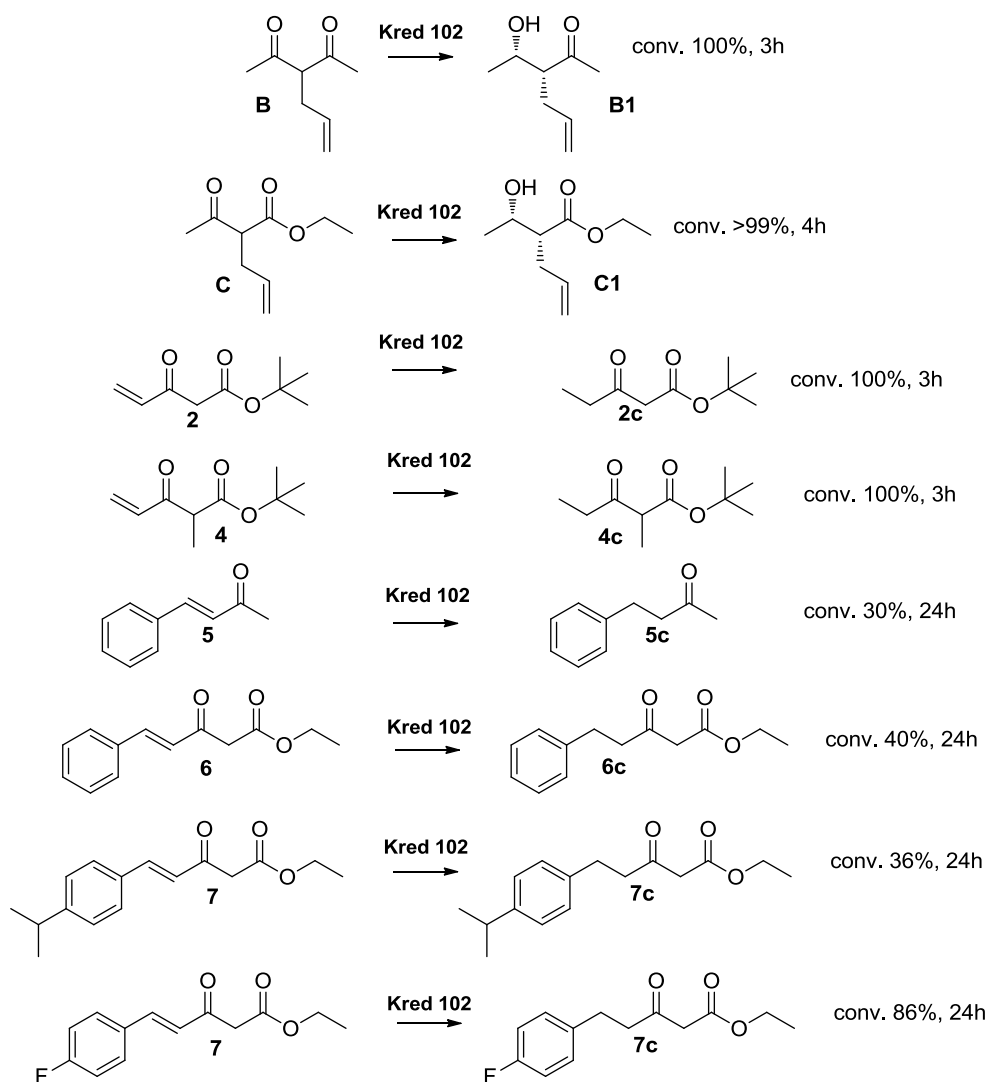
ένζυμα που εμφάνισαν την πιο μεγάλη δραστικότητα ως προς την αναγωγή του δεσμού άνθρακα-άνθρακα.



* Kred: 102, 106, 108, 109, 118, 126

Σχήμα 39. Οι Kred 102, 106, 108, 109, 118, 126 δεν δέχονται ως υποστρώματα α,β-ακόρεστους εστέρες.

Μόρια που διαθέτουν ένα διπλό δεσμό, που δεν είναι σε α-θέση ως προς το κετονικό καρβονύλιο (μη ενεργοποιημένοι διπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα), δεν υφίστανται αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού. Η παρατήρηση αυτή, ήταν ήδη γνωστή από προηγούμενες περιπτώσεις και παρουσιάστηκαν κάποιες στο Κεφάλαιο 1.⁸⁷ Επιπλέον, δεν είναι γνωστά ακόμα ένζυμα που να ανάγουν μη ενεργοποιημένους δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Ούτε οι ene-ρεδουκτάσες μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση αυτή. Μια πιθανή ερμηνεία για την μη αναμενόμενη δράση των κετορεδουκτασών είναι πως το σύστημα C=C-C(O)-C, διαφοροποιεί δραματικά τον τρόπο πρόσδεσης του μορίου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ή γενικά τον τρόπο σύνδεσης μορίου-συνενζύμου-αμινοξέων ενεργού κέντρου, σε σχέση με το σύστημα C-C-C(O)-C-. Δηλαδή, ενεργοποιημένοι διπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα, μπορούν να αναχθούν, από τα ένζυμα. Συγκεκριμένα λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις διαφορετικών ακόρεστων κετονών και κετοεστέρων με την Kred 102, η οποία παρατηρήσαμε ότι εμφάνισε δράση ene-ρεδουκτάσης κατά τα πειράματα του Κεφαλαίου 1, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφοροποίηση στη δράση λόγω της δομικής διαφοράς των ακόρεστων υποστρωμάτων. Στο Σχήμα 40, παραθέτονται οι διαφοροποιήσεις αυτές στη δράση της Kred 102.

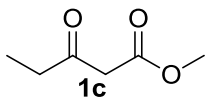
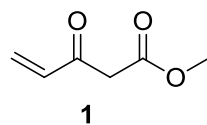
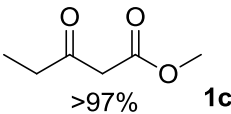
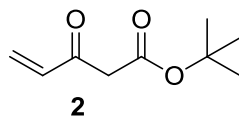
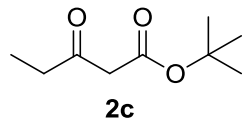
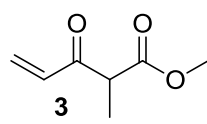
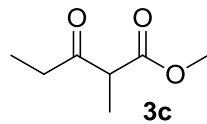


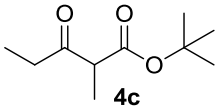
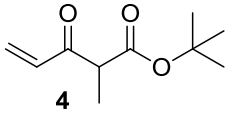
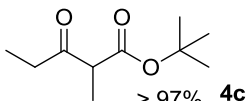
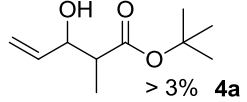
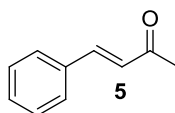
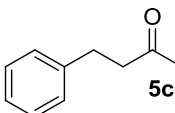
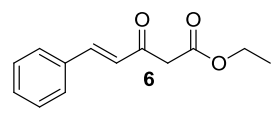
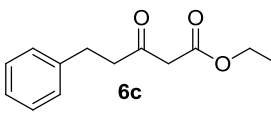
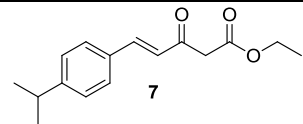
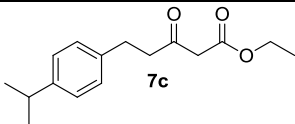
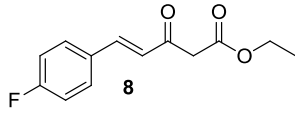
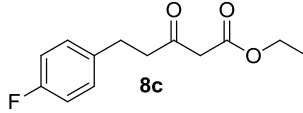
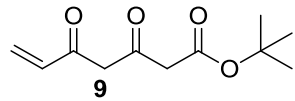
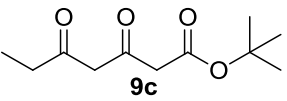
Σχήμα 40. Συγκριτική παρουσίαση της ενζυμικής αναγωγής των κορεσμένων υποστρωμάτων **B**, **C** και των ακόρεστων **2**, **4**, **5**, **6**, **7** και **8** με την Kred 102.

Οι ενζυμικές αναγωγές που απεικονίζονται στο Σχήμα 40 έχουν γίνει στις ίδιες συνθήκες (37 °C, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6.9). Γίνεται φανερό ότι η διαφοροποίηση στα υποστρώματα προκαλεί διαφοροποίηση στη δράση του ενζύμου. Στις δυο πρώτες περιπτώσεις ο διπλός δεσμός της αλλυλικής ομάδας παραμένει ανέπαφος και τα υποστρώματα μετατρέπονται με υψηλή εναντιο- και διαστεreo-εκλεκτικότητα στην αντίστοιχη υδρόξυ κετόνη και τον αντίστοιχο υδρόξυ εστέρα. Στις υπόλοιπες πέντε περιπτώσεις ο διπλός δεσμός είναι σε α,β θέση ως προς το κετονικό καρβονύλιο και όχι σε γ,δ-θέση όπως στα υποστρώματα **B** και **C**. Και στις πέντε περιπτώσεις σαν μοναδικό προϊόν προέκυψε η κορεσμένη καρβόνυλο ένωση σε απόδοση 30-100% και χρόνο αντίδρασης 3h-24h.

Με βάση λοιπόν τα δεδομένα που είχαν συλλεχθεί από τη μελέτη της βιοκαταλυτικής αναγωγής του καρβονυλίου των ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 1, προχωρήσαμε σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων για να μελετηθεί η μη αναμενόμενη αυτή δράση των ενζύμων. Στον Πίνακα 5, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων μιας σειράς υποστρωμάτων που διαθέτουν χαρακτηριστικά το α,β- (ή γ,δ ή ε,ζ κατά περίπτωση) ακόρεστο κετο- (ή δι-κετο κατά περίπτωση) σύστημα, προς τα αντίστοιχα κορεσμένα κετο (ή δι-κετο)- προϊόντα.

Πίνακας 5. Ενζυμική αναγωγή του διπλού δεσμού των α,β-ακόρεστων ενώσεων **1-9**.

Υπόστρωμα	α/α	Kred	Ποσοστό	
			Μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν/τα ^b
	1	105	100% (3h)	 1c
	2	108	100% (3h)	
	3	118	100% (3h)	
 1	4	107	100% (3h)	 >97% 1c
	5	A ₁ B	100% (3h)	
	6	B ₁ F	100% (3h)	
 2	7	108	100% (3h)	 2c
	8	109	100% (3h)	
	9	118	100% (3h)	
	10	119	100% (3h)	
	11	127	100% (3h)	
 3	12	106	100% (12h)	 3c
	13	109	100% (12h)	
	14	116	100% (12h)	
	15	118	100% (12h)	
	16	126	100% (12h)	

	17	127	100% (12h)	
	18	128	100% (12h)	
	19	106	100% (12h)	
	20	108	100% (12h)	
	21	109	100% (12h)	
	22	118	100% (12h)	
	23	127	100% (12h)	
	24	128	100% (12h)	
	25	131	100% (12h)	
	26	B ₁ E	100% (12h)	
	27	104	100% (12h)	
	28	105	100% (12h)	
	29	116	100% (12h)	
	30	A ₁ B	100% (12h)	
	31	102	30% (12h)	
	32	106	30% (12h)	
	33	126	20% (12h)	
	34	102	47% (12h)	
	35	106	64% (12h)	
	36	107	57% (12h)	
	37	126	100% (12h)	
	38	102	36% (12h)	
	39	126	35% (12h)	
	40	102	86% (12h)	
				
	41	102	^a (12h)	
	42	108	^a (12h)	
	43	116	^a (12h)	
	44	126	^a (12h)	

^a Ο υπολογισμός της μετατροπής δεν ήταν δυνατόν να είναι ακριβής γιατί το υπόστρωμα, όπως

διαπιστώθηκε μέσω ενός τυφλού (*blind*) πειράματος, δεν ήταν σταθερό στο ρυθμιστικό διάλυμα και καταστρεφόταν.^b Οι μετατροπές και τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν από τα φάσματα ¹H NMR.

Το υπόστρωμα **1** με τις Kred 105, 108 και 118 οδήγησε στον αποκλειστικό σχηματισμό του κορεσμένου κετοεστέρα. Υψηλή δραστηριότητα εμφάνισαν και τα ένζυμα 107, A1B και 107, αλλά σχηματίστηκε σε μικρά ποσοστά και ο ακόρεστος υδρόξυ-εστέρας. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, το υπόστρωμα **1** είναι ασταθές στις συνθήκες της αντίδρασης, παρόλα αυτά στο διάστημα των πρώτων 2-3 ωρών της αντίδρασης δεν παρουσιάζονται τέτοια προβλήματα και ο χρόνος είναι αρκετός για να ολοκληρωθεί η ενζυμική αντίδραση. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και από το υπόστρωμα **2** και στην περίπτωση των ενζύμων 102, 108, 109 και 118 υπάρχει απόλυτη συμφωνία. Τα υποστρώματα **3** και **4** με τα ένζυμα 102, 106, 109, 118, 127 και 128 οδηγούν στην αποκλειστική σύνθεση των κορεσμένων εστέρων **3c** και **4c**, αντίστοιχα. Τα ένζυμα 102, 106, 108, 118, 109 και 126 εμφανίζουν σε πολλές περιπτώσεις δράση επε-ρεδουκτάσης. Στο υπόστρωμα **5**, οι μετατροπές είναι χαμηλές ωστόσο το μοναδικό προϊόν είναι η ακόρεστη κετόνη **5c** με τις Kred 102, 106 και 126. Η σύνδεση του διπλού δεσμού με τον βενζολικό δακτύλιο πιθανώς να μην ευνοεί την αναγωγή του διπλού δεσμού από το ένζυμο. Όπως φαίνεται και από τους κετοεστέρες **6-8**, οι Kred δυσκολεύονται να ανάγουν το διπλό δεσμό σε βενζυλική θέση. Ο εστέρας **6** ανάχθηκε με εξαιρετική απόδοση από την Kred 126, ενώ οι μετατροπές των Kred 102 και 106 ήταν χαμηλές αλλά ικανοποιητικές. Σημαντικό στοιχείο είναι πως ο εστέρας **6** με την Kred 107 έδωσε ως αποκλειστικό προϊόν τον κορεσμένο εστέρα **6c**, αποτέλεσμα μη αναμενόμενο καθώς η Kred 107 (Κεφάλαιο 1) ανάγει το υπόστρωμα **5** προς την *R* αλλυλική αλκοόλη. Ο εστέρας **7**, μετατράπηκε σε χαμηλά ποσοστά στον αντίστοιχο κορεσμένο εστέρα **7c** και τέλος ο εστέρας **8** έδωσε ικανοποιητικό αποτέλεσμα μόνο με την Kred 102, ενώ με τα υπόλοιπα ένζυμα η απόδοση ήταν σχεδόν μηδενική.

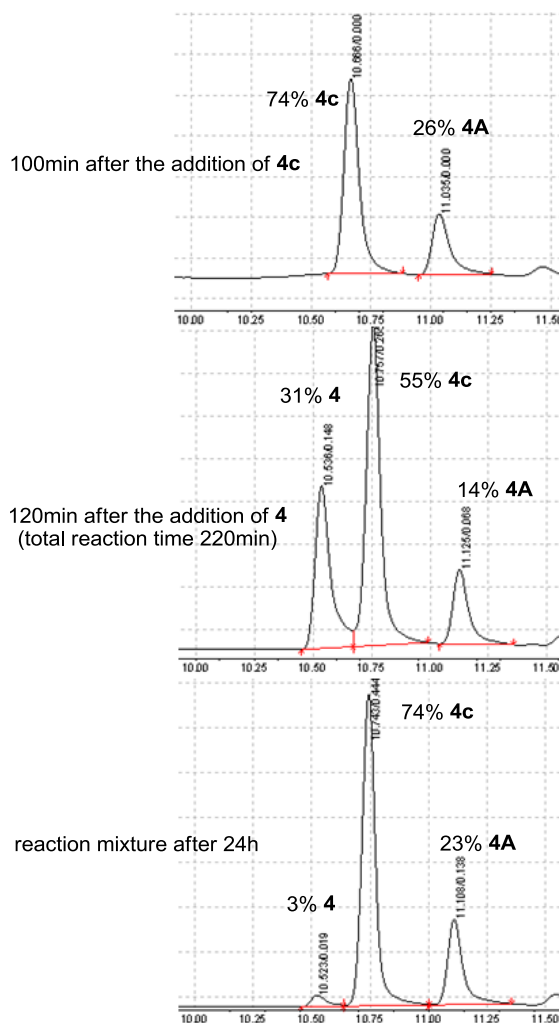
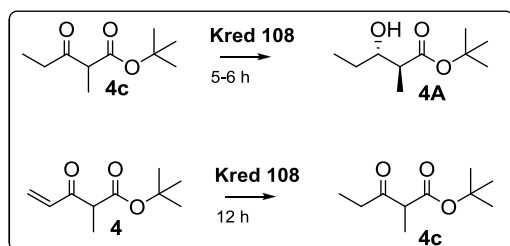
Παραπάνω αναφέρθηκε πως τα ένζυμα 108 και 118 εμφανίζουν δράση επε-ρεδουκτάσης. Στην περίπτωση των υποστρωμάτων **1-4** αυτό επιβεβαιώνεται. Στην περίπτωση του υποστρώματος **5** επιβεβαιώνεται αλλά η μετατροπές είναι πολύ χαμηλές. Αντίθετα στα υποστρώματα **6-8** οδηγούμαστε σε μίγμα προϊόντων, συνήθως σε μίγμα προϊόντος αναγωγής στο καρβονύλιο και προϊόντος διπλής αναγωγής στο καρβονύλιο και το διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα και αναλογίες 70% και 30%

αντίστοιχα.

Η αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού, απαιτεί την παρουσία όλων των παραγόντων της αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα, συνένζυμο, ανακυκλωτικό σύστημα), φαίνεται δηλαδή πως η αντίδραση λαμβάνει χώρα μάλλον στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.⁸⁸ Η μη αναμενόμενη αυτή δράση των ενζύμων, πιθανώς να οφείλεται στην αντίδραση του διπλού δεσμού, παρουσία του συνενζύμου και του συστήματος ανακύκλωσης του συνενζύμου, με κάποιο ή κάποια από τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Μπορεί ακόμα να πραγματοποιείται κάποια αντίδραση μεταξύ του υποστρώματος και κάποιου αμινοξέος στην επιφάνεια του ενζύμου παρουσία ίσως του συνενζύμου.

Η αντίδραση του κετοεστέρα **2** με την κετορεδουκτάση 108 σε ένα βήμα, ακόμα και μετά από 24 ώρες, δεν οδηγεί στην παραγωγή ακόρεστου υδρόξυ προϊόντος, αλλά σταματά στον σχηματισμό του κορεσμένου κετοεστέρα **2c**. Αυτό το αποτέλεσμα είναι μια ένδειξη ότι το ακόρεστο υπόστρωμα επιφέρει κάποια αλλαγή στο ένζυμο, που το καθιστά μη δραστικό για την αναγωγή του κορεσμένου κετοεστέρα. Αυτή η μεταβολή, μπορεί εξίσου να προκληθεί από μια αντίδραση στην επιφάνεια του ενζύμου ή κοντά στο ενεργό κέντρο του που τροποποιεί την δραστικότητα του ενζύμου απέναντι στην αναγωγή καρβονυλίων, αλλά και από την περίπτωση το υπόστρωμα να αντιδρά εντός του ενεργού κέντρου τροποποιώντας πάλι την δραστικότητα του ενζύμου.

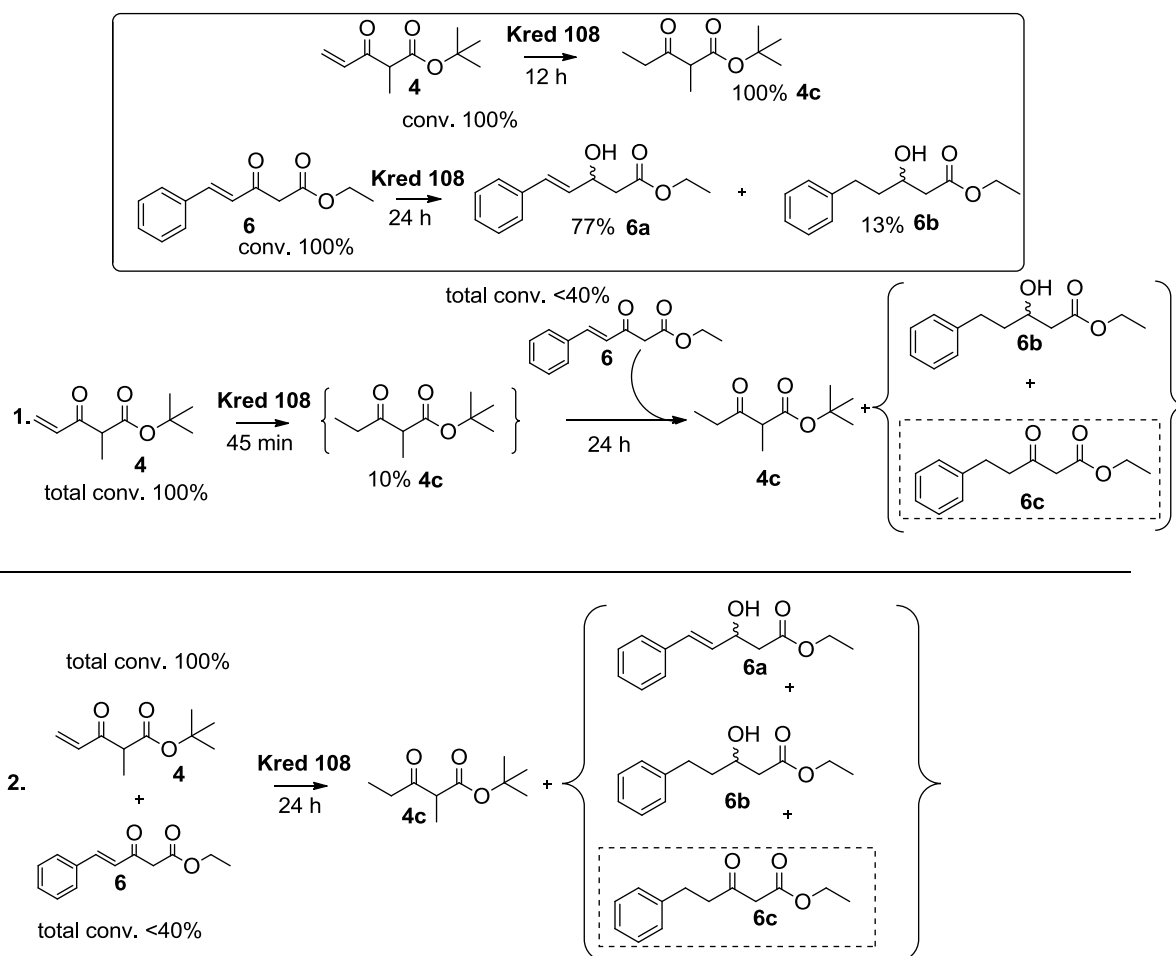
Για να μελετήσουμε τα αποτελέσματα που μπορεί να επιφέρει η εισαγωγή ενός υποστρώματος με α,β-ακόρεστο κετο-σύστημα σε μια συνηθισμένη ενζυμική μετατροπή ενός υποστρώματος, πραγματοποιήσαμε το πείραμα που φαίνεται στο Σχήμα 41. Από παλαιότερη μελέτη στο εργαστήριο, γνωρίζουμε πως ο κορεσμένος εστέρας **4c** δίνει αποκλειστικά με την Kred 108 το ένα από τα 4 πιθανά διαστερομερή και συγκεκριμένα τον υδρόξυ εστέρα **4A** σε 3.5 ώρες. Προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση του ακόρεστου εστέρα **4** στην γνωστή αυτή περίπτωση βιοκαταλυτικής αναγωγής και συγκεκριμένα το αν θα καταναλωθεί και ο **4** και ο **4c** προς το σχηματισμό του υδρόξυ εστέρα **4A**.



Σχήμα 41. Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του κετοεστέρα **4** στην ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα **4c** προς τον υδρόξυ εστέρα **4A**.

Ο **4c** αφέθηκε να αντιδράσει για 100 λεπτά και με αέριο χρωματογραφία (GC) διαπιστώθηκε ότι το 26% του **4c** είχε μετατραπεί στον **4A**. Κατόπιν προστέθηκε ο εστέρας **4** και η αντίδραση ελέγχθηκε ξανά με GC μετά από 120 λεπτά και διαπιστώθηκε ότι είχαμε ένα μίγμα του εστέρα **4** (31%), του εστέρα **4c** (55%) και του υδρόξυ εστέρα **4A** (14%). Συνεπώς η Kred 108 μετέτρεψε τον εστέρα **4** σίγουρα προς τον κορεσμένο εστέρα **4c**. Η αντίδραση αφέθηκε για 24 ώρες και ελέγχθηκε ξανά με τον ίδιο τρόπο. Στο τελικό μίγμα εντοπίστηκε μόλις ένα 3% από τον ακόρεστο εστέρα **4**, 74% από τον κορεσμένο εστέρα **7c** και 23% από τον υδρόξυ εστέρα **4A**. Στο Σχήμα 41 δίνεται η εικόνα δυο ανταγωνιστικών ενζυμικών αντιδράσεων: της αντίδρασης αναγωγής του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα του ακόρεστου υποστρώματος που οδηγεί στο **4c** και του καρβονυλίου του κορεσμένου υποστρώματος που οδηγεί στο

4A και τελικώς ευνοείται η αναγωγή του δεσμού άνθρακα-άνθρακα. Το ένζυμο μετέτρεψε τον **4c** που παράχθηκε από τον εστέρα **4** προς τον υδρόξυ εστέρα **4A**.

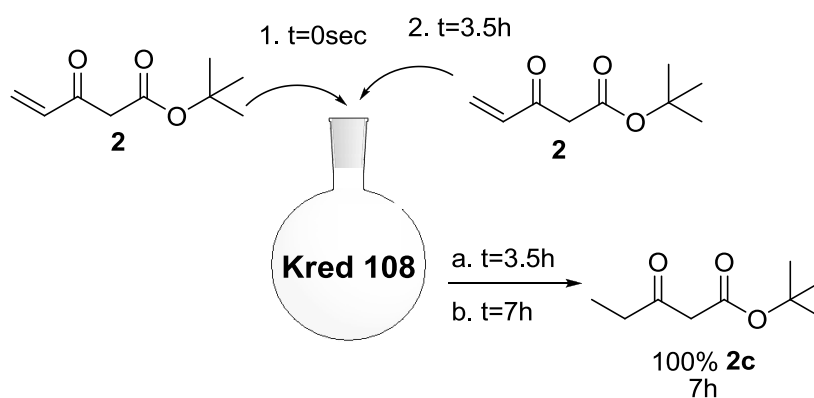


Σχήμα 42. Μελέτη της αλλαγής δραστηριότητας της κετορεδοκτάσης 108 στην περίπτωση μίγματος υποστρωμάτων που οδηγούν σε διαφορετικές χημικές μετατροπές.

Εν συνεχεία πραγματοποιήσαμε δυο πειράματα (Σχήμα 42), με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του α,β -ακόρεστου κετο-συστήματος στην ενζυμική μετατροπή ενός μίγματος δυο διαφορετικών μορίων, με κοινό στοιχείο το σύστημα αυτό. Με βάση τα παραπάνω, αναμέναμε τα πειράματα να παράγουν διαφορετικά αποτελέσματα. Η επιλογή του ενζύμου καθορίστηκε από την ικανότητά του να μετατρέπει τα υποστρώματα **4** και **6** σε διαφορετικά προϊόντα. Στην πρώτη περίπτωση η κετορεδοκτάση 108, έδρασε για 45 λεπτά μόνο παρουσία του **4** (μετατράπηκε το 10% του **4** σε **4c**). Στη συνέχεια προστέθηκε ο εστέρας **6** και το μίγμα αφέθηκε για 24 ώρες. Στο τελικό μίγμα της αντίδρασης προσδιορίστηκαν (με φασματογραφία ^1H

NMR) ο κορεσμένος εστέρας **4c**, ο εστέρας **6b** (προϊόν διπλής αναγωγής) και ο κορεσμένος εστέρας **6c**. Δεν εντοπίστηκε καθόλου ο ακόρεστος υδρόξυ εστέρας **6a**. Αυτό υποδεικνύει ότι ο ακόρεστος εστέρας **4** προκάλεσε κάποια μεταβολή στη δραστηρότητα της Kred 108. Η μετατροπή του εστέρα **4** ήταν εξαιρετική ενώ η μετατροπή του εστέρα **6** ήταν μειωμένη αισθητά. Στο δεύτερο πείραμα, οι δυο εστέρες προστέθηκαν ταυτόχρονα και όπως φαίνεται στο Σχήμα 42, ο ακόρεστος εστέρας **4** μετατράπηκε πλήρως στον κορεσμένο εστέρα **4c** και ο εστέρας **6** έδωσε τα δυο αναμενόμενα υδρόξυ προϊόντα και ξανά τον εστέρα **6c**. Αυτό σημαίνει ότι ξανά η αλληλεπίδραση του ακόρεστου εστέρα **4** με το ένζυμο οδήγησε στην σύνθεση του κορεσμένου εστέρα **6c**. Η μετατροπή του εστέρα **6** ήταν και πάλι μικρή. Συμπεραίνουμε, επομένως, ότι παρουσία ακόρεστων συστημάτων, όπως αυτά που μελετήθηκαν, οι κετορεδουκτάσες διαφοροποιούν την δραστηρότητά τους και εμφανίζουν καταλυτική ικανότητα όμοια με τις επε-ρεδουκτάσες.

Όπως είδαμε, ο εστέρας **2** μετατρέπεται από την κετορεδουκτάση 108 στον εστέρα **2c** σε 3 ώρες. Επίσης αναφέρθηκε πως δεν παρατηρήθηκε απενεργοποίηση των ενζύμων. Με το πείραμα του Σχήματος 43 ελέγχθηκε η παρατήρηση αυτή. Προστέθηκε ο ακόρεστος εστέρας **2** και αφέθηκε να αντιδράσει για 3.5 ώρες. Με αέριο χρωματογραφία διαπιστώθηκε η πλήρης μετατροπή του εστέρα **2** προς τον κορεσμένο εστέρα **2c**. Στη συνέχεια προστέθηκε ίση ποσότητα από τον εστέρα **2** και η αντίδραση ελέγχθηκε μετά από 3.5 ώρες με GC όπου διαπιστώθηκε το πέρας της αντίδρασης. στο φάσμα ^1H NMR της αντίδρασης εντοπίστηκε μόνο ο κορεσμένος εστέρας **2c**, επομένως το ένζυμο παρέμεινε δραστικό και διατήρησε τη δράση επε-ρεδουκτάσης.

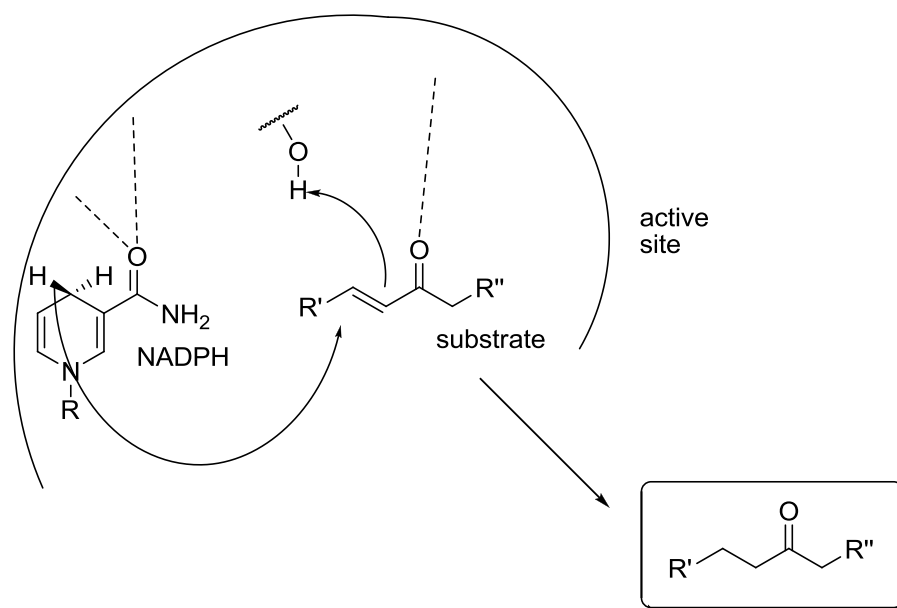


Σχήμα 43. Μελέτη της επίδρασης του ακόρεστου υποστρώματος **2** στην πιθανή απενεργοποίηση του ενζύμου.

Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα το ένζυμο με κάποιο τρόπο τροποποιείται κατά την αντίδρασή του με υποστρώματα όπως το **2** ή το **4** και χάνει, μερικώς ή ολοκληρωτικά, την ικανότητά του να ανάγει το β-καρβονύλιο. Το συμπέρασμα αυτό όμως δεν μπορεί να γενικευτεί, γιατί όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1, υποστρώματα όπως το **6**, **7**, και **8** με τα ένζυμα A_1B , A_1D και A_1C δίνουν προϊόν διπλής αναγωγής, με αναγωγή στο διπλό δεσμό και αναγωγή στο καρβονύλιο του κορεσμένου εστέρα.

Έχοντας, πλέον, αρκετά αποτελέσματα που απεικονίζουν αυτή τη διαφοροποίηση της δράσης των κετορεδουκτασών, μπορούμε να πούμε πως η απρόσμενη αυτή δράση εξαρτάται κυρίως από τη δομή του υποστρώματος. Για την ακρίβεια, μπορεί να εκδηλωθεί όταν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, ένα μόριο που φέρει αυτό το α,β-ακόρεστο κετο-σύστημα. Η δομή του ενζύμου, πιθανώς, να τροποποιείται με κάποιο τρόπο από το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να δρα αποκλειστικά ως ene-ρεδουκτάση. Η δράση που διαπιστώθηκε από τα ένζυμα $Kred$ A_1B , A_1C και A_1D στο υπόστρωμα **6** και των 118, 119, 120 και 131 στο υπόστρωμα **9** που οδηγεί σε προϊόντα διπλής αναγωγής, υποδεικνύει πως στις περιπτώσεις αυτές το ένζυμο δρα αρχικά ως ene-ρεδουκτάση, χωρίς να υποστεί κάποια σημαντική τροποποίηση (διατηρεί τη δράση κετορεδουκτάσης) από το υπόστρωμα και εν συνεχεία ανάγει και το β- ή το δ-, κατά περίπτωση, καρβονύλιο. Το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκε, ο κορεσμένος εστέρας, μπορεί να σημαίνει πως οι δυο αντιδράσεις γίνονται η μια μετά την άλλη, χωρίς το υπόστρωμα να βγει από το ενεργό κέντρο.

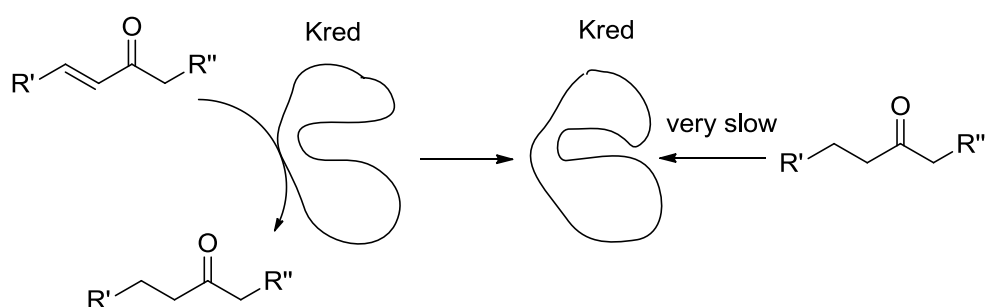
Οι ene-ρεδουκτάσες, προσβάλλουν το διπλό δεσμό C-C, με την μεταφορά ενός υδριδίου (από το NADH ή το NADPH ή το $FADH_2$, ή άλλου αναγωγικού) μέσω μιας Michael προσθήκης και με πρωτονίωση του καρβανιόντος από το υδρογονοκατιόν (H^+) του υδροξυλίου μιας τυροσίνης ή σερίνης. Είναι γνωστό πως ένα κατάλοιπο τυροσίνης ή σερίνης (στο ενεργό κέντρο) στις αλκοολικές αφυδρογονάσεις παίζει αντίστοιχο ρόλο (αλλά για το ανιόν οξυγόνου, κατά την προσβολή του καρβονυλικού-C από το ανιόν υδριδίου) με αυτό στις ene-ρεδουκτάσες. Δύναται συνεπώς να γίνει μια τέτοια αντίδραση Michael μεταξύ διπλού δεσμού C-C και H^+ , (Σχήμα 44), η οποία οδηγεί στην ασυνήθιστη για τις κετορεδουκτάσες δράση.



Σχήμα 44. Πιθανή Michael μεταφορά υδριδίου από το συνένζυμο στο υπόστρωμα.

Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να διευκρινιστεί περαιτέρω με την σύνθεση προχειρόμορφων α,β-ακόρεστων κετο-υποστρωμάτων. Θεωρητικά η ενζυμική μετατροπή τέτοιων προχειρόμορφων υποστρωμάτων θα οδηγούσε σε παραγωγή κορεσμένων ασύμμετρων κετο- προϊόντων, ανάλογα με το ποιο υδρίδιο του συνενζύμου προσβάλλει το διπλό δεσμό C-C. Αν αυτό διαπιστωνόταν πειραματικά, τότε θα υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις υπέρ ενός τέτοιου μηχανισμού. Σημαντικό στοιχείο είναι ότι, απουσία του συνενζύμου δεν πραγματοποιείται καμιά αντίδραση. Άρα, το συνένζυμο φαίνεται πως είναι πιθανός δότης υδριδίου που τελικώς προκαλεί την αναγωγή του διπλού δεσμού. Παραμένει το ερώτημα γιατί το ένζυμο δεν μπορεί να καταλύσει πλέον την αναγωγή του κετονικού καρβονυλίου του κορεσμένου κετοεστέρα (δλ του προϊόντος αναγωγής του διπλού δεσμού C-C). Συγκεκριμένα δεν ήταν δυνατό να διευκρινιστεί ποια τροποποίηση επιφέρουν τα ακόρεστα υποστρώματα στο ένζυμο. Ενδεχομένως η αντίδραση αναγωγής του διπλού δεσμού να μην λαμβάνει χώρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά σε κάποια περιοχή εκτός του ενεργού ενζύμου, παρουσία του συνενζύμου, προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωση του ενζύμου, ώστε να μην δέχεται πλέον υποστρώματα στο ενεργό κέντρο, ή να εισέρχονται με πάρα πολύ μικρή ταχύτητα (που πρακτικά μπορεί να είναι αμελητέα) όπως φαίνεται στο Σχήμα 45. Μια τέτοια προσέγγιση όμως δεν

μπορεί να ερμηνεύσει γιατί το υπόστρωμα **9** αντιδρά με πολύ μικρότερη ταχύτητα από τα υποστρώματα **1**, **2**, **3**, **4**. Επίσης έρχεται σε αντίθεση με το πείραμα του Σχήματος 43, όπου διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο δεν απενεργοποιείται, αλλά αποκτά μόνιμη δράση ως επε-ρεδουκτάση.



Σχήμα 45. Απεικόνιση της πιθανής τροποποίησης του ενζύμου, από την αντίδραση του ενζύμου με αμινοξέα στην επιφάνειά του.

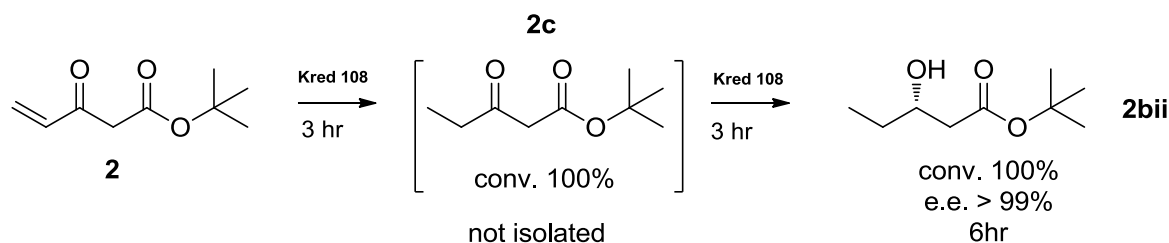
Η μελέτη της ασυνήθιστης αυτής δράσης χρειάζεται ακόμα προσπάθεια για να αποσαφηνιστεί. Όμως, η μέχρι τώρα μελέτη της, μπορεί να μας επιτρέψει να χρησιμοποιήσουμε τα ένζυμα αυτά, σε one pot διεργασίες, με στόχο τη σύνθεση κορεσμένων β-υδρόξυ κετοεστέρων με υψηλή οπτική καθαρότητα, είτε με τη χρήση του ίδιου ενζύμου: προσθήκη ενζύμου για την αναγωγή του διπλού δεσμού C-C και νέα προσθήκη ενζύμου για την αναγωγή του κετονικού καρβονυλίου, είτε με τη χρήση διαφορετικών ενζύμων σε διαδοχικά βήματα, στο ίδιο πάντα εργαστηριακό σκεύος.

**Σύνθεση οπτικώς καθαρών β-υδρόξυ εστέρων, από γ,δ-
ακόρεστους β-κετοεστέρες με τη χρήση δύο κετορεδουκτασών στο
ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot)**

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, διαθέτουμε δεδομένα που μας επιτρέπουν να αξιοποιήσουμε τα ένζυμα αυτά για την εναντιοεκλεκτική αναγωγή του καρβονυλίου α,β-ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων (όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 1), και μπορούμε υπό συνθήκες να χρησιμοποιήσουμε τα ίδια ένζυμα για την αναγωγή του διπλού δεσμού α,β-ακόρεστων καρβόνυλο ενώσεων.

Η χρήση των δυο αυτών διαφορετικών ιδιοτήτων των ενζύμων, ειδικά όταν απαντώνται στο ίδιο ένζυμο, είναι ένα συνθετικό εργαλείο εξαιρετικά χρήσιμο. Η δυνατότητα αναγωγής του διπλού δεσμού μιας α,β ακόρεστης κετο-ένωσης και σε δεύτερο επίπεδο η υψηλής εναντιοεκλεκτικότητας αναγωγή του καρβονυλίου, στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot), με το ίδιο ένζυμο ή με συνδυασμό δυο ενζύμων, για την παραγωγή μιας κορεσμένης υδρόξυ- ένωσης με υψηλή εναντιο-, τοπο- και διαστεreo- εκλεκτικότητα, είναι μεγάλης σημασίας για την συνθετική πορεία μιας επιθυμητής χημικής ένωσης και συνήθως σχεδόν αδύνατη με τη χρήση χημικών καταλυτών. Από παλαιότερες εφαρμογές της χρήσης δυο κετο-ρεδουκτασών στην σύνθεση χειρόμορφων δι-υδρόξυ ενώσεων,^{10, 14a} ξέρουμε πως δεν παρατηρούνται προβλήματα κατά τη συνθετική πορεία (π.χ. καταστροφή ενζύμου, μείωση ταχύτητας αντίδρασης κλπ).

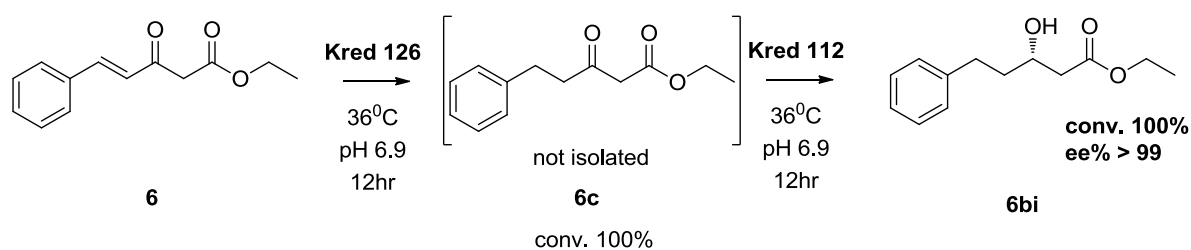
Έτσι ξεκινώντας από το υπόστρωμα **2** παράχθηκε σε δυο βήματα, χωρίς να απομονωθεί το ενδιάμεσο προϊόν **2c**, ο υψηλής οπτικής καθαρότητας υδρόξυ εστέρας **2bii**, σε έξι ώρες.



Σχήμα 46. Μετατροπή του εστέρα **2** στον οπτικώς καθαρό υδρόξυ εστέρα **2c** με τη χρήση του ίδιου ενζύμου σε δυο στάδια, στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot).

Το υπόστρωμα **6** με την κετορεδουκτάση 126 σε 12 ώρες έδωσε αποκλειστικά

τον κορεσμένο κετοεστέρα **6c**. Σε συνδυασμό με μια δεύτερη κετορεδουκτάση μπορεί να παραχθεί ο υψηλής οπτικής καθαρότητας κορεσμένος υδρόξυ εστέρας, **6bi**.



Σχήμα 47. Μετατροπή του εστέρα **6** στον οπτικώς καθαρό υδρόξυ-εστέρα **6bi** με τη χρήση του ίδιου ενζύμου σε δυο στάδια, στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot).

Δυνητικά, μια τέτοια διαφοροποίηση στη δραστηριότητα των κετορεδουκτασών, μπορεί να δώσει στον ερευνητή τη δυνατότητα να σχεδιάσει και να ελέγχει το πώς θα δράσει το ένζυμο σε τέτοιες περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν δείχνουν πως μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τα ένζυμα αυτά, για βιοκαταλυτικές αναγωγές δεσμών άνθρακα-άνθρακα, σε μια σειρά μορίων σαν αυτά που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά και να συνδυάσουμε ένζυμα για την σύνθεση κορεσμένων υδρόξυ ενώσεων από πρόδρομους ακόρεστους β-κετοεστέρες. Η απόδοση είναι από ικανοποιητική έως πολύ υψηλή, σε συγκεντρώσεις του ενζύμου της τάξης του 0.1-1% mol.

Θεωρητικά, η εφαρμογή των ενζύμων αυτών, μπορεί να επεκταθεί και σε άλλα παραπλήσια δομής υποστρώματα. Επιπλέον, μας δίνεται η δυνατότητα της μετατροπής α,β-ακόρεστων κετονών, α,β-ακόρεστων 1,3-δικετονών, γ,δ-ακόρεστων β-κετοεστέρων και ε,ζ-ακόρεστων β,δ-δικετοεστέρων, στα αντίστοιχα κορεσμένα υδρόξυ προϊόντα σε δυο βήματα, στο ίδιο εργαστηριακό σκεύος (one pot), με υψηλή απόδοση και υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το επιθυμητό προϊόν, σε ήπιες συνθήκες αντίδρασης, χωρίς χρήση τοξικών διαλυτών ή άλλων αντιδραστηρίων. Ένα συνθετικό εργαλείο μεγάλης σημασίας, τόσο για τις εργαστηριακές ανάγκες και εφαρμογές, όσο και για μελλοντική βιομηχανική χρήση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α΄ ΜΕΡΟΥΣ

Αντιδραστήρια.

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδροφουράνιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.⁸⁹

Οι κετορεδουκτάσες, το συνένζυμο NADPH και η αφυδρογονάση της γλυκόζης ήταν της εταιρίας Codexis και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Όργανα.

Τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR ελήφθησαν με το φασματόμετρο 300 MHz ή 500 MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) σε διαλύτη CDCl_3 . Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο της Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated κυκλοδεξτρίνη) 30m x 0.25mm x 0.25 μm .

Γενικές συνθετικές μέθοδοι.

Γενική αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης και οξείδωσης με το αντιδραστήριο Jones για τη σύνθεση των υποστρωμάτων **1**, **2**, **3** και **4**.

Αλδολική Συμπύκνωση: Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ξηρή δι-ισοπροπυλαμίνη (462 μL , 3.3. mmol) διαλύθηκε σε ξηρό THF (10 mL). Το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και BuLi 1.6 M σε εξάνια (2.0 mL, 3.3 mmol) προστέθηκε στάγδην. Ανάδευση για 15 λεπτά στους 0 °C και ψύξη στους -60 °C, κατόπιν διάλυμα του εστέρα ή της κετόνης (3 mmol) σε ξηρό THF (2 mL) προστέθηκε και το μίγμα αναδεύτηκε για 20 min στους -78 °C. Αποσταγμένη αλδεΐδη, αποσταγμένη πολύ πρόσφατα, (7.5 mmol) διαλυμένη σε 3 mL ξηρού THF, προστέθηκαν στάγδην. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ελέγχθηκε με TLC, κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (10 mL) προστέθηκε. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2 × 15 mL) και οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις εκπλύθηκαν με

κορεσμένο χλωριούχο νάτριο (Brine) (30 mL), ξηράθηκαν με άνυδρο MgSO_4 και συμπυκνώθηκε στο ρότορα.

Οξείδωση με Jones: 1 mmol από τον αντίστοιχο υδροξυ-εστέρα ή υδροξυκετόνη διαλύθηκε σε 5 mL ακετόνης (absolute). Το μίγμα ψύχθηκε στους 0°C και προστέθηκε σταδιακά αντιδραστήριο Jones (1.08 mmol, 360 μL , διαλυμένο σε 1 mL ακετόνης). Μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου Jones, αφέθηκε να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος της αντίδρασης που ελέγχθηκε με TLC, σταγόνες 2-προπανόλης προστέθηκαν για να εξουδετερωθεί η περίσσεια του αντιδραστήριου Jones. Προστέθηκε νερό και το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με διεθυλο-αιθέρα (2×10 mL). Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο MgSO_4 και συμπυκνώθηκαν στο ρότορα. Για απολύτως καθαρά υποστρώματα, χρειάστηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel και σύστημα διαλυτών εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (v/v 30:1).

Γενική μέθοδος ολεφίνοποίησης Wittig για τη σύνθεση των υποστρωμάτων 6, 7 και 8.⁹⁰

Για τη σύνθεση του σταθεροποιημένου υλιδίου 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, τρι-φαινυλο-φωσφίνη (63.6 mmol, 16.7 g) και 4-χλωρο-3-οξο-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας (70 mmol, 9.46 mL) σε 50 mL τολουόλιο, αναδεύτηκαν για 24 ώρες στους 50°C . Το στερεό προϊόν ξεπλύθηκε με τολουόλιο και προστέθηκε απεσταγμένο νερό έως ότου διαλυθεί το στερεό προϊόν. Το μίγμα εκχυλίστηκε δυο φορές με διαίθυλο-αιθέρα. Κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου προστέθηκε μέχρι το pH να γίνει 8. Το στερεό φιλτραρίστηκε με χωνί Buchner και πλύθηκε δυο φορές με απεσταγμένο νερό και δυο φορές με διαίθυλο-αιθέρα. Για την ξήρασή του τοποθετήθηκε σε αντλία κενού. (15 g, 60%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 3.35 (s, 2H), 3.8 (d, 1H, $J = 24.9$ Hz), 4.2 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 7.5 (m, 15 αρωματικά-H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.2 (2C), 48.3, 48.5, 51.5, 53.0, 60.4 (2C), 126.0 (2C), 127.2 (2C), 128.7 (2C), 128.9 (2C), 132.09 (2C), 132.13 (2C), 133.0 (2C), 133.2 (2C), 170.7 (2C), 183.96, 184.00;

2 mmol 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (780 mg) και 2 mmol αλδεϋδης προστέθηκαν σε ξηρό THF (10 mL) και το μίγμα αφέθηκε σε ήπιο βρασμό (reflux) για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης

ο περισσότερος διαλύτης συμπυκνώθηκε, κατόπιν προστέθηκε εξάνιο (3 mL) για να καταβυθιστούν τα φωσφινόξειδια και το μίγμα φιλτραρίστηκε μέσω πορώδους ηθμού στρωμένου με silica gel. Ο ηθμός ξεπλήθηκε με μίγμα εξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 2/1 (6 mL) και η οργανική φάση συμπυκνώθηκε στο ρότορα. Το crude προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 70/1).

Γενική μέθοδος αναγωγής του καρβονυλίου της ακόρεστης κετόνης 5 και του ακόρεστου κετοεστέρα 6, προς σχηματισμό της ρακεμικής αλλυλικής αλκοόλης 5a και του ρακεμικού υδρόξυ εστέρα 6a.

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου NaBH_4 (0.098 mmol) προστέθηκε σε άνυδρη αιθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0°C . Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην η ακόρεστη καρβόνυλο ένωση (0.3 mmol) διαλυμένη σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους 0°C και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε αργά στους 0°C κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/ EtOAc , v/v, 6/1).

Απόδοση αντίδρασης για την αλλυλική αλκοόλη **5a** 95%

Απόδοση αντίδρασης για τον υδρόξυ εστέρα **6a** 90%

Γενική μέθοδος εστεροποίησης με τρίθορο-οξικό ανυδρίτη $[(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}]$ των υδρόξυ ενώσεων 2a και 2b, 2ai και 2aii και 2bi.

Σε διάλυμα 0.01 mmole υδρόξυ ένωσης σε άνυδρο CH_2Cl_2 στους 0°C προστίθενται 2 ισοδύναμα $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ και καταλυτική ποσότητα DMAP. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και αν δεν ολοκληρωθεί αφήνεται για 24ώρες. Απόδοση εστεροποίησης 95%.

Γενική μέθοδος σύνθεσης των (R)- MPA και (S)- MPA εστέρων.

Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1mmole), σε άνυδρο CH_2Cl_2 , προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmole, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (R) ή (S) MPA (0.11 mmole, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0°C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα

συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1).

Σύνθεση των υποστρωμάτων

3-υδρόξυ πεντ-4-ενοϊκός μεθυλεστέρας

Οξικός μεθυλεστέρας (3mmol, 238μL) και ακρολεΐνη (7.5 mmol, 500μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Το προϊόν δεν χρειάστηκε καθαρισμό και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο βήμα της οξείδωσης. 95%, 370mg; ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 2.57 (m, 2H), 2.89 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.54 (m, 1H), 5.16 (d, J= 10.4Hz, 1H), 5.33 (d, J= 17.2Hz, 1H) και 5.89 (ddd, J= 17.2Hz, J= 10.4Hz, J= 5.5Hz, 1H).

3-οξο-πεντ-4-ενοϊκός μεθυλεστέρας (1)

1mmol (130mg) 3-υδρόξυ πεντ-4-ενοϊκού μεθυλεστέρα, χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο οξείδωσης. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. 95%, 121mg; ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 3.65 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 5.09 (s, 1H), 5.56 (m, 1H), 5.97 (d, J= 10Hz, 1H), 6.11 (dd, J= 4.5Hz, J= 1Hz, 1H), 6.28 (d, 17.4Hz, 1H), 6.42 (dd, J= 10.2Hz, J= 16.5Hz, 1H) και 11.73 (s, 1H).

3-υδρόξυ πεντ-4-ενοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2a)

Οξικός τριτ-βουτυλεστέρας (3mmol, 405μL) και ακρολεΐνη (7.5 mmol, 500μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Το προϊόν δεν χρειάστηκε καθαρισμό και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο βήμα της οξείδωσης. 95%, 490mg; ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.43 (s, 9H, *t*-Bu), 2.43 (m, 2H, CH₂), 3.24 (broad s, 1H, OH), 4.44 (m, 1H, CH(OH)), 5.10 (d, J = 10.5 Hz, 1H, *vinyl-H*), 5.27 (d, J = 17.2 Hz, 1H, *vinyl-H*) και 5.83 (ddd, J₁ = 17.2 Hz, J₂ = 10.5 Hz, J₃ = 5.5 Hz, 1H, *vinyl-H*); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 28.0, 42.1, 69.0, 81.3, 115.0, 138.9 και 171.6;

3-υδρόξυ πεντ-4-ενοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2b)

Οξικός τριτ-βουτυλεστέρας (3mmol, 405μL) και προπανάλη (7.5 mmol, 480μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Το προϊόν δεν χρειάστηκε καθαρισμό και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο βήμα της οξείδωσης. 95%, 490mg; ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 0.95 (t, J= 7.4Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 2.39 (m, 2H) και 3.09 (m, 1H) και 3.87 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 9.8, 28.1 (3C), 29.9, 41.8, 69.4, 81.2 και 172.6.

3-οξο-πεντ-4-ενοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2)

1mmol (172mg) 3-υδρόξυ πεντ-4-ενοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα,

χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο οξείδωσης. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. 95%, 161mg; ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.44 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 3.51 (s, 2H), 4.96 (s, 1H), 5.47 (dd, $J = 6.1$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H), 5.9 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 6.04 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 6.23 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 6.37 (dd, $J = 17.6$ Hz, $J = 11.2$ Hz, 1H) και 11.91 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 27.9, 28.2, 47.8, 81.1, 82.0, 93.4, 121.8, 129.7, 131.4, 135.8, 166.3, 168.1, 172.5 και 193.0;

3-υδρόξυ 2-μεθυλο-πεντ-4-ενοϊκός μεθυλεστέρας

προπιονικός μεθυλεστέρας (3mmol, 288 μL) και ακρολεΐνη (7.5 mmol, 500 μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Το προϊόν δεν χρειάστηκε καθαρισμό και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο βήμα της οξείδωσης. 95%, 410mg;

3-οξο- 2-μεθυλο- πεντανοϊκός μεθυλεστέρας (3)

1mmol (144mg) 3-υδρόξυ 2-μεθυλο-πεντ-4-ενοϊκού μεθυλεστέρα, χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο οξείδωσης. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. 95%, 135mg;

3-υδρόξυ 2-μεθυλο-πεντ-4-ενοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας

προπιονικός τριτ-βουτυλεστέρας (3mmol, 451 μL) και ακρολεΐνη (7.5 mmol, 500 μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Το προϊόν δεν χρειάστηκε καθαρισμό και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο βήμα της οξείδωσης. 95%, 530mg;

3-οξο-2-μεθυλο-πεντανοϊκός μεθυλεστέρας (4)

1mmol (186mg) 3-υδρόξυ 2-μεθυλο-πεντ-4-ενοϊκού μεθυλεστέρα, χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο οξείδωσης. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. 95%, 178mg;

3-οξο-5-φαινυλο-πεντ-4-ενοϊκός αιθυλεστέρας (6).

2 mmol (407 μL) βενζαλδεΐδης χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. 45%, 196 mg; ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.26 (t, 3H κετο- και 3H ενολ- CH_3), 3.70 (s, 2H $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 4.22 (q, 2H κετο- και 2H ενολ- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 5.17 (s, 1H, ενολ- $\text{CH}=\text{CH}$), 6.43 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, ενολ- $\text{CH}=\text{CHC}(\text{OH})=\text{C}$), 6.81 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, κετο- $\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})$), 7.34 (m, 5 αρωματικά- H κετο- και 5 αρωματικά- H για την ενολική μορφή, 1 βινυλικό- H για τη κετο- και 1 βινυλικό- H για την ενολική μορφή) και 12.00 (s, ενολ- OH); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.1, 14.2, 47.6, 60.2, 61.4, 91.9, 121.9, 125.2, 127.5 (2C), 128.5 (2C), 128.8 (2C), 129.0 (2C), 129.3, 130.9, 134.1, 135.3, 136.7, 144.5, 167.3, 169.2, 172.8 και 191.9.

3-οξο-5-(4-ισοπροπυλο-φαινυλο)-πεντ-4-ενοϊκός αιθυλεστέρας (7).

2 mmol (303 μ L) 4-προπυλο-βενζαλδεΐδης χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. 45%, 234 mg; ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.28 (m, 12H), 2.92 (m, 1H), 3.69 (s, 2H), 4.22 (2xq, 4H), 5.15 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 16\text{Hz}$, 1H), 6.81 (d, $J = 16\text{Hz}$, 1H), 7.34 (m, 12H) και 12.00 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.1, 14.3, 23.7, 23.8, 34.0, 34.1, 47.6, 60.1, 61.4, 91.5, 120.9, 124.4, 126.9, 127.1, 127.6, 128.7, 131.7, 133.0, 136.7, 144.7, 150.5, 152.4, 167.4, 169.4, 172.9 και 192.0.

3-οξο-5-(4-φθορο-φαινυλο)-πεντ-4-ενοϊκός αιθυλεστέρας (8).

2 mmol (303 μ L) 4-προπυλο-βενζαλδεΐδης χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. 45%, 234 mg; ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.29 (2xt, 6H), 3.68 (s, 1H), 4.22 (2xq, 4H), 5.15 (s, 1H), 6.35 (d, $J = 15.8\text{Hz}$, 1H), 6.74 (d, $J = 16.1\text{Hz}$, 1H), 7.05-7.59 (m, 12H) και 12.00 (s, 1H);

5, 3-διοξο-επτ-6-ενοϊκός τριτ- βουτυλεστέρας (9)

1 mmol (214mg) 5-υδροξύ 3-οξο-επτ-6-ενοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα, χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο οξείδωσης. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. 95%, 201mg; ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.46 (s, 9H), 2.75 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 4.59 (m, 1H), 5.13 (d, $J = 10.4\text{Hz}$, 1H), 5.28 (d, $J = 17.1\text{Hz}$, 1H), 5.85 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 28.9, 28.2, 49.1, 51.2, 68.4, 82.3, 115.2, 138.7 και 166.0.

5-υδροξύ- 3- οξο-επτ-6-ενοϊκός τριτ- βουτυλεστέρας (10)

ακετοξικός τριτ- βουτυλεστέρας (3mmol, 497 μ L) και ακρολεΐνη (7.5 mmol, 500 μ L) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Προστέθηκαν 6.6 mmol δι-ισοπροπυλαμίνης (924 μ L) και 6.6 mmol BuLi (4mL), γιατί με την γενική μέθοδο η απόδοση ήταν πολύ χαμηλή (περίπου 25%). Αφού προστέθηκε ο εστέρας αφέθηκε για ανάδευση 1hr στους -20°C , μετά ψύχθηκε στους -78°C και προστέθηκε στάγδην η αλδεΐδη. Το προϊόν δεν χρειάστηκε καθαρισμό και χρησιμοποιήθηκε για το επόμενο βήμα της οξείδωσης. 95%, 610mg; ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.45 (s, 9H), 3.32 (s, 2H), 5.64 (s, 2H), 5.68 (d, $J = 10.4\text{ Hz}$, 1H), 6.60 (d, $J = 10.4\text{Hz}$, 1H), 6.15 (d, $J = 10.4\text{Hz}$, 1H) και 6.27 (d, $J = 17.1\text{Hz}$); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 27.9, 48.4, 82.0, 100.3, 126.0, 131.9, 166.6, 175.6 και 194.2.

Αντίδραση Morita-Baylis-Hillman για την σύνθεση του 3-υδροξύ 2-μεθυλενο-πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (12).⁹¹

3 mmol ακρυλικού μεθυλεστέρα, 1.05 ισοδύναμα τριμεθυλαμίνης και 1mmol

προπαναλδεΐδης προστίθενται και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται νερό και το μίγμα θερμαίνεται στους 40 °C. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα, οι συλλεγμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται με άνυδρο θειικό μαγνήσιο. Ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση στο ρότορα. Δεν χρειάζεται καθαρισμός του προϊόντος. Απόδοση 144 mg, 95%. ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 0.95 (t, J= 7.4Hz, 3H), 1.68 (m, 2H), 3.17 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.33 (dd, J= 6.48Hz, J= 6.36Hz, 1H), 5.79 (s, 1H) και 6.23 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 10.0, 29.0, 51.8, 73.1, 76.6, 77.0, 77.4, 125.1, 132.4, 142.1 και 167.0.

Σύνθεση του (E)-4-χλωροβουτ-2-ενοϊκού αιθυλεστέρα (14).

1mmol (135mg) 4-χλωρο-3-οξο-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα και 0.36 mmol (14mg) NaBH₄ χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χημικής αναγωγής. Απομονώθηκαν 100mg (απόδοση 78%) καθαρού 4-χλωρο-3-υδρόξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα. ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.28 (t, 7.2Hz, 3H), 2.63 (m, 2H), 3.1 (m, 1H), 3.60 (m, 2H) και 4.1-4.4 (q+m, 3H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 14.1, 38.4, 48.1, 61.0, 68.0 και 171.9.

1.05 ισοδύναμα NaH 60% (0.82 mmol, 20mg) διαλύθηκαν σε 2 mL άνυδρης μεθανόλης και το μίγμα ψύχθηκε στους 0°C. 130 mg 4-χλωρο-3-υδρόξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα διαλυμένα σε 2 mL ξηρής μεθανόλης προστέθηκαν στάγδην και το μίγμα αναδεύτηκε για μία ώρα. 1.05 ισοδύναμα MeI (0.82mmol, 360μL) στάγδην και το μίγμα αναδεύτηκε άλλες δυο ώρες. Απομονώθηκαν 100mg (82%) του προϊόντος **14a**. ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.29 (t, J= 7.1Hz, 3H), 4.20 (q, J= 7.1Hz, 2H), 4.34 (dd, J= 2.1Hz, J= 2.3Hz, 2H), 6.06-6.13 (m, 1H) και 7.0-7.1 (m, 1H)-; ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 14.2, 60.4, 61.9, 120.2, 146.8 και 166.4.

Σύνθεση του σιναμικού υδρόξυ μεθυλεστέρα.

Οξικός αιθυλεστέρας (3 mmol, 222 mg) και βενζαλδεΐδη (6 mmol, 636 μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο της αλδολικής συμπύκνωσης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 h. Δεν απαιτήθηκε περαιτέρω καθαρισμός. (450mg, 83%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 2.68 (m, 2H, CH₂), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (broad s, 1H, OH), 5.08 (m, 1H, CH(OH)) και 7.28 (m, 5H, αρωματικά-H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 43.4, 51.8, 70.3, 125.7, 127.7, 128.5, 142.9 και 172.5;

Αφυδάτωση του συναμικού υδρόξυ μεθυλεστέρα για τη σύνθεση του υποστρώματος 15.

Σε 0.5 mmol συναμικού μεθυλεστέρα σε EtOH προστίθενται 0.3 ισοδύναμα *para*-τολουοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH). Το μίγμα αφέθηκε σε ανάδευση και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η αντίδραση στις 4 ώρες είχε ολοκληρωθεί. Το μίγμα συμπυκνώθηκε στο ρότορα, προστέθηκε 10% υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου και εκχυλίστηκε με διαιθυλαιθέρα. Η απόδοση ήταν 80% και το προϊόν δεν καθαρίστηκε περαιτέρω.

Προϊόντα των ενζυμικών αναγωγών με τις κετορεδουκτάσες.

Η σύνθεση όλων των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με την ενζυμική αναγωγή των υποστρωμάτων **1 – 10** με κετορεδουκτάσες. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mg υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.5 και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mg κετορεδουκτάσης, 2mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) και 2mg αναγωγικού NADPH. Τα προϊόντα απομονώθηκαν με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και δεν καθαρίστηκαν περαιτέρω.

3-οξο-πεντανοϊκός μεθυλεστέρας (1c)

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.09 (t, $J= 7.2\text{Hz}$, 3H), 2.56 (q, $J= 7.2\text{Hz}$, 2H), 3.45 (s, 2H) και 3.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 7.5, 36.4, 48.7, 52.3, 167.7 και 203.2.

3-οξο-πεντανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2c)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.02 (t, $J= 7.3\text{Hz}$, 2H), 1.41 (s, 9H), 2.50 (q, $J= 7.3\text{Hz}$, 2H) και 3.29 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 7.5, 27.9, 36.1, 50.3, 81.8, 166.5 και 203.8.

(S)-3-υδρόξυ πεντανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2ai)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 2.57 (m, 2H), 2.89 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 4.54 (d, $J= 6\text{Hz}$, 1H), 5.25 (dd, $J= 10.4\text{Hz}$, $J= 7.2\text{Hz}$) και 5.89 ($J= 10.4\text{Hz}$, $J= 5\text{Hz}$, $J= 7.2\text{Hz}$, $J= 6\text{Hz}$, 1H).

(R)-MPA εστέρας του (2ai)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 0.86 (t, $J= 6.5\text{Hz}$, 3H), 1.32 (s, 9H), 1.44 (m, 2H), 2.40 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 4.7 (s, 1H), 5.24 (m, 1H) και 7.34 (m, 4 aromatic-H).

(S)-MPA εστέρας του (2ai)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 0.89 (t, $J= 6.5\text{Hz}$, 3H), 1.4 (s, 9H), 1.5 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 4.7 (s, 1H), 5.18 (m, 1H) και 7.35 (m, 4 aromatic-H).

(R)-3-υδρόξυ πεντ-4-εν-οϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2aii)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.43 (s, 9H, *t*-Bu), 2.43 (m, 2H, CH_2), 3.24

(broad s, 1H, OH), 4.44 (m, 1H, CH(OH)), 5.10 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, *vinyl-H*), 5.27 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H, *vinyl-H*) και 5.83 (ddd, $J_1 = 17.2$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz, $J_3 = 5.5$ Hz, 1H, *vinyl-H*); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 28.0, 42.1, 69.0, 81.3, 115.0, 138.9 και 171.6;

(R)-MPA εστέρας του (2aii)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.42 (s, 9H), 2.56 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 4.7 (s, 1H), 5.03 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 5.53 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.68 (m, 2H) και 7.36 (m, 4 *aromatic-H*).

(S)-MPA εστέρας του (2aii)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.32 (s, 9H), 2.51 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 4.7 (s, 1H), 5.19 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 5.27 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 5.66 (m, 1H), 5.82 (ddd, $J = 17.2$ Hz, $J = 10.5$ Hz, $J = 4$ Hz, 1H) και 7.35 (m, 4 *aromatic-H*).

3-υδρόξυ πεντανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (2bi)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 2.39 (m, 2H) και 3.09 (m, 1H) και 3.87 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 9.8, 28.1 (3C), 29.9, 41.8, 69.4, 81.2 και 172.6.

2-μεθυλο-3-οξο-πεντανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (4c)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.1 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.4 (s, 9H), 2.46 (m, 2H) και 3.43 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H);

4-φαινυλο-βουταν-2-όνη (5c)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 2.14 (s, 3H), 2.76 (dd, $J = 6.93$ Hz, $J = 8.19$ Hz, 2H), 2.90 (dd, $J = 7.47$ Hz, $J = 6.96$ Hz, 2H) και 7.17-7.26 (m, 5 *aromatic-H*).

(R,E)-4-φαινυλο-βουτ-3-ενόλη (5aii)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.38 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 4.50 (m, 1H), 6.26 (dd, $J = 6.3$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H) και 7.32 (m, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 23.4, 68.9, 126.4, 127.6, 128.6, 129.4 και 133.5.

(R)-MPA εστέρας του (5aii)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.29 (d, $J = 6.45\text{Hz}$, 3H), 3.4 (s, 3H), 4.77 (s, 1H), 5.57 (m, 1H), 6.16 (dd, $J = 6.7\text{Hz}$, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H), 6.55 (d, $J = 16.0\text{Hz}$, 1H) και 7.26-7.50 (m, *aromatic-H*).

(S)-MPA εστέρας του (5aii)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.41 (d, $J = 6.5\text{Hz}$, 3H), 3.43 (s, 3H), 4.79 (s, 1H), 5.59 (m, 1H), 6.04 (dd, $J = 6.0\text{Hz}$, $J = 6.0\text{Hz}$, 1H), 6.28 (d, $J = 16\text{Hz}$, 1H) και 7.17-7.53 (m, 10 *aromatic-H*).

3-οξο-5-φαινυλο-πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (6c)

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.1, 29.4, 41.0, 44.5, 49.4, 61.4, 126.2, 128.3, 128.5, 140.5, 167.1 και 201.9.

(R,E)-3-υδροξύ 5-φαινυλο-πεντ-4-ενοϊκός αιθυλεστέρας (6ai)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.28 (t, $J = 7\text{Hz}$, 3H), 2.64 (m, 2H), 4.20 (q, $J = 7\text{Hz}$, 2H), 4.73 (m, 1H), 6.23 (dd, $J = 6\text{Hz}$, $J = 6\text{Hz}$, 1H), 6.67 (d, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H) και 7.31 (m, *aromatic-H*, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.2, 41.5, 60.8, 68.8, 126.5, 127.9, 128.5, 129.9, 130.8, 136.4 και 172.2.

(R)-MPA εστέρας του (6ai)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.26 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 3.42 (s, 3H), 4.20 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 4.75 (s, 1H), 5.89 (m, 1H), 6.02 (dd, $J = 6.45\text{Hz}$, $J = 6.42\text{Hz}$, 1H), 6.31 (d, $J = 16.0\text{Hz}$, 1H) και 7.15-7.49 (m, 10 *aromatic-H*).

(S)-MPA εστέρας του (6ai)

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.12 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 2.66 (m, 2H), 3.9 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 4.77 (s, 1H), 5.86 (m, 1H), 6.15 (dd, $J = 5.6\text{Hz}$, $J = 5.6\text{Hz}$, 1H), 6.62 (d, $J = 15.9\text{Hz}$, 1H) και 7.29-7.45 (m, 10 *aromatic-H*).

(S)-3-υδροξύ 5-φαινυλο-πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (6bii)

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.27 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.75 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 2.48 (m, 2H), 2.69 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.0 (m, 1H), 4.16 (q, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H) και 7.17-7.21 (m, *aromatic-H*, 5H); ^{13}C NMR (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.2, 29.7, 31.8, 41.3, 60.7, 67.2, 125.9, 128.4, 128.5, 141.7 και 173.0.

(R)-MPA εστέρας του (6bii)

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.11 (t, J= 7.2Hz, 3H), 1.95 (m, 2H), 2.51 (m, 4H), 3.42 (s, 3H), 3.87 (q, J= 7.2Hz, 2H), 4.71 (s, 1H), 5.32 (m, 1H) και 7.04-7.45 (m, 10 *aromatic*-H).

(S)-MPA εστέρας του (6bii)

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.22 (t, 7.1Hz, 3H), 1.82 (m, 2H), 1.26 (m, 2H), 2.60 (m, 2H), 3.43 (s, 3H), 4.08 (q, J= 7.1Hz, 2H), 4.77 (s, 1H), 4.86 (m, 2 *aromatic*-H) και 7.1-7.5 (m, 8 *aromatic*-H).

5-(4-φθορο-φαινυλο)-3-οξο-πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (8c)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.26 (t, J= 7.3Hz, 3H), 2.87 (m, 4H), 3.41 (s, 3H), 4.18 (q, J= 7.3Hz, 2H), 4.93 (s, 1H, ενολική), 6.95 (t, J= 8.7, 2 *aromatic*- H) και 7.14 (m, 2 *aromatic*- H).

(R,E)-5-(4-φθορο-φαινυλο)-3-υδροξύ πεντ-4-ενοϊκός αιθυλεστέρας (8ai)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.28 (t, J= 7.2Hz), 2.63 (m, 2H), 3.04 (m, 1H), 4.2 (q, J= 7.2Hz, 2H), 4.7 (m, 1H), 6.14 (dd, J= 6Hz, J= 6Hz, 1H), 6.63 (d, 16Hz, 1H), 7.00 (t, J= 8.6Hz, 2H) και 7.34 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 14.2, 41.4, 60.9, 68.7, 115.4, 115.6, 128.0, 128.1, 129.60, 129.62 και 172.6.

(R)-MPA εστέρας του (8ai)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.09 (t, J= 7.2Hz, 2H), 2.7 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 4.2 (q, J= 7.2Hz, 2H), 4.79 (s, 1H), 5.87 (m, 1H), 5.91 (dd, J= 6.5Hz, J= 6.5Hz, 1H), 6.24 (d, J= 15Hz, 1H), 6.95 (t, J= 8.7Hz, 2 *aromatic*-H), 7.12 (m, 2 *aromatic*-H) και 7.31-7.48 (m, 3 *aromatic*-H).

(S)-MPA εστέρας του (8ai)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.10 (t, J= 7.2Hz, 2H), 2.65 (m, 2H), 3.4 (s, 3H), 3.9 (m, 2H), 4.77 (s, 1H), 5.84 (m, 1H), 6.01 (dd, J= 7.1Hz, J= 7.1Hz, 1H), 6.59 (d, J= 15.9Hz, 1H), 7.0 (t, 8.7Hz, 2 *aromatic*-H) και 7.13-7.51 (m, 7 *aromatic*-H).

(R)-5-(4-φθορο-φαινυλο)-3-υδροξύ πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (8bii)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.27 (t, J= 7.1Hz, 3H), 1.78 (m, 2H), 2.4 (m,

2H), 2.7 (m, 2H), 3.98 (m, 1H), 4.17 (q, J= 7.1Hz, 2H), 6.96 (dd, J= 8.7,Hz, J= 6.6Hz, 2 *aromatic*-H) και 7.15 (m, 2 *aromatic*-H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 14.1, 30.9, 38.1, 41.2, 60.7, 67.0, 115.0, 115.3, 129.7, 129.8 και 173.0.

(R)-MPA εστέρας του (8bii)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.11 (t, J= 7Hz, 3H), 1.92 (m, 2H), 2.48 (m, 4H), 3.28 (s, 3H), 3.91 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 6.93 (t, J= 8.3Hz, 2 *aromatic*-H) και 7.02- 7.45 (m, 7 *aromatic*-H).

(S)-MPA εστέρας του (8bii)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.01 (t, J= 7Hz, 3H), 1.75 (m, 2H), 2.19 (m, 2H), 2.62 (m, 2H), 3.4 (s, 3H), 4.10 (m, 2H), 4.76 (s, 1H), 2.25 (m, 1H), 6.78 (m, 2 *aromatic*-H), 6.90 (dd, J= 2Hz, J= 8.7Hz, 2 *aromatic*-H) και 7.34- 7.49 (m, 5 *aromatic*-H).

3,5-διοξο-επτανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (9c)

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.08 (t, J= 8.4Hz, 3H), 1.15 (t, J= 7.5Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.54 (s, 9H), 2.34 (q, J= 7.5Hz, 2H), 2.55 (q, J= 7.3Hz, 2H), 3.24 (s, 2H), 3.7 (s, 2H) και 5.60 (s, 1H);

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Α΄ ΜΕΡΟΥΣ

- (1) a) Knowles, W. S.; Sabacky, M. J. *Chemical Communications* **1968**, 22, 1445, b) Noyori, R.; Ohkuma, T.; Kitamura, M.; Takaya, H.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; Akutagawa, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5856-5858 c) Enthaler, S.; Junge, K.; Beller, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47: 3317
- (2) Guyt-Sionnest, N., S.; Villain, F.; Bazin, D.; Dexpert, H. *Catalysis Letters* **1991**, 8, 297-304
- (3) Tucker, L., J. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, 10, 315-319
- (4) Sapua C. M.; Deska J. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 1376-1382.
- (5) Pahari P.; Kharel M. K.; Shepherd M.D.; van Lanen S. G.; Rohr J. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1216-1220
- (6) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd Edition, Springer, **1997**.
- (7) Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, 44.
- (8) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Tetrahedron Organic Chemistry Series, Pergamon, London, **1993**.
- (9) Stuermer, R.; Hall, M.; Faber, K. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2007**, 11, 203-213
- (10) Bariotaki, A.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Org. Lett.* **2012**, 14, 1792-1795
- (11) Andrade, L.; Barcellos, T. *Org. Lett.* **2011**, 11, 3052-3055
- (12) Kalaitzakis, D.; Rozell, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4799-4801
- (13) Forrest, G L.; Gonzales, B. *Chem-Biol. Interact.* **2000**, 129, 21.
- (14) a) Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 43-46; b) Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Rozzell J., D.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 10, 2309-2313; c) Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Rozzell, D., J.; Smonou, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2418-2426.
- (15) a) Patel. R. N.; Banerjee, A.; Howell, J., M.; McNamee, C., G.; Brz. Nanduri, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 2069.; b) Patel. R., N.; Banerjee, A.; Ko, R., Y.; Howell J., M.; Li, W., S.; Comezoglu, F., T. *Biotech. Appl. Biochem.* **1994**, 20 (1), 23-33.
- (16) a) Barrish, J., C.; Gordon, E.; Alam, M.; Lin, P., F.; Bisacchi, G., S.; Cheng, P., T. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1758; Patel R., N.; Banerjee, A.; McNamee, C.; Brzozowski, D. ; Szarka, L., J.; b) Patel, R., N.; Banerjee, A.; McNamee C., G.; Brzozowski, D., B.; Szarka, L/ J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 2547.
- (17) a) Hanson, R., L.; Bembenek, K., S.; Patel, R., N.; Szarka, L. *J. Appl. Microb. Biotechnol.* **1992**, 37, 599; b) Patel, R. N.; Robinson, R., S.; Szarka, L., J.; Kloss, J.; Thottathil, J., K.; Mueller, R., H. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, 13, 906; c) Patel, R.,

- N.; Banerjee, A.; McNamee, C., G.; Brzozowski, D.; Hanson, R., L.; Szarka, L., J. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1014; d) Patel, R., N.; Banerjee, A.; Chu, L.; Brzozowski, D.; Nanduri, V.; Szarka, L., J. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1473.
- (18) Patel, R. N.; McNamee, C., G.; Banerjee, A.; Howell, J., M.; Robinson, R., S.; Szarka, L. *J. Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 731.
- (19) Bradshaw, C., W.; Fu, H.; Shen, G., J.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526.
- (20) Bradshaw, C., W.; Hummel, W.; Wong, C., H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532.
- (21) Nakamura, K.; Yoneda, T.; Miyai, T.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2453
- (22) Jones, J., B. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351.
- (23) Velonia, K.; Tsigos, I.; Bouriotis, V.; Smonou, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 65.
- (24) Wong, C., H.; Whitesides, G., M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890.
- (25) Oppenheimer, N., J.; Kaplan, N., O. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4675.
- (26) Shaked, Z.; Whitesides, G., M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104.
- (27) Lamed, R.; Keinan, E.; Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144.
- (28) Wong, C., H.; Drueckhammer, D., G.; Sweers, H., M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028.
- (29) Bernard, J.; van Heerdem, E.; Arends, I., W., C., E.; Opperman, J.; Hollman F. *Chem. Cat. Chem.* **2012**, *4*, 196-199.
- (30) Dale, J., A.; Mosher, H., S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.
- (31) Trost, B., M.; Belletire, J., L.; Godleski, S.; Mcdougal, P., G.; Balkovec, J., M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370.
- (32) a) Seco, J., M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17; b) Latypov, Sh. K.; Seco, J., M.; Quinoa, E.; Riguera R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8569-8577; c) Latypov, Sh., K.; Seco, J., M.; Quinoa, E.; Riguera R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 877-882.
- (33) a) Jeulin, S.; Ayad, T.; Ratovelomanana-Vidal, V.; Genet, J.-P. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1592-1596; b) Hekking, K., F., W.; Lefort, L.; de Vries, A., H., M.; van Delft, F., L.; Schoemaker, H., E.; de Vries, J., G.; Rutjes, J., T. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 85-94
- (34) Wang, Duo-Sheng; Wang, Da-Wei; Zhou, Yong-Gui *Synlett.* **2011**, *7*, 947-950.
- (35) a) Felpin, F.-X.; Fouquet E. *Chem. Eur. J.*, **2010**, 12440-12445; b) Brunel, J., M.; *Synlett* **2007**, *2*, 330-332; c) Ikawa, T.; Sajiki, H.; Hirota, K. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 2217-2231; d) Schotten, T.; Janowski, F.; Schmidt, A.; Hinrichsen, K.; Ammenn, J.;

- Synthesis* **2003**, 2023-2026; d) Graham, T., J., A.; Poole, T., H.; Reese, C., N.; Goess, B., C. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 4132-4138; e) Imada, Y.; Kitagawa, T.; Ohno, T.; Iida, H.; Naota, T. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 32-35; f) Nakao, R.; Rhee, H.; Uozumi, Y. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 163-165; g) Soltani, O.; Ariger, M., A.; Carreira, E., M. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 4196-4198; h) Li, G.; Antilla, J., C. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 1075-1078.
- (36) a) Martin, N.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13368-13369; b) Ouellet, S.; Tuttle, J.; MacMillan, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *7*, 32-33; c) Lipshutz, B.; Servesko, J.; Taft, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8352-8353; d) Lipshutz, B.; Servesko, J.; Petersen, T.; Papa, P.; Lover, A. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1273-1275; e) Li, S.; Zhu, S.-F.; Zhang, C.-M.; Song, S.; Zhou, Q.-L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 8584-8585; f) Cheng, X.; Zhang, Q.; Xie, J.-H.; Wang, L.-X.; Zhou, Q.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 1118-112; g) Lee, D.; Kim, D.; Yun, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2785-2787; h) Lee, D.; Yang, Y.; Yun, J. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 2749-2751; i) Martin, N.; Ozores, L.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8976-8977; j) Chae, J.; Yun, J.; Buchwald, L. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4809-4812.
- (37) Milagre, D., F., C.; Milagre, M., S., H.; Moran, J., S., P.; Rodrigues, R., J., A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1410
- (38) Oberdorfer, G.; Gruber, K.; Faber, K.; Hall, M. *Synlett.* **2012**, *23*, 1857-1864
- (39) Brenna, E.; Gatti, F.; Monti, D.; Parmeggiani, F.; Serra, S. *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, *354*, 105-112.
- (40) Fryszkowska, A.; Toogood, H.; Sakuma, M.; Gardiner, J.; Stephens, G.; Scrutton, N. *Adv. Synth. Catal.*, **2009**, *351*, 2976-2990
- (41) Dicosimo, R.; Mactuliffe, J.; Poulouse, A.; Bohlman, G. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *in press*
- (42) Struemer, R.; Hauer, B.; Hall, M.; Faber, K. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**, *11*, 203-213
- (43) a) Silva, V.; Stambuk, B.; Nascimento, M. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2010**, *63*, 157-163; b) Goretti, M.; Ponzoni, C.; Caselli, E.; Marchigiani, E.; Cramarossa, M.; Turchetti, B.; Buzzini, P.; Forti, L. *Enz. Mic. Tech.* **2009**, *15*, 463-468; c) Hall, M.; Hauer, B.; Stuermer, R.; Kroutil, W.; Faber, K. *Tetrahedron Asymmetry*, **2006**, *17*, 3058-3062; d) Muller, A.; Hauer, B.; Rosche, B. *Journal Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2008**, *38*, 126-130
- (44) a) Tang, Y.; Suga, T. *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 2599-2603; b) Winkler, C.; Stueckler, C.; Mueller, N.; Pressnitz, D.; Faber, K. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 6354-6358; c) Kurata,

- A.; Fujita, M.; Mowafy, A.; Kamachi, H.; Kurichara, T.; Esaki, N. *J. Biosc. Bioeng.* **2008**, *105*, 429-431; d) Yanto, Y.; Yu, H.-H.; Hall, M.; Bommarius, A. *Chem. Comm.*, **2010**, *46*, 8809-8811; e) Tauber, K.; Hall, M.; Kroutil, W.; Fabian, W.; Faber, K.; Glueck, S. *Biotech. and Bioeng.*, **2011**, *108*, 1462-1467
- (45) Chaparro-Riggers, J.; Rogers, T.; Vasquez-Figeroa, E.; Polizzi, K.; Bommarius, A. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1521-1531
- (46) a) Haseltine, L., E.; Arnold, A., F. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 1-19; b) May, O.; Nguyen, T., P.; Arnold, H., F. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 317; c) May, O.; Voigt, A., C.; Arnold, H., F. *Enzymes in Organic Synthesis* 2003, *1*, 95
- (47) Bougioukou, D.; Kille, S.; Taglieger, A.; Reetz, M. *Adv. Synth. Catal.*, **2009**, *351*, 3287-3305
- (48) a) Hughes, H. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1991**, 617-623; b) Weinhold, E.; Benner, S.; *Prot. Eng.*, **1995**, *8*, 457-461
- (49) Hall, M.; Stueckler, C.; Kroutil, W.; Macheroux, P.; Faber, K. *Synfacts*, **2007**, *7*, 757
- (50) Yanto, Y.; Winkler, C.; Lohr, S.; Hall, M.; Faber, K.; Bommarius, A. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 2540-2543
- (51) Kitamura, S.; Katsura, H.; Tatsumi, K. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1993**, *30*, 839-847
- (52) Pietruszka, J.; Schölzel, M. *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, *354*, 751-756
- (53) Winkler, C.; Clay, D.; Davies, S.; O'Neil, P.; Debarge, S.; Steflik, J.; Karmilowicz, M.; Wong, J.; Faber, K. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 1525-1533
- (54) Korpak, M.; Pietruszka, J. *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, *353*, 9, 1420-1424
- (55) Brenna, E.; Gatti, F.; Monti, D.; Parmeggiani, F.; Sacchetti, A. *Chem. Cat. Chem.*, **2012**, *4*(5), 653-659
- (56) Stueckler, C.; Reiter, T.; Baudendistel, N.; Faber, K. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 663-667
- (57) a) Bernard, J.; van Heerden, E.; Opperman, D.; Hollman, F. *Chem. Cat. Chem.*, **2012**, *4*(2), 196-199; b) Katsuki, T.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974; c) Hill, J. G.; Sharpless, K. B.; Exon, C. M.; Regenye, R. *Org. Syn.*, **1990** Coll. Vol. 7, 461; **1985** *63*, 66
- (58) a) Yang, Y.; Zhu, S.-F.; Zhou, C.-Y.; Zhou, Q.-L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14052-14053; b) Birabar, D.; Gau, H.-M. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 499-502; c) Aikawa, K.; Hioki, Y.; Mikami, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 13922-13923; d) He, P.; Liu, X.; Zheng, H.; Li, W.; Lin, L.; Feng, X. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5134-5137; e) Kyne, R.; Ryan, M.; Kliman, L., Morken, J. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 3796-3799; f) Jiang, H.-Y.; Sun, B.; Zheng, X.-X.; Chen, H. *Applied Catalysis A: General*, **2012**, *421-422*, 86-90

- (59) a) Bellemin-Laponnaz, S.; Tweddell, J.; Ruble, C.; Breitling, F.; Fu, G. *Chem. Commun.*, **2000**, 1009-1010; b) <http://www.pnas.org/content/early/2010/06/16/0914523107.full.pdf>; c) Keith, J.; Larrow, J.; Jacobsen, E. *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, *343*, 5-26; d) Ebner, D.; Bagdanoff, J.; Ferreira, E.; McFadden, R.; Caspi, D.; Trend, R.; Stoltz, B. *Chemistry*, **2009**, *15*, 12978–12992; e) Gayet, A.; Bertilsson, S.; Andersson, P. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3777–3779; f) Tiecco, M.; Testaferri, L.; Santi, C.; Tomassini, C.; Bonini, R.; Marini, F.; Bagnoli; Temperini A. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4751–4753; g) Vedejs, E.; MacKay, J. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 535–536
- (60) a) Lee, D.; Huh, E.; Kim, M.-J.; Jung, H.; Koh, J.; Park, J. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2377–2379; b) Bogar, K.; Vidal, P.; Leon, A.; Backvall, J.-E. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3401–3404; c) Chen, P.; Xiang, P. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 5758-5760
- (61) Fischer, T.; Pietruszka, J. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1533 – 1536
- (62) Fischer, T.; Pietruszka, J. *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, *354*, 2521 – 2530
- (63) a) Matsuda, M.; Endo, Y.; Fushiya, S.; Endo, T. Nozoe, S. *Heterocycles*, **1994**, *38*, 1229–1232; b) Waechter, A.; Ferreira, M.; Fournet, A.; de Arias, A.; Nakayama, H.; Torres, S.; Hocquemiller, R.; Cave, A. *Planta Med.*, **1997**, *63*, 433–435; c) Carmona, D.; Saez, J.; Granados, H.; Perez, E.; Blair, S.; Angulo, A.; Figadere, B. *Nat. Prod. Res.*, **2003**, *17*, 275–280
- (64) a) Kobayashi, M.; Higuchi, K.; Murakami, N.; Tajima, H.; Aoki, S. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2859–2862; b) Murakami, N.; Wang, W.; Aoki, M.; Tsutsui, Y.; Higuchi, K.; Aoki, S.; Kobayashi, M. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 5533–5536; c) Pereda-Miranda, R.; Fragosó-Serrano, M.; Cerda-Crcia-Rojas, C. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 47–53
- (65) Hokanson, G.; French, J. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 462–466; b) Scheithauer, W.; von Hoff, D.; Clark, G.; Shillis, J.; Elslager, E. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **1986**, *22*, 921–926; c) Fry, D.; Boritzki, J.; Jackson, R. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1984**, *13*, 171–175; d) Wilbur, L.; Shillis, J.; Mertus, A.; Nelson, J.; Roberts; Jackson, R.; *Cancer Res.*, **1984**, *44*, 1928–1932
- (66) a) Ali, A.; McKeen, M.; Hamid, M.; Aun, Q.; Zauyah, Y.; Azimahtol, L.; Kawazu, K. *Planta Med.*, **1997**, *63*, 81–83; b) Inayat-Hussain, S.; Osman, A.; Din, L.; Ali, A.; Snowden, R.; MacFarlane, M.; Cain, K. *FEBS Lett.*, **1999**, *456*, 379–383
- (67) Tang, S.; Xie, X.; Wang, X.; He, L.; Xu, K.; She, X. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 8234–8240
- (68) Das, B.; Nagendra, S.; Reddy, C. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, *22*, 1249–1254

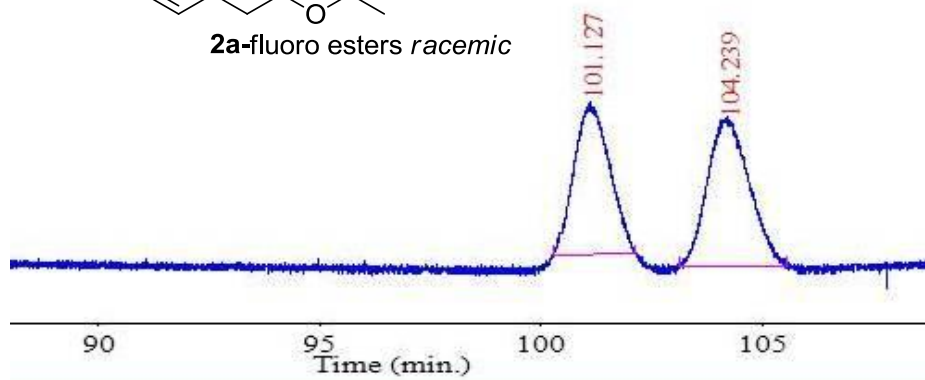
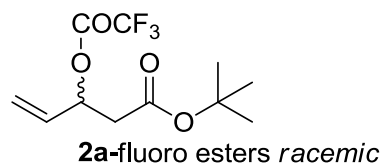
- (69) Kajinami, K.; Takekoshi, N.; Saito, Y. *Cardiovasc. Drug. Rev.*, **2003**, *21*, 199-215
- (70) Teramoto, T.; Shimano, H.; Yokote, K.; Urashima, M. *J Atheroscler Thromb.*, **2009**, *16*, 654-61
- (71) Cai, Z.; Zhou, W.; Sun, L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, *15*, 7809-7829
- (72) Werness, J.; Tang, W. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 3664-3666
- (73) Gebauer, J.; Arseniyadis, S.; Cossy, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3425-3427
- (74) Winkler, J.; Uddin, J.; Serhan, C.; Petasis, N. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 1424-1427
- (75) Kawai, N.; Hande, S.; Uenishi, J. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 9049-9056
- (76) BouzBouz, S.; Cossy, J. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 3469-3472
- (77) Feldman, S.; Matheson, R.; Bruce, S. *American Journal of Clinical Dermatology*, **2012**, *13*, 422
- (78) Diness, F.; Nielsen, D.; Fairle, D. *J. Org. Chem*, **2011**, *76*, 9845-9851
- (79) a) Mulzer, J.; Mantoulidis, A.; Elisabeth, O. *J. Org. Chem.* **2000**, *75*, 7458-7460; b) Ramon, R.; Gaillard, S.; Salwin, M.; Porta, A.; D'Alfonso; Zanoni, G.; Nolan, S. *Organometallics*, **2010**, *29*, 3665-3668
- (80) Kallergi, M.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *20-21*, 3946-3950
- (81) Codexis Inc. Pasadena CA, USA
- (82) Wong, C., H.; Drucekhammer, D., G.; Sweers, H., M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028
- (83) Kalaitzakis, D.; Smonou, I., *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3919-3921
- (84) Kalaitzakis, D.; Rozell, J.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4799-4801
- (85) Jung, S.; Lauchli, R.; Arnold, F. *Curr. Op. Biotech.* **2011**, *22*, 809-817
- (86) a) Jin, Y. *Chem. Biol. Inter.* **2011**, *191*, 234-238; b) Chen, M.; Drury, J., E.; Christianson, D., W.; Penning, T., M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 16609-22
- (87) Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9431-9439
- (88) a) Shimoda, K.; Izumi, S.; Hirata, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 355-358; b) Iqbal, N.; Rudroff, F.; Brige, A.; van Beeumen, J.; Mihovilovic, M. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 7619-7623
- (89) Blanchard, J., S. *Methods in Enzymol.*, **1984**, *104*, 404

- (90) (a) Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Chem. Ber.*, **1954**, *87*, 1318-1330; (b) Wittig, G.; Haag, W., *Chem. Ber.*, **1955**, *88*, 1654-1666.
- (91) Caumul, P.; Hailes H., C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8125–8127

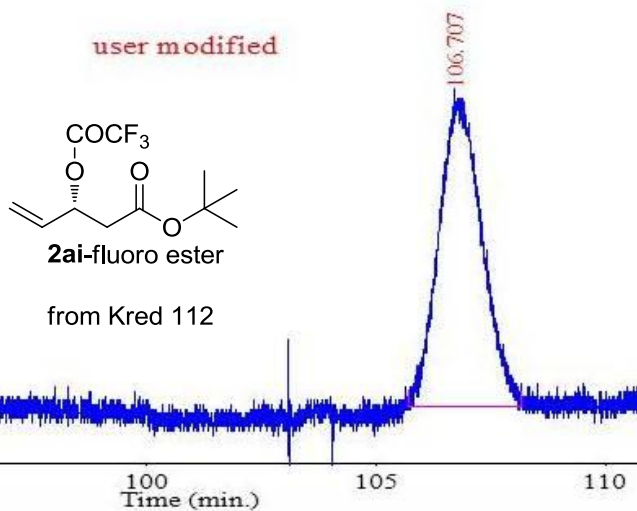
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄ ΜΕΡΟΥΣ

ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H ΚΑΙ ^{13}C NMR

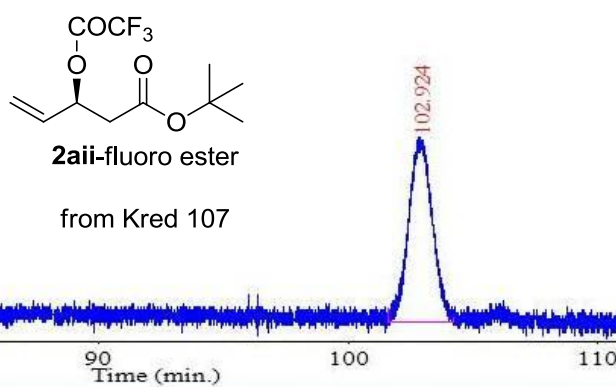
GC ΚΑΙ HPLC ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ



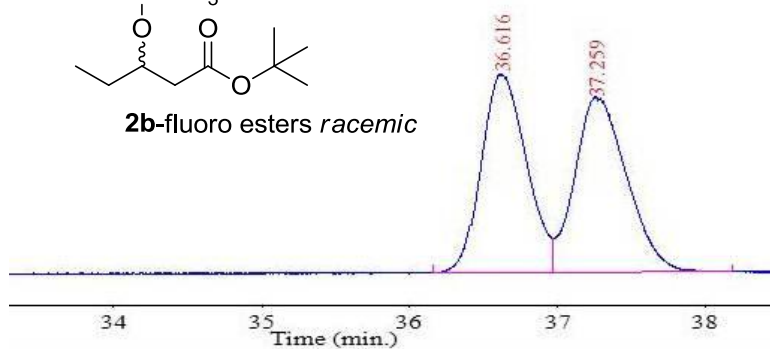
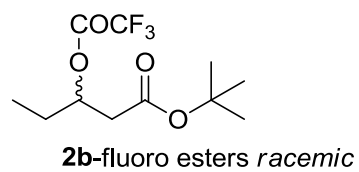
GC 1



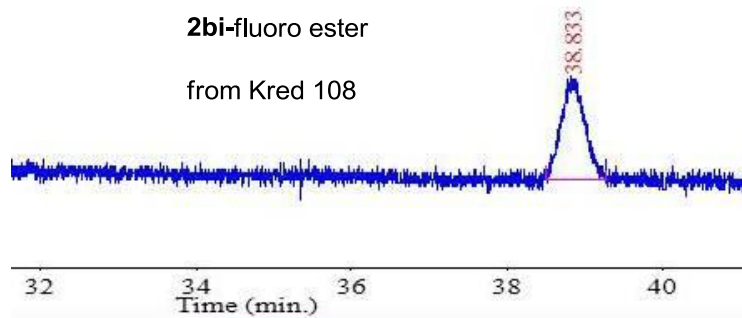
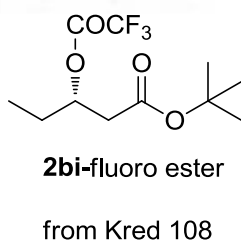
GC 2



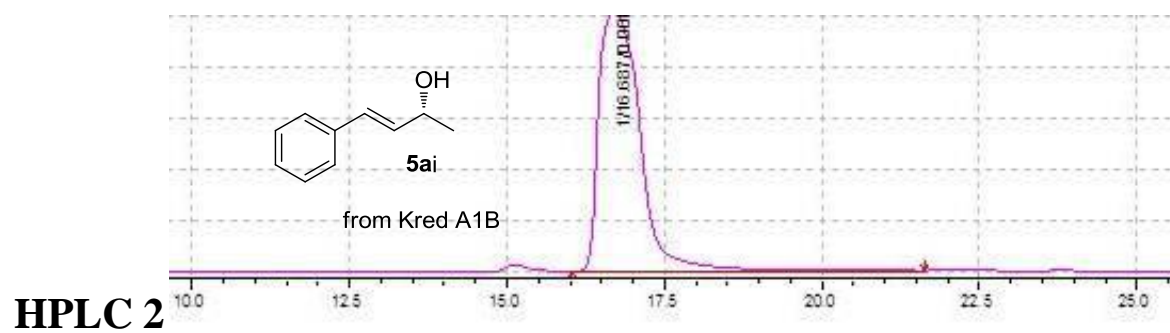
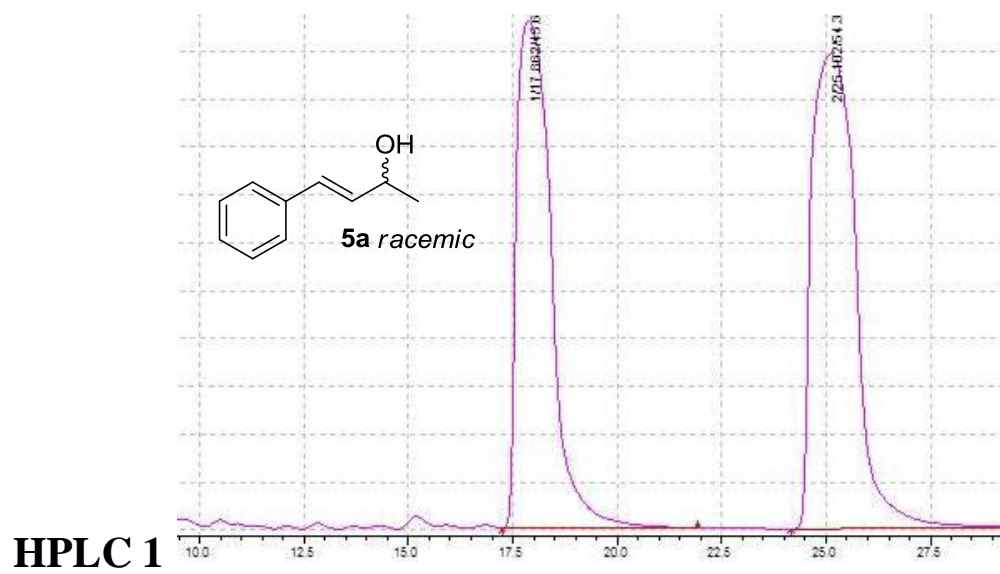
GC 3

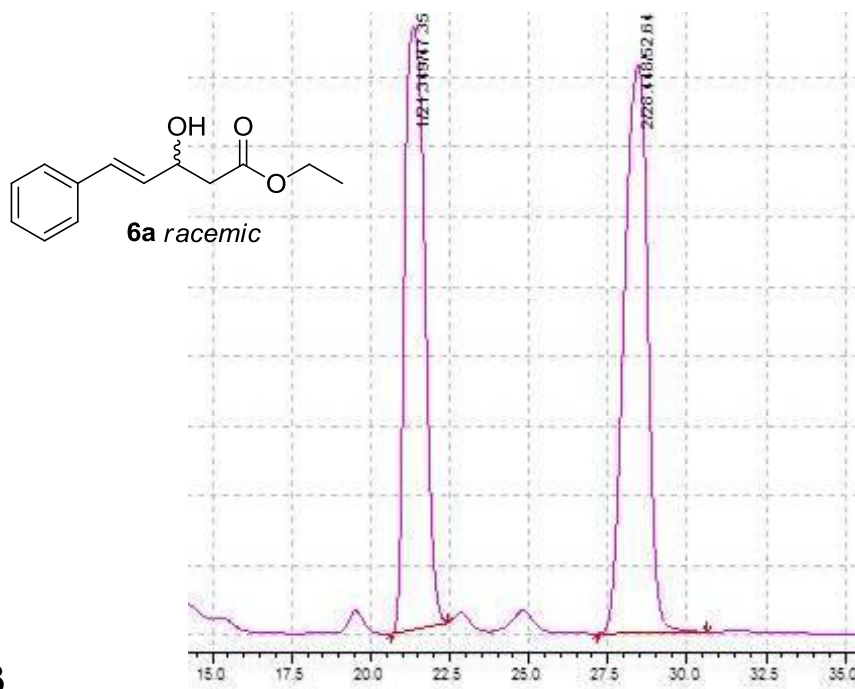


GC 4

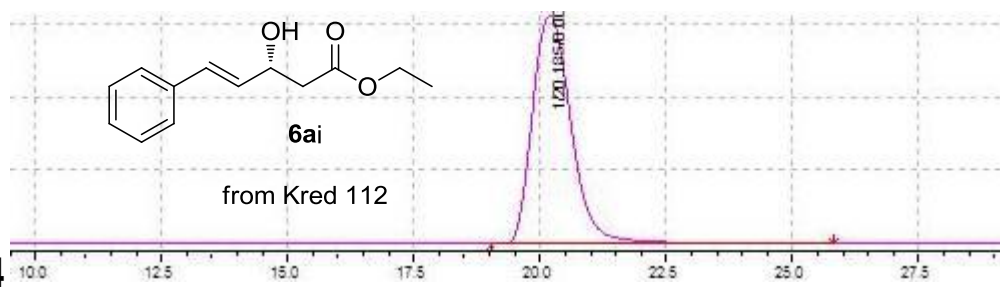


GC 5

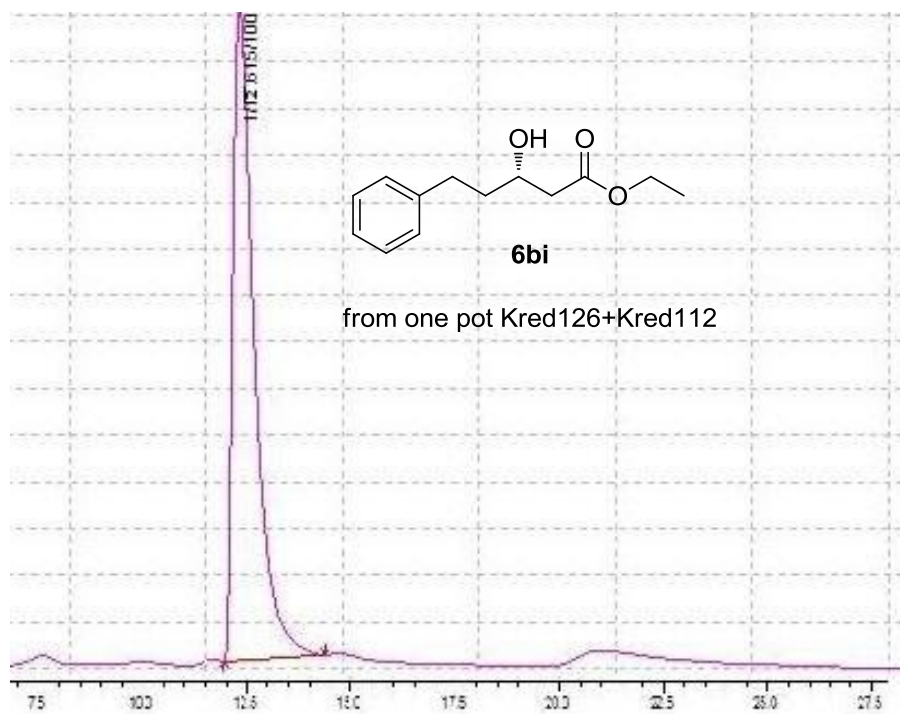




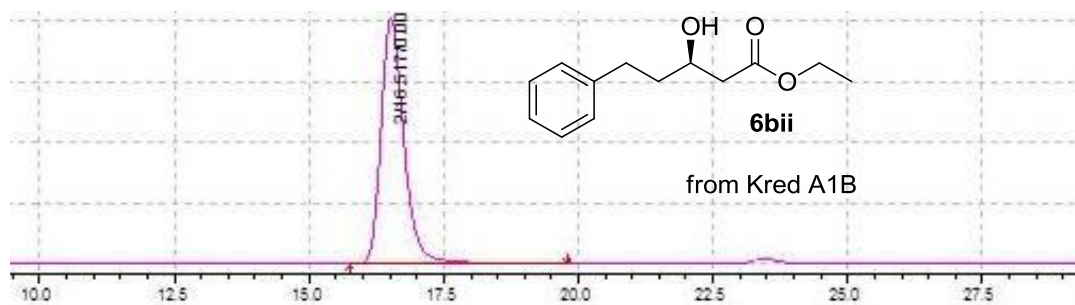
HPLC 3



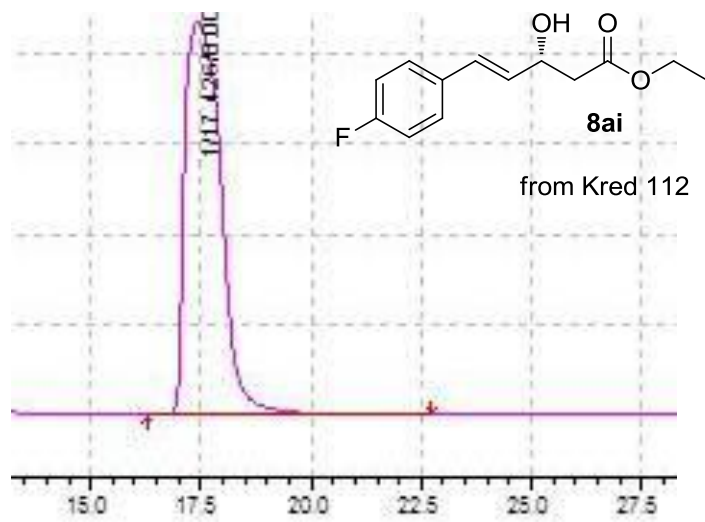
HPLC 4



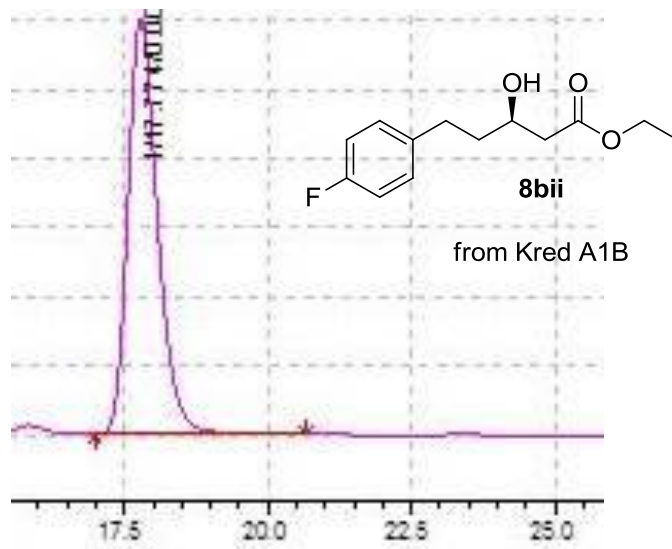
HPLC 5



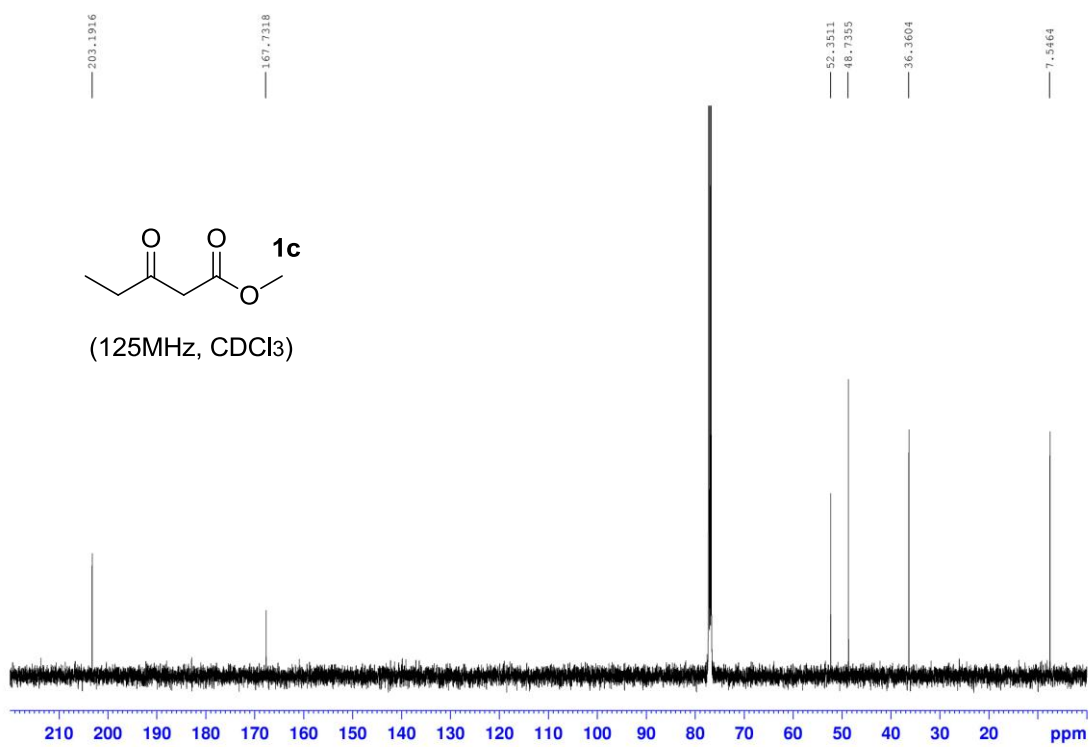
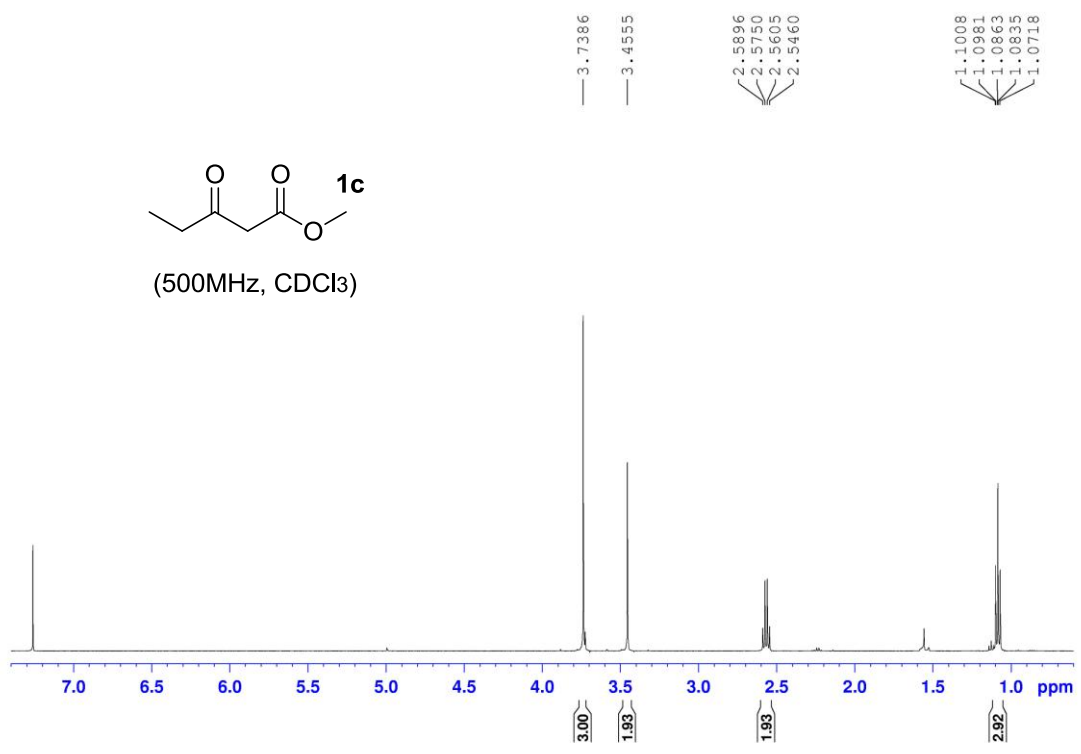
HPLC 6

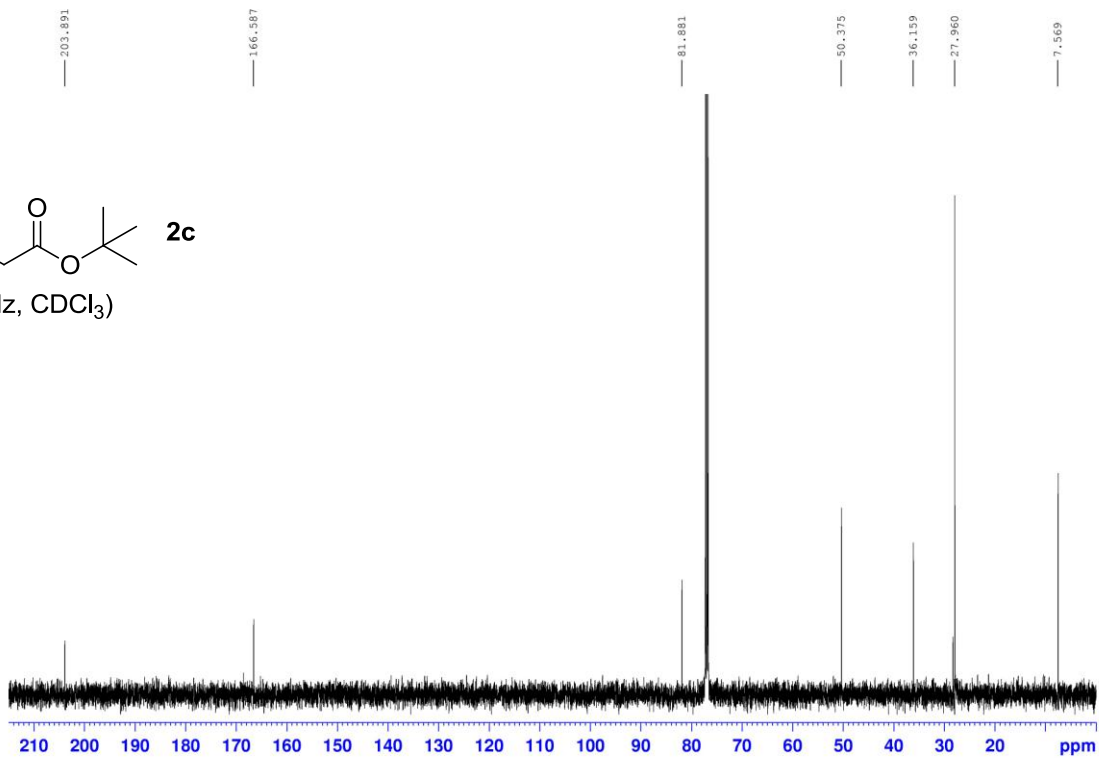
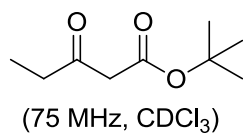
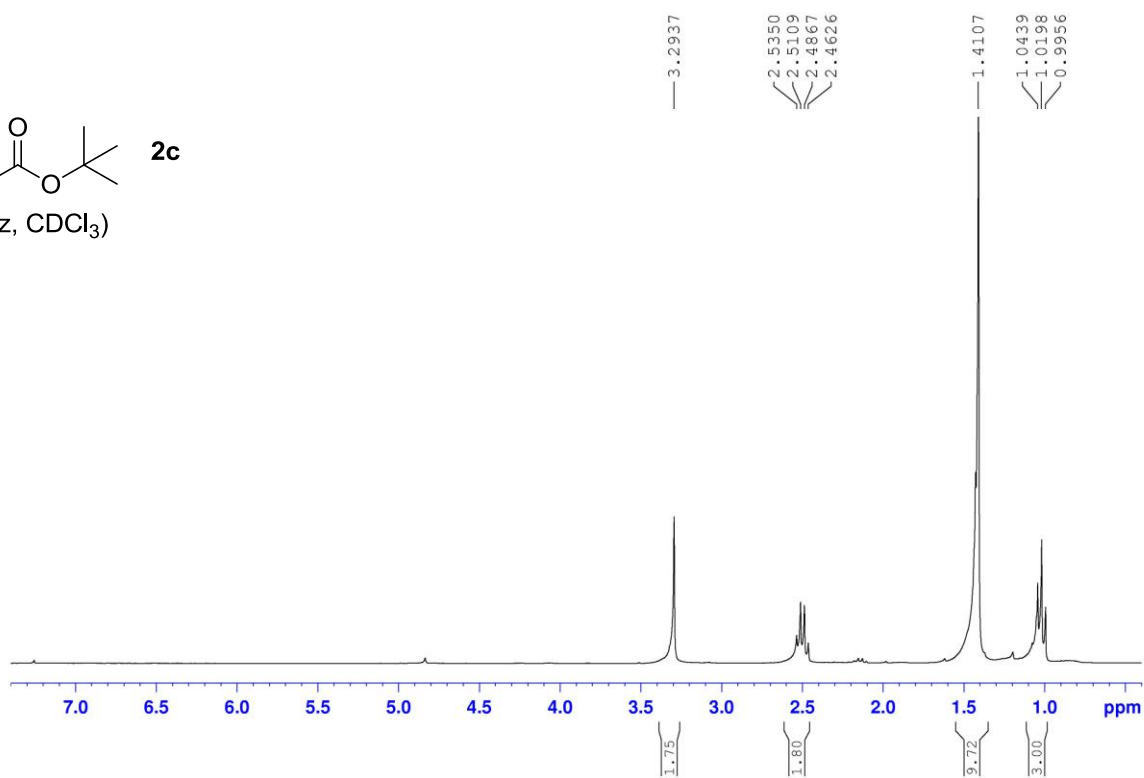
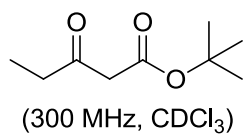


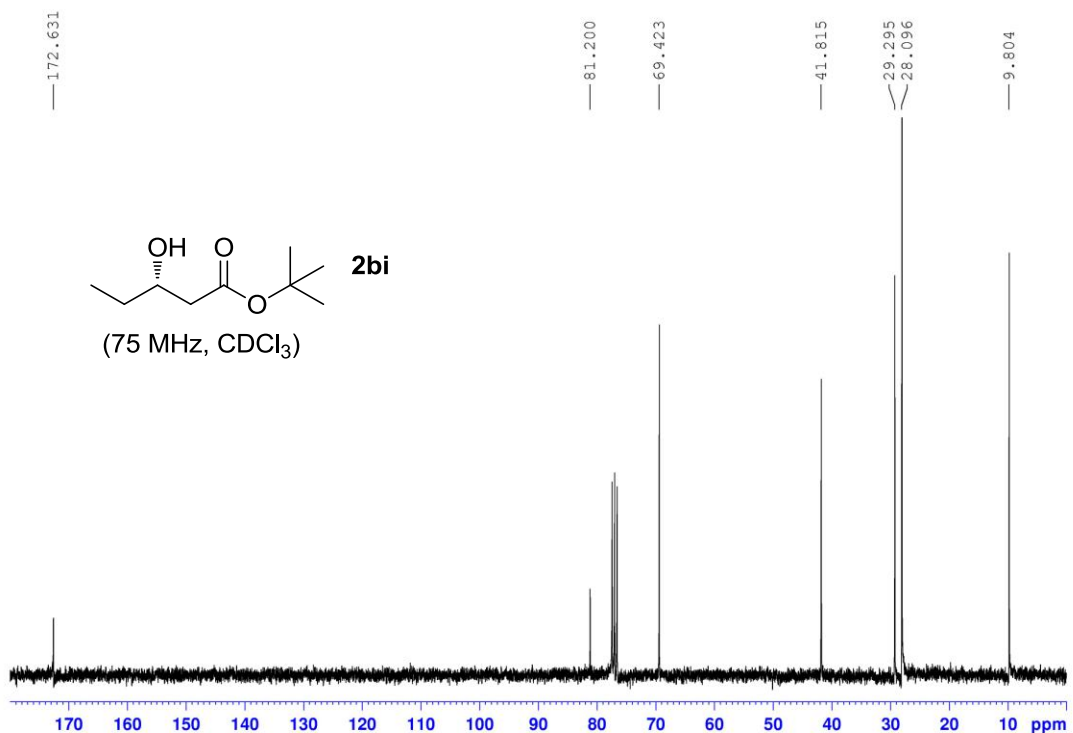
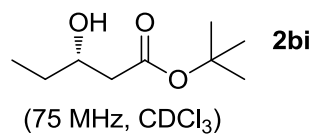
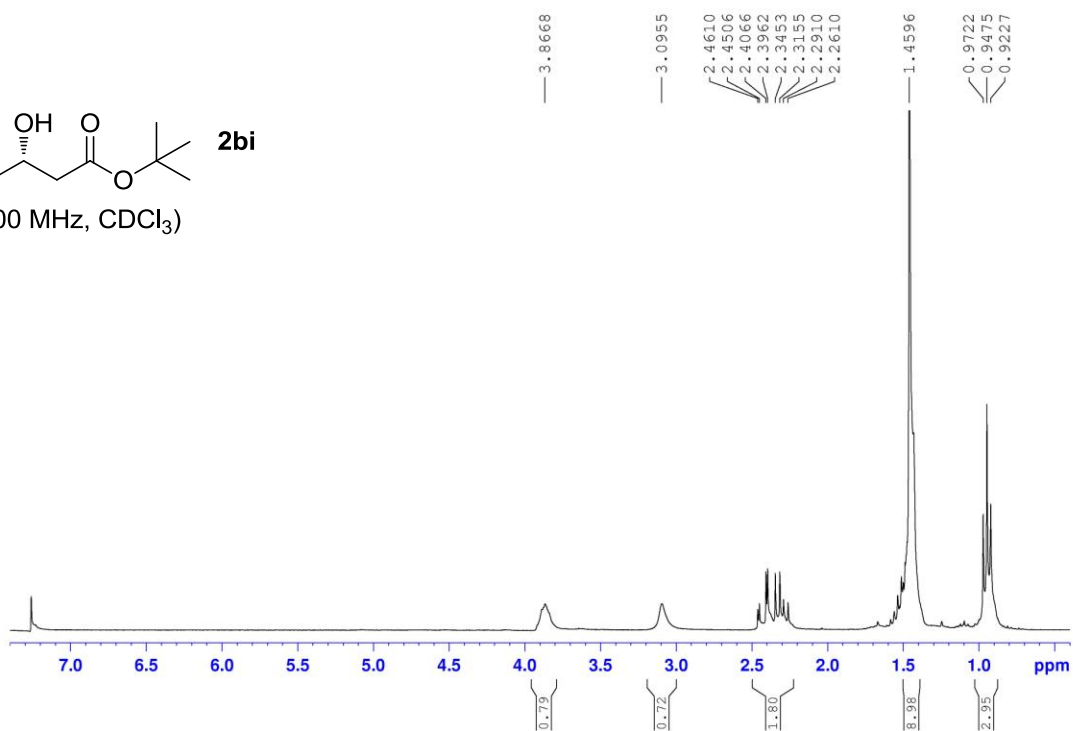
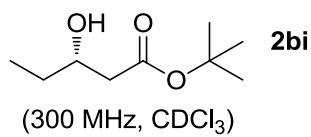
HPLC 7

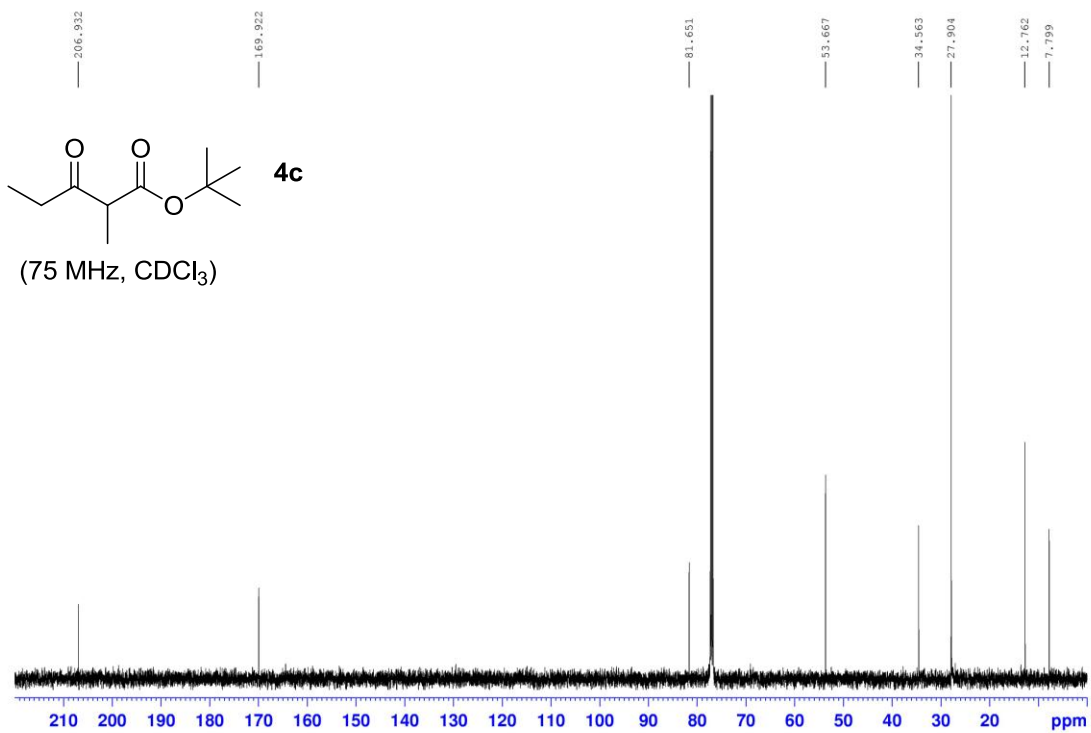
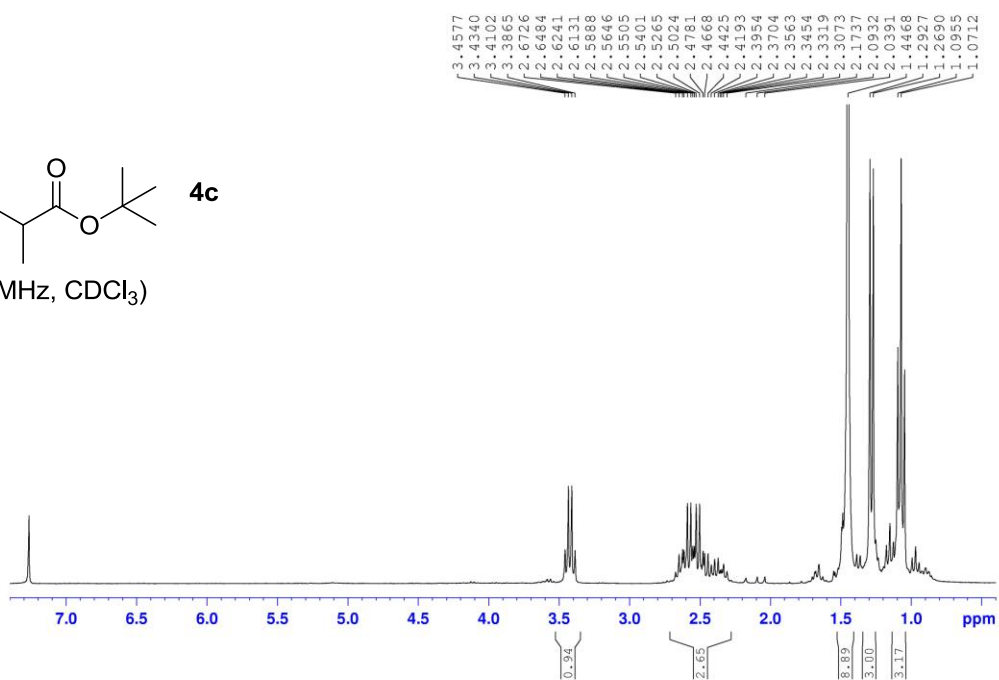
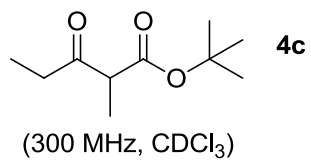


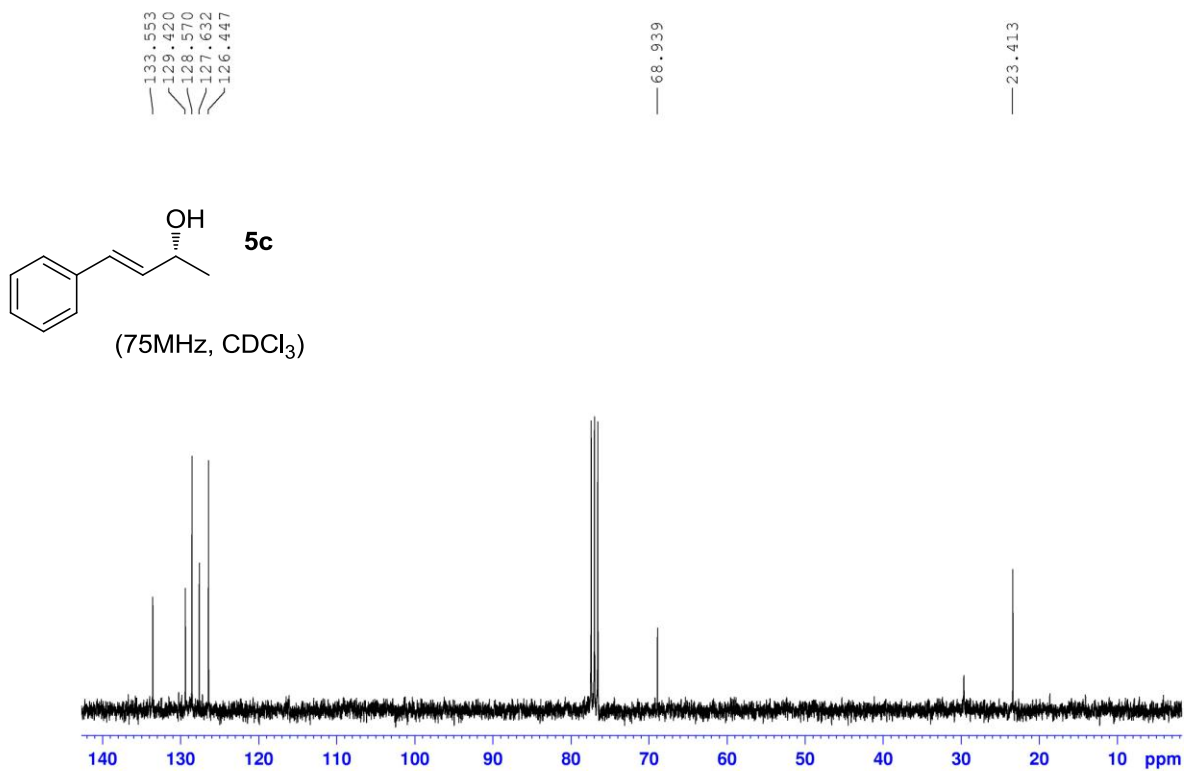
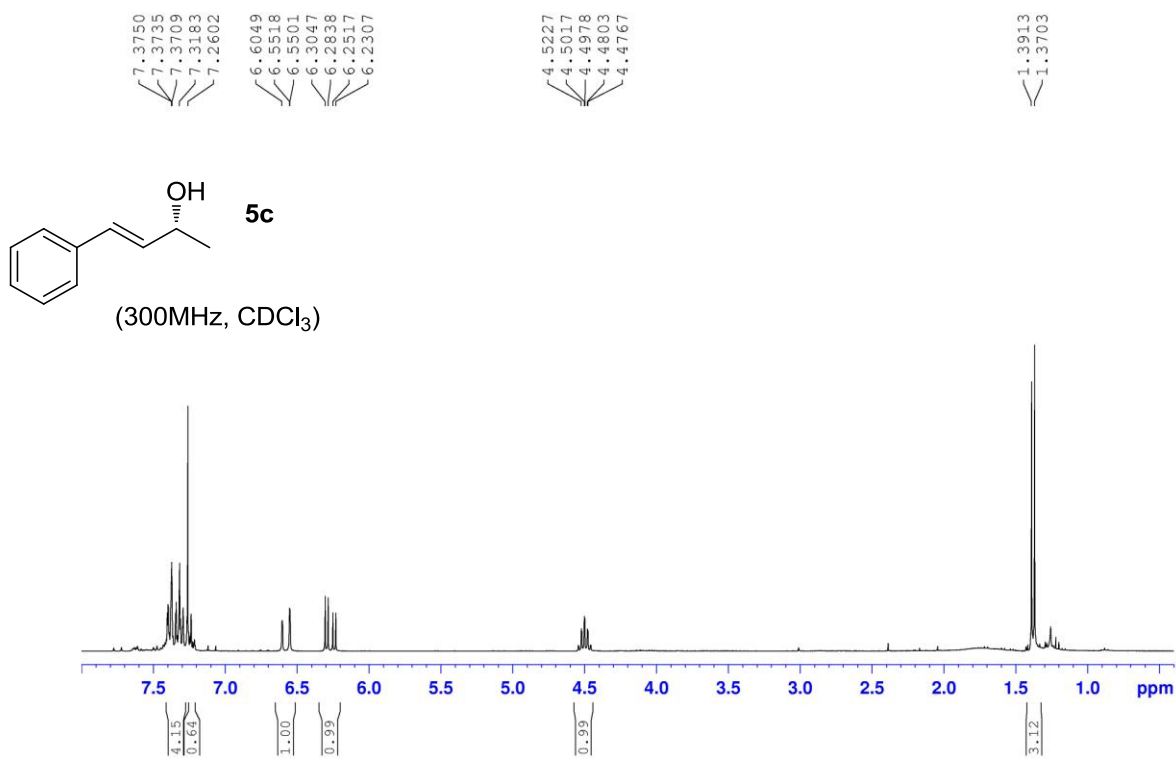
HPLC 8

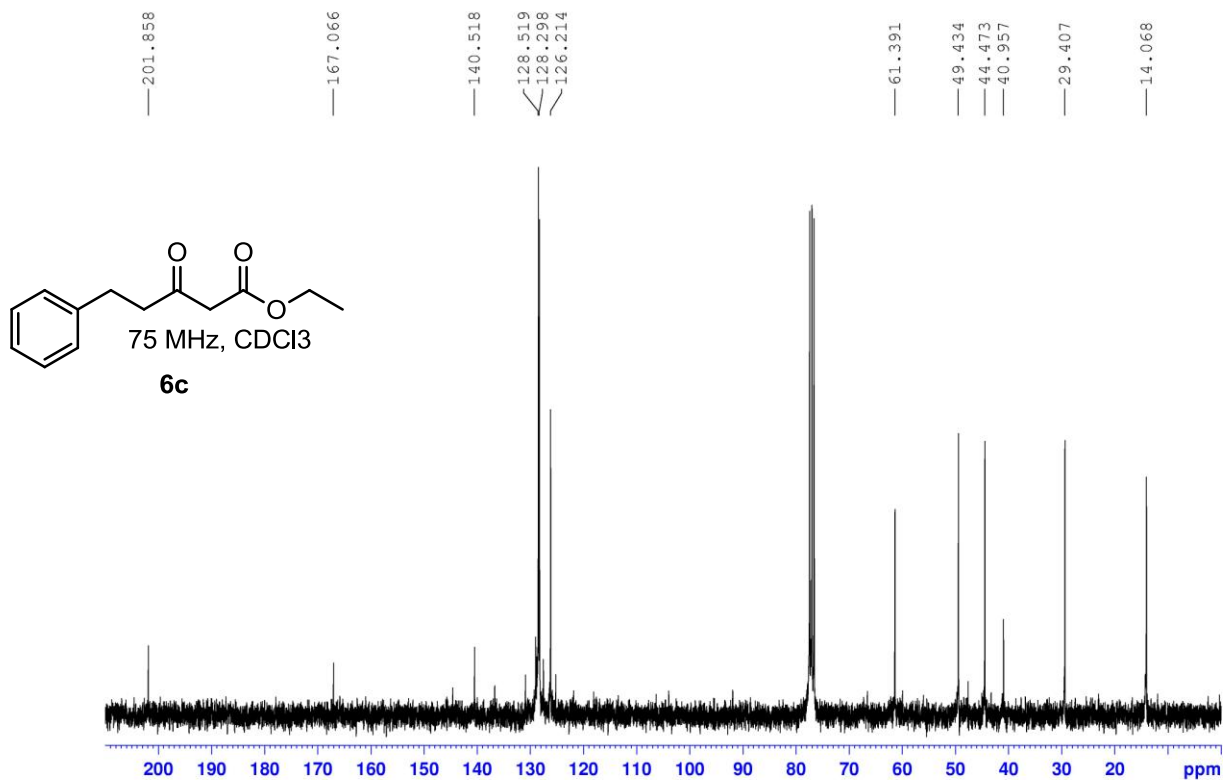
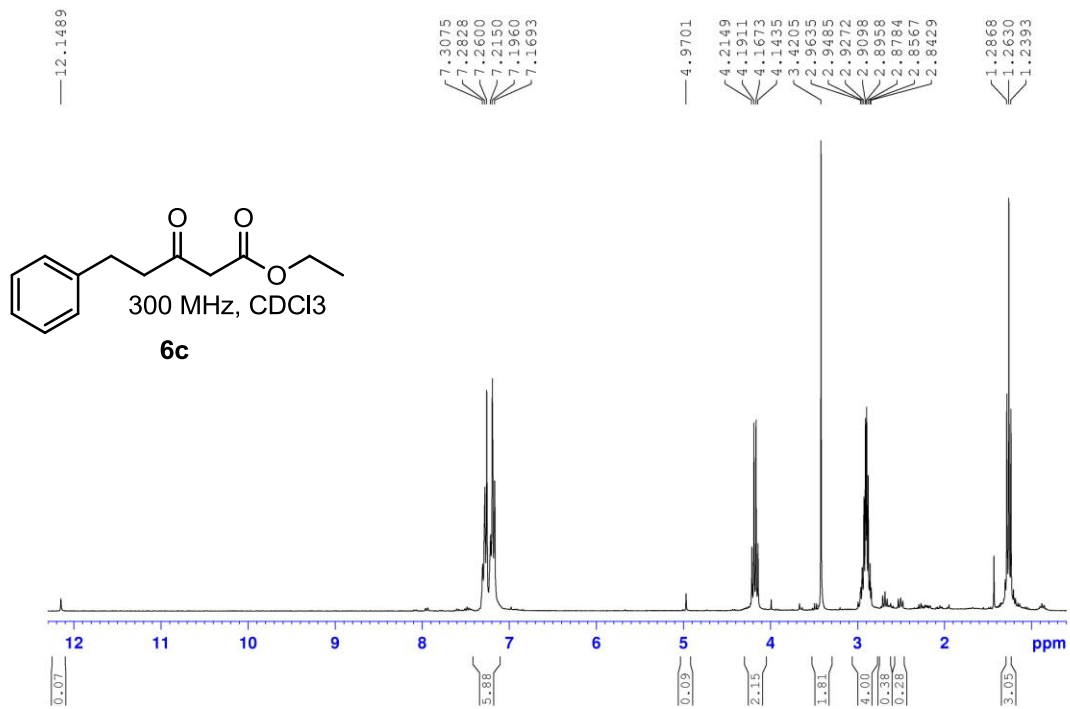


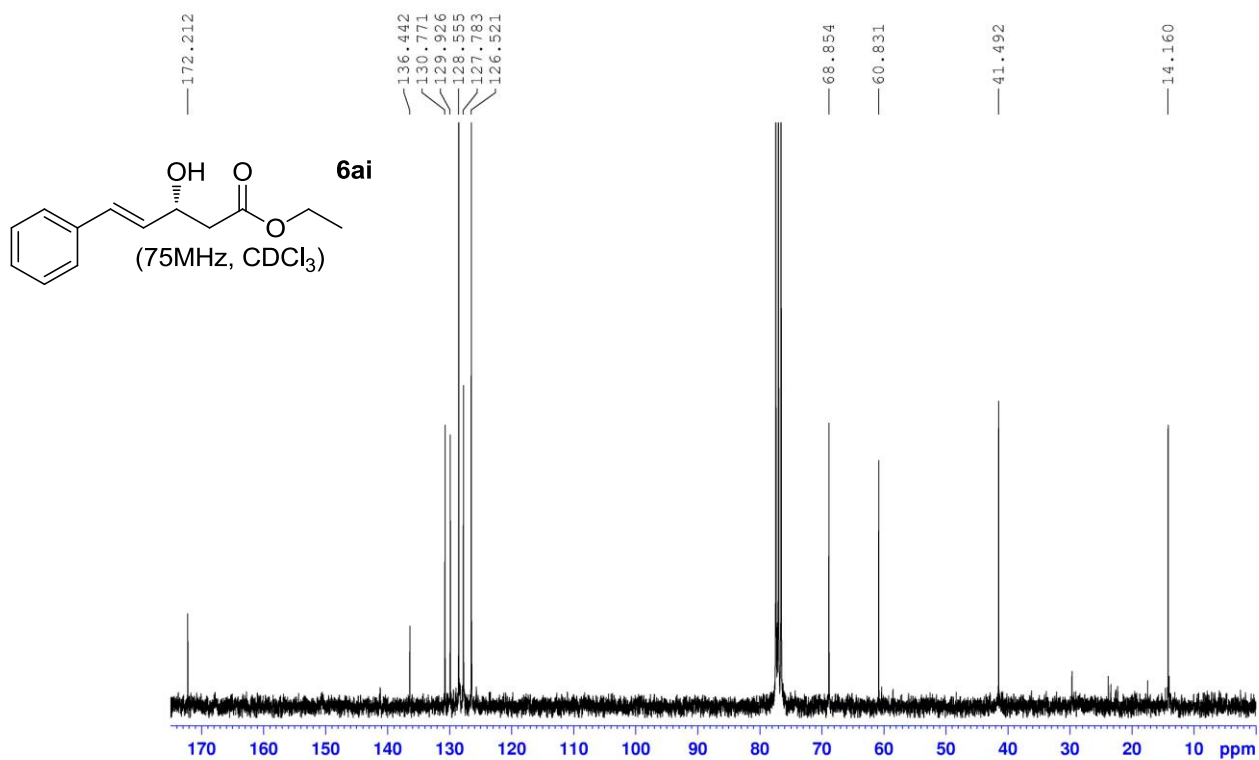
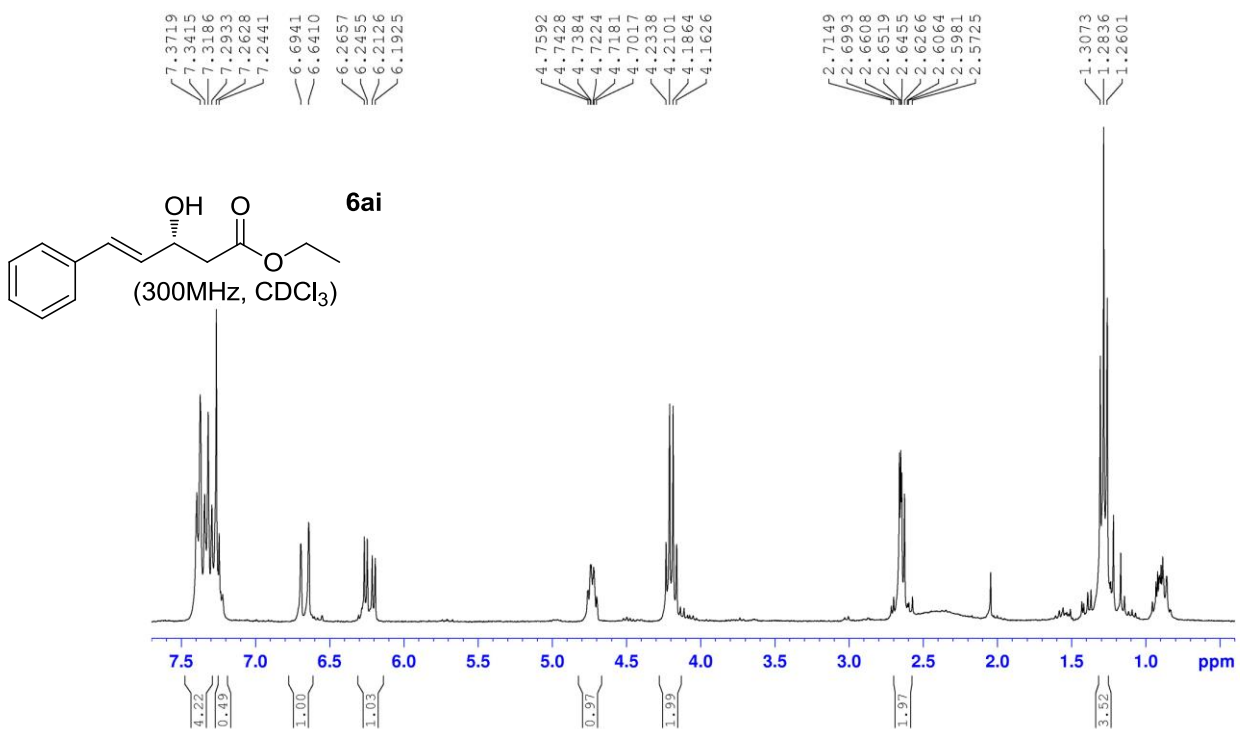


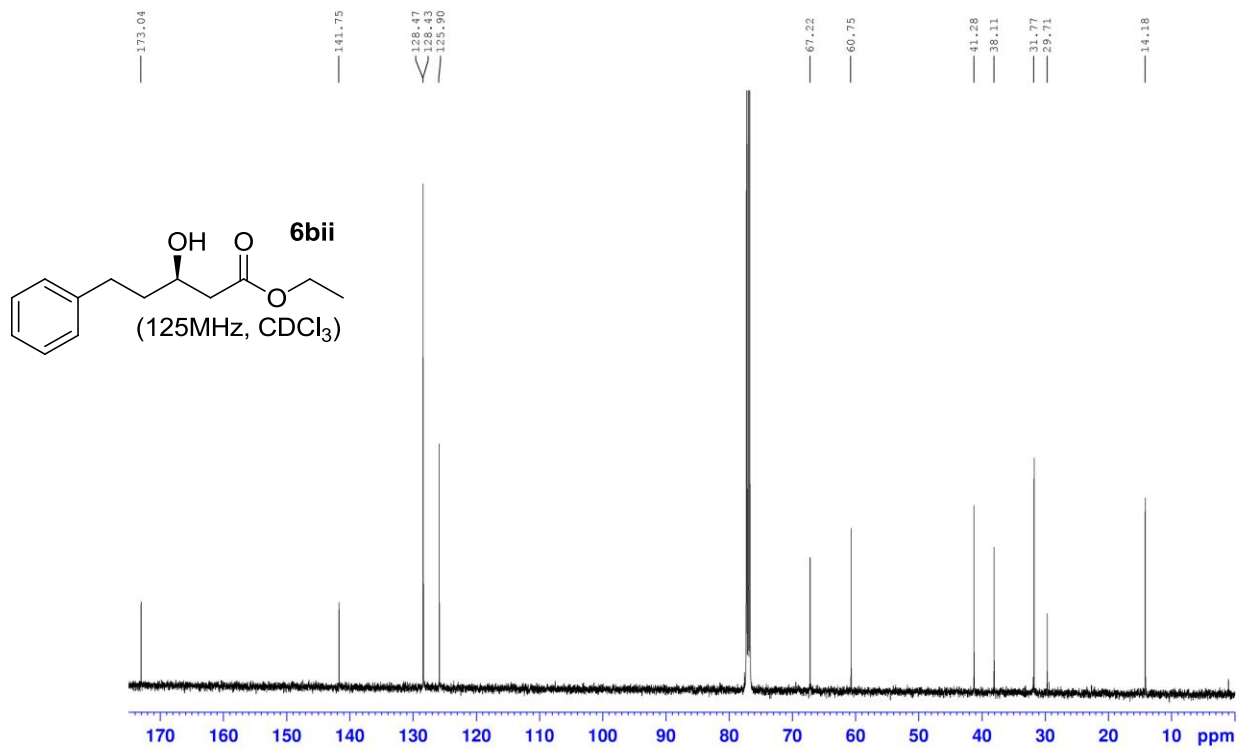
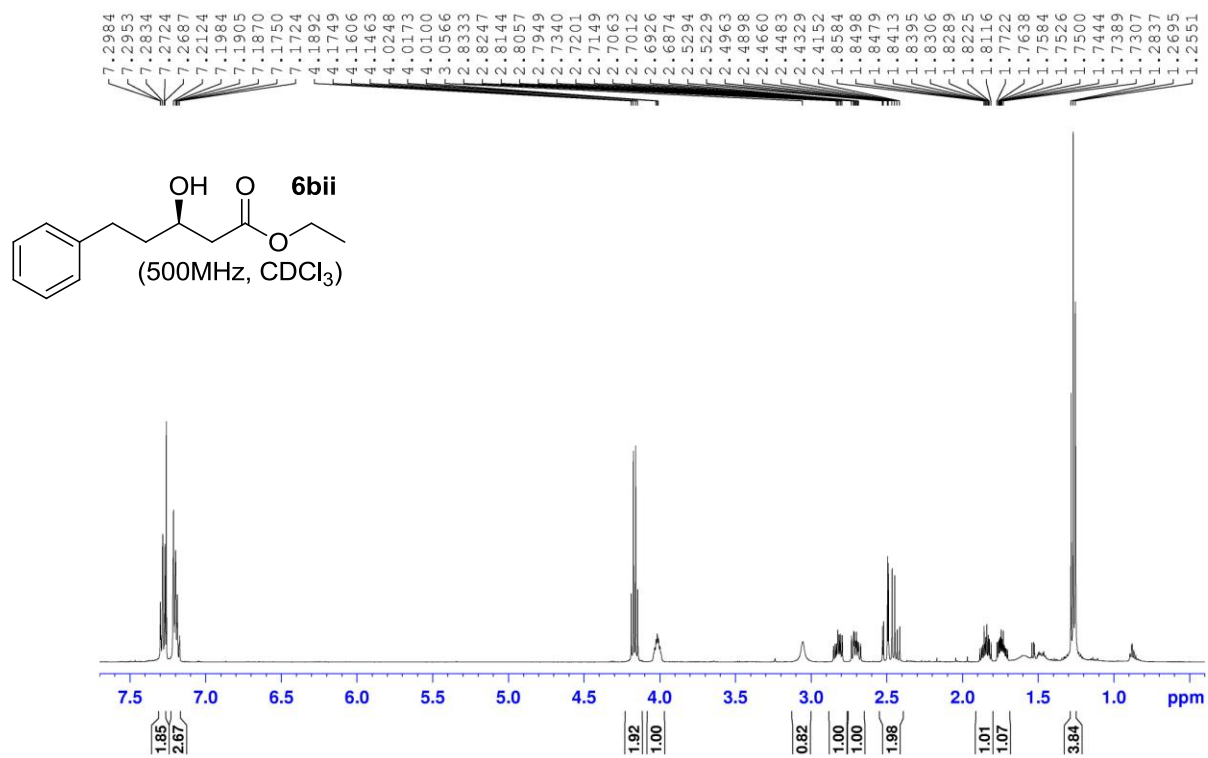


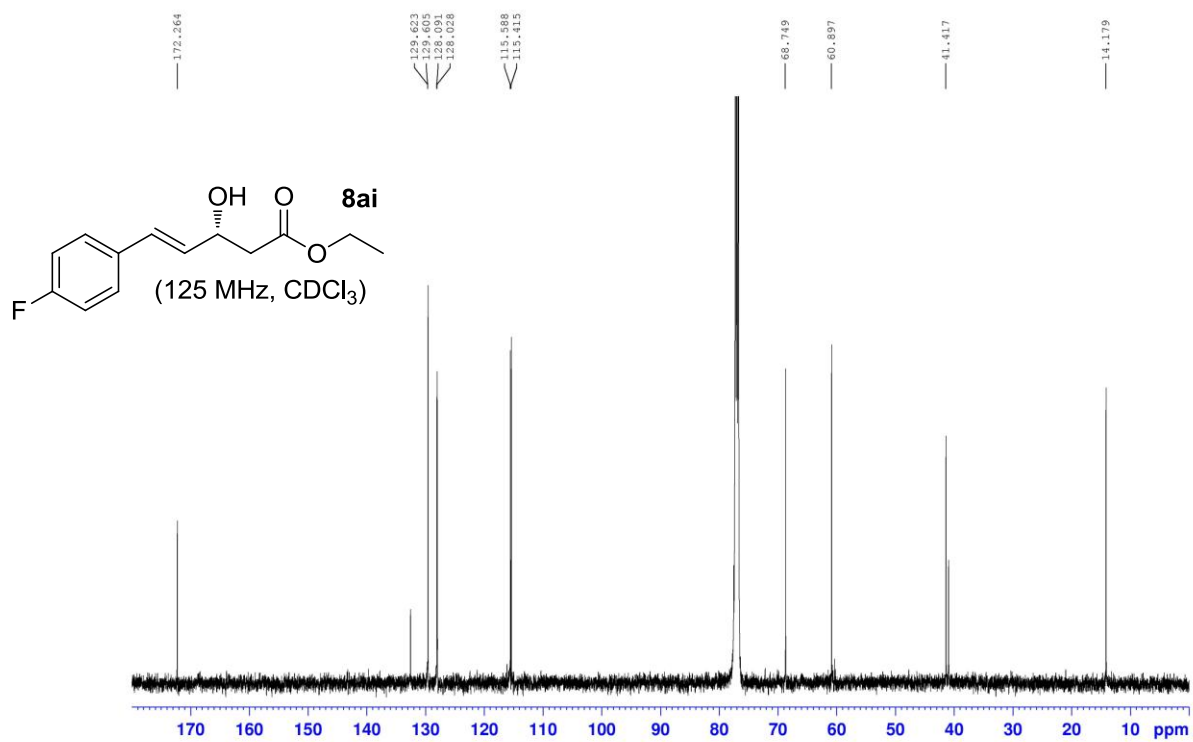
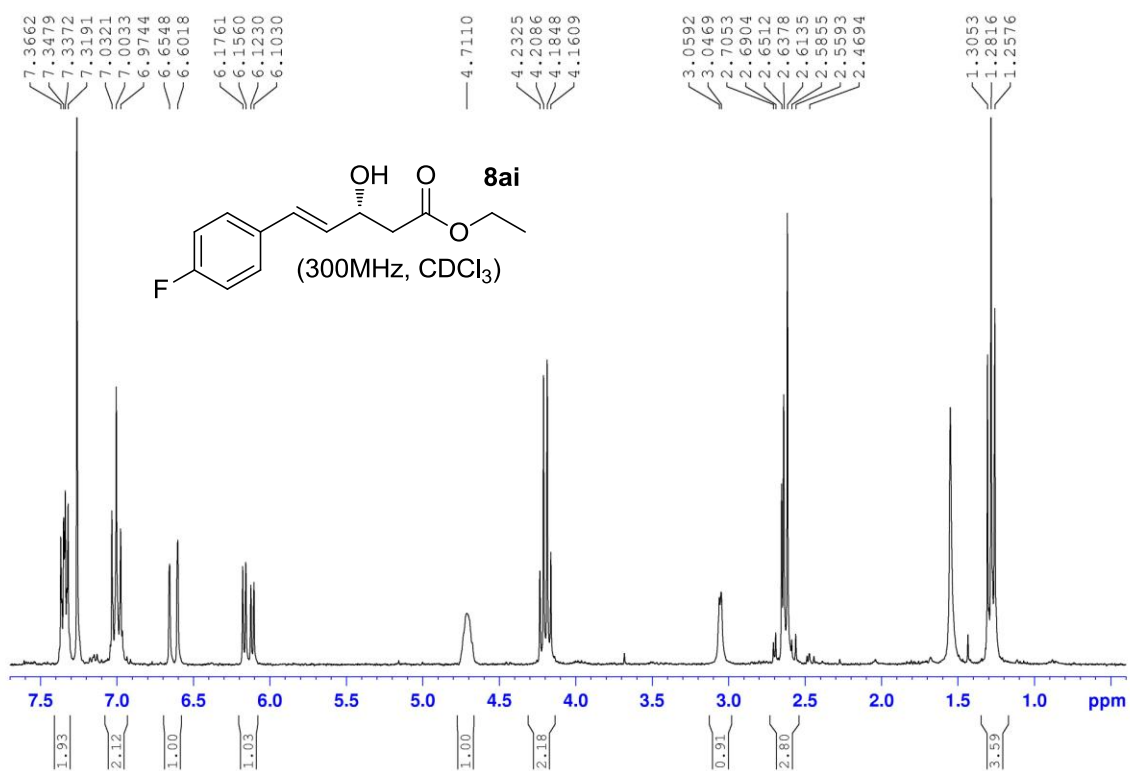


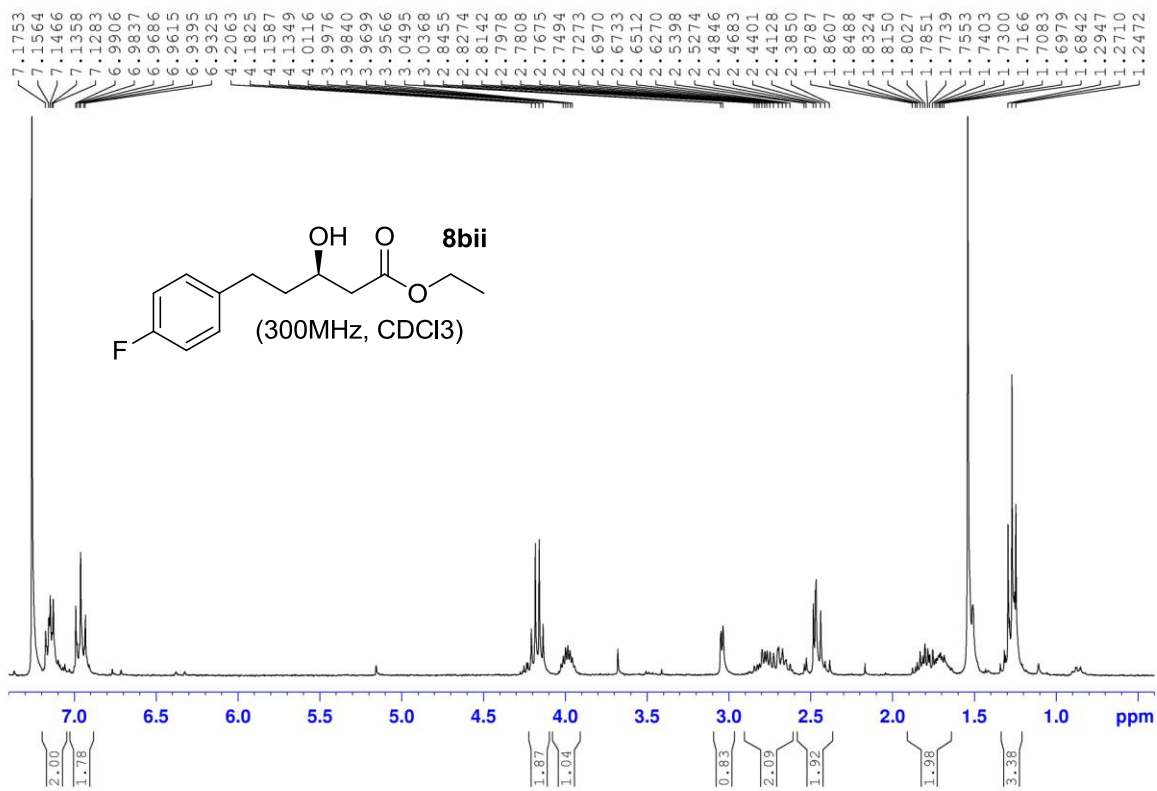












— 172.977

< 129.813
< 129.710

< 115.260
< 114.980

— 67.021

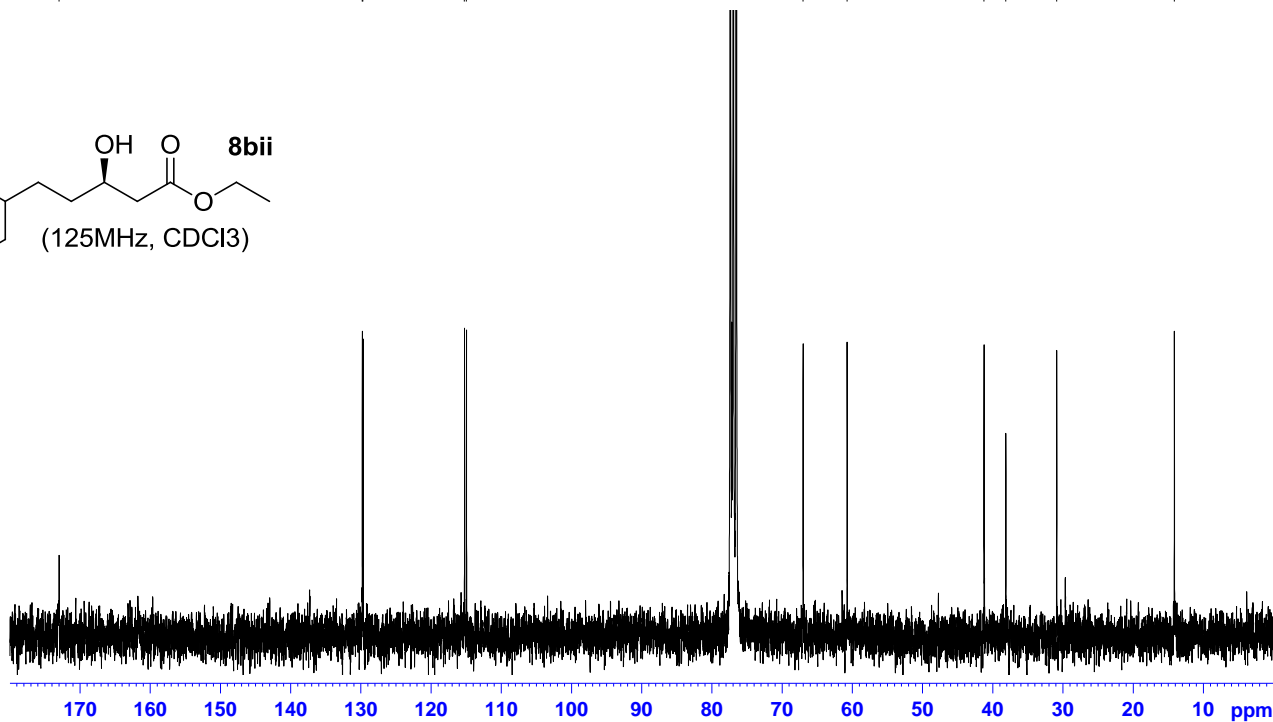
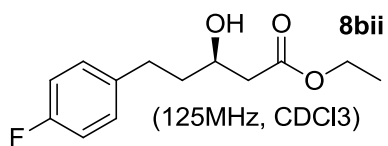
— 60.756

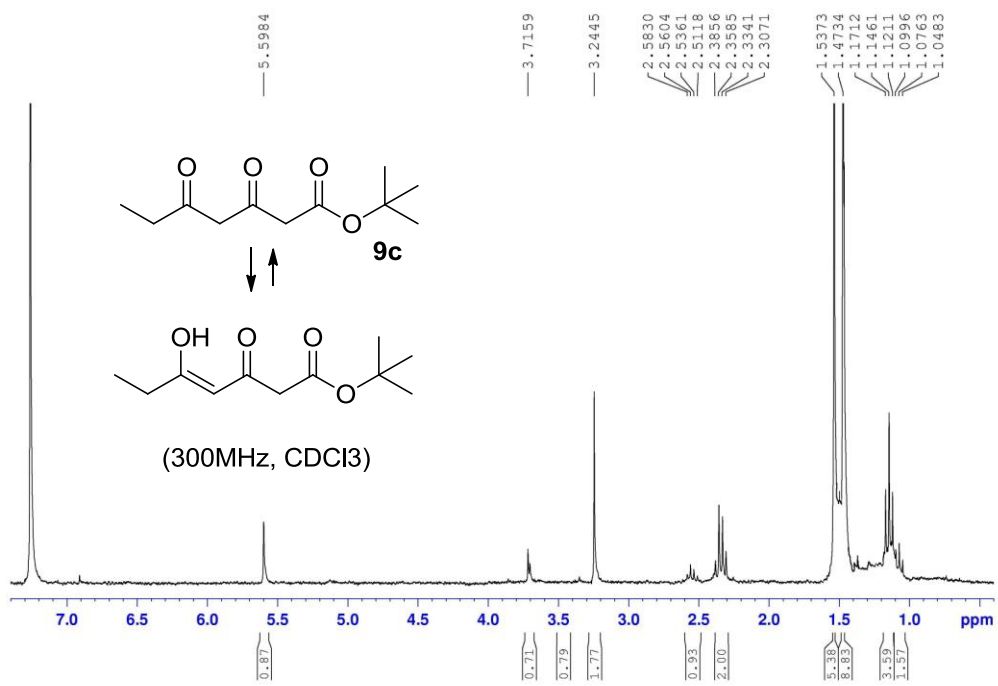
— 41.252

— 38.153

— 30.905

— 14.149





ΜΕΡΟΣ Β΄

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1,2- δικετόνες και 1,3- κετοεστέρες

Οι α-κετοεστέρες και οι 1,2-δικετόνες, είναι πολύ σημαντικές χημικές ενώσεις στην οργανική σύνθεση. Εμπλέκονται στην σύνθεση πολλών χημικών μορίων με φαρμακευτική δράση¹. Συνήθως χρησιμοποιούνται σαν πρόδρομα μόρια α) σε intercalation reactions,² β) για τη σύνθεση καρβοξυλικών οξέων³ και ετεροκυκλικών ενώσεων,⁴ γ) για την ασύμμετρη σύνθεση α- υδροξυ κετονών,⁵ ακυλοϊνών και δ) για την απευθείας σύνθεση ινδολών.⁶ Οι 1,2-δικετόνες παρουσιάζουν επιπλέον ενδιαφέρουσες εφαρμογές σαν φωτο-ευαισθητοποιητές και φωτο-εκκινήτων.⁷

Η πρακτική και αποτελεσματική σύνθεση α-κετο- εστέρων και 1,2- δικετονών παραμένει ένας ενδιαφέρον και γεμάτος προκλήσεις στόχος. Οι περισσότερες συνθετικές μεθοδολογίες που απαντούν στη βιβλιογραφία περιέχουν επικίνδυνα και τοξικά αντιδραστήρια ή καταλύτες,⁸ ενώ άλλες απαιτούν περίπλοκες και χρονοβόρες πειραματικές διαδικασίες,⁹ κάτω από αυστηρές και μη ήπιες συνθήκες.¹⁰ Επιπλέον, σε κάποιες περιπτώσεις, για την μείωση των χρόνων αντίδρασης χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια τα οποία έχουν σημαντικό έως μεγάλο κόστος.¹¹

Πρόσφατα η ερευνητική ομάδα του Yang, παρουσίασε μια αποδοτική μέθοδο για την σύνθεση α-κετο- εστέρων και 1,2- δικετονών.¹² Επέδειξαν με επιτυχία τη σύνθεση α-κετο εστέρων από την οξειδωτική διάσπαση κυανο-κετο-φωσφορανίων, ωθούμενη από διμεθυλο-διοξιδάνιο. Η ερευνητική ομάδα του Yuan, χρησιμοποίησε μοριακό ιώδιο (I₂) ως καταλύτη για την οξειδωτική διάσπαση 1,3-δι-αρυλο-δικετονών στις αντίστοιχες 1,2-δι-αρυλο-δικετόνες.¹³ Επιπροσθέτως η ερευνητική ομάδα του Itoh παρασκεύασε 1,2-δικετόνες από την καταλυτική αερόβια αποκαρβοξυλίωση 1,2-δικετονών, παρουσία μοριακού ιωδίου (I₂), κάτω από συνθήκες ακτινοβολήσης.¹⁴ Σε μια εναλλακτική πορεία, η ίδια ερευνητική ομάδα παρασκεύασε 1,2-δικετόνες από αλκύνια και μια πηγή βρωμιδίου.¹⁵ Όλες οι παραπάνω μέθοδοι οδηγούν σε καλές αποδόσεις απομονωμένων α-κετοεστέρων και 1,2-δικετονών. Πολύ πρόσφατα, ο Zhang και η ομάδα του συνέθεσαν 1,2-δικετόνες με τη χρήση FeCl₃, ως καταλύτη, και περίσσεια *τριτ*-βουτυλ νιτριλίου ως οξειδωτικό.¹⁶ Στην περίπτωση αυτή, οι συνθήκες αντίδρασης είναι ήπιες και οδηγούν σε καλές αποδόσεις σε χρόνο έως 12 ώρες.

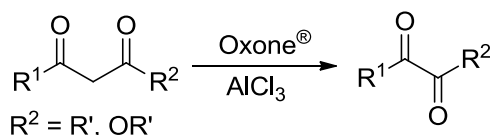
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ερευνητικές προσπάθειες για τη σύνθεση συστημάτων 1,2-δικετονών και α-κετοεστέρων είναι συνεχώς σε εξέλιξη, καθώς τα μόρια αυτά είναι πολύ χρήσιμα σε διάφορες εφαρμογές. Στο Μέρος Β' παρουσιάζεται μια νέα μέθοδος σύνθεσης τέτοιων μορίων μέσω οξειδωτικής διάσπασης 1,3-δικετονών και β-κετοεστέρων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση του συστήματος Oxone/ AlCl_3 σε υδατικό διάλυμα και αποτελεί μια μέθοδο ήπιων συνθηκών, περιβαλλοντικώς αποδεκτή, φθηνή και με υψηλή έως εξαιρετικά υψηλή απόδοση σε προϊόν. Τέλος, παρατίθεται και μια μηχανιστική προσέγγιση της αντίδρασης.

Το οξειδωτικό σύστημα Oxone / AlCl₃ σε υδατικό διάλυμα ως ένα νέο σύστημα για την σύνθεση απλών α- κετο- εστέρων και 1,2- δικετονών από πρόδρομα μόρια τους αντίστοιχους β- κετο- εστέρες και 1,3- δικετονών.

Η χρήση του Oxone, 2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄, στην οργανική σύνθεση, ως οξειδωτικό μέσο, διευρύνεται ταχύτατα την τελευταία δεκαετία, επειδή είναι εύχρηστο, σταθερό, μη τοξικό, χαμηλού κόστους και υδατοδιαλυτό. Περιβαλλοντικά είναι ένα αποδεκτό αντιδραστήριο. Το Oxone, έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες οξειδωτικές μετατροπές ετεροκυκλικών ενώσεων.¹⁷ Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η χρήση του συστήματος Oxone / AlCl₃, ως μέσο για την οξειδωτική μετατροπή β- κετο- εστέρων και 1,3- δικετονών στις αντίστοιχες 1,2- δικαρβόνυλο- ενώσεις.

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η απευθείας (σε ένα συνθετικό βήμα) σύνθεση α- κετο- εστέρων και 1,2- δικετονών, χρησιμοποιώντας το σύστημα Oxone / AlCl₃ σε νερό, για την οξειδωτική διάσπαση των πρόδρομων β- κετο- εστέρων και 1,3- δικετονών (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της οξειδωτικής μετατροπής των 1,3- δικαρβόνυλο- ενώσεων προς τις αντίστοιχες 1,2- δικαρβόνυλο ενώσεις.

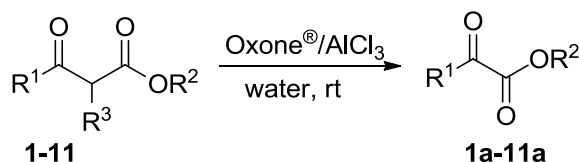
Αυτή η απλή αντίδραση, σε ένα και μόνο βήμα σε υδατικό διάλυμα, είναι μια υψηλής απόδοσης, μικρού χρόνου και περιβαλλοντικώς αποδεκτή μέθοδος για τη σύνθεση τέτοιων προϊόντων.

Στόχος μας ήταν η ανάπτυξη μιας πειραματικής μεθόδου για την παρασκευή 1,3- δικαρβόνυλο- ενώσεων, περιβαλλοντικώς αποδεκτή, υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης και μικρό κόστος. Η αρχική ιδέα ήταν η αξιοποίηση του Oxone, ως οξειδωτικό μέσο, για την οξείδωση της μεθυλενικής ομάδας μεταξύ των δυο καρβονυλίων, προς σχηματισμό του αντίστοιχου υδροξυλιωμένου ενδιάμεσου. Το ενδιάμεσο μπορεί να οξειδωθεί παρουσία του AlCl₃, ενός ενεργοποιητή Lewis, σε υδατικό μέσο. Όπως πρόσφατα αναφέρθηκε στην βιβλιογραφία, το AlCl₃ σε υδατικές

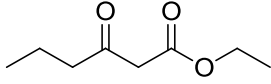
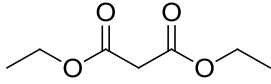
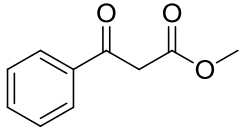
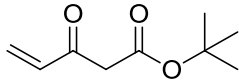
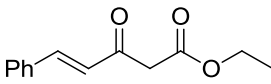
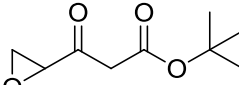
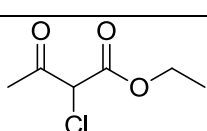
συνθήκες, υδρολύεται προς ολιγομερή, $[Al_2(OH_nCl_{6-n})]_m$, τα οποία και εμπλέκονται στην οξειδωτική διεργασία.¹⁸

Για να ερευνηθεί η δυνατότητα της χρήσης ενός τέτοιου συστήματος, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του **1** με την προσθήκη Oxone, απουσία $AlCl_3$. Μετά από 24 ώρες δεν πραγματοποιήθηκε καμιά αντίδραση. Ωστόσο, η προσθήκη $AlCl_3$, οδήγησε στον σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **1a** σε απόδοση 88% σε 24 ώρες. Για να βελτιωθεί η απόδοση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμών. Τελικώς, το βέλτιστο αποτέλεσμα επετεύχθη με τη χρήση 2.1 ισοδύναμων Oxone, 2.3 ισοδυνάμων $AlCl_3$, σε θερμοκρασία δωματίου και συγκέντρωση υποστρώματος 20mM. Υπό αυτές τις συνθήκες, η αντίδραση ήταν γρηγορότερη (10 λεπτά, α/α 1, Πίνακας 1), με υψηλή απόδοση σε απομονωμένο προϊόν (93%). Για τον έλεγχο αυτού του πειραματικού πρωτοκόλλου, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις μιας σειράς β-κετο-εστέρων **1-11**, όπως βλέπουμε στον Πίνακα 1, προς τους αντίστοιχους α-κετο-εστέρες **1a-11a** σε καλές έως εξαιρετικές αποδόσεις. Σημειώνεται πως δεν υπήρξαν προβλήματα λόγω της διαλυτότητας των αρχικών ουσιών στο νερό.

Πίνακας 1. Οξειδωτική μετατροπή των β-κετοεστέρων σε α-κετοεστέρες.



<i>α/α</i>	R^1 R^2 R^3	Oxone (eq)	$AlCl_3$ (eq)	Χρόνος	Απόδοση% (απομονωμένο προϊόν) ^a
1		2.1	2.3	10 min	93
2		2.1	2.3	10 min	98
3		2.1	2.3	10 min	98
4		2.1	2.3	1 hr	96

5		2.1	2.3	20 min	95
6		2.1	2.3	10 min	95
7		4.6	6.4	24 hr	98^β
8		2.1	2.3	15 min	50
9		3.4	3.0	4 hr	98^γ
10		2.1	2.3	1.5 hr	85
11		1.2	1.0	3 hr	98^δ

^α Σε όλες τις περιπτώσεις η μετατροπή ήταν >99%

^β Με 2.1 ισ. Oxone και 2.3 ισ. AlCl₃ η μετατροπή ήταν 53% σε 24 ώρες.

^γ Με 2.1 ισ. Oxone και 2.3 ισ. AlCl₃ η μετατροπή ήταν 75% σε 24 ώρες.

^δ Με 2.1 ισ. Oxone και 2.3 ισ. AlCl₃ η μετατροπή ήταν 99% σε 10 λεπτά, αλλά το μίγμα της αντίδρασης ήταν πολύ βρώμικο.

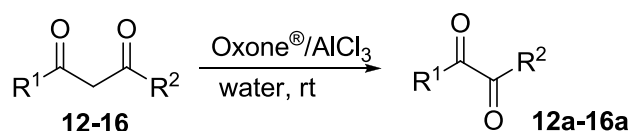
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, για τις ενώσεις **1-6**, οι αποδόσεις ήταν υψηλές, ενώ οι χρόνοι αντίδρασης ήταν μικροί (10 λεπτά έως 1 ώρα). Είναι ενδιαφέρον ότι ο διπλός δεσμός άνθρακα-άνθρακα στους ακόρεστους κετο-εστέρες **8** και **9**, δεν αντέδρασε με το Oxone προς το σχηματισμό εποξειδίου, όπως αναμενόταν σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα.¹⁹ Συγκεκριμένα, η ένωση **8** έδωσε το επιθυμητό προϊόν **8a** (85%) και ένα μη-ταυτοποιημένο παραπροϊόν (15%), όπως προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία. Η ένωση **9**, από την άλλη, έδωσε αποκλειστικά το προϊόν οξειδωτικής διάσπασης **9a**. Η αντίδραση της ένωσης **10**, που φέρει ένα εποξειδικό δακτύλιο, έδωσε αποκλειστικά το προϊόν **10a**. Παρά το γεγονός ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε χαμηλό pH και παρουσία ενός οξέος Lewis (AlCl₃), ο εποξειδικός δακτύλιος παρέμεινε ανέπαφος. Στην περίπτωση του χλωρο-εστέρα **11**, μετά από 10 λεπτά αντίδρασης, παράχθηκε ο επιθυμητός α-κετο εστέρας και μια σημαντική ποσότητα μη-ταυτοποιημένου παραπροϊόντος. Από τη στιγμή που ο α-

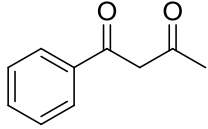
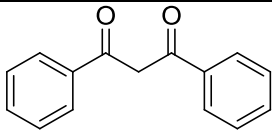
χλωρο-υποκατεστημένος άνθρακας είναι σε υψηλότερη οξειδωτική βαθμίδα (σε σχέση με τις προηγούμενες αρχικές ενώσεις), η αντίδραση θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με τα μισά ισοδύναμα Oxone (δηλαδή 1eq) και AlCl₃ (δηλαδή 1eq). Πράγματι, υπό τις νέες συνθήκες (1.2 eq Oxone και 1.0 eq AlCl₃), η αντίδραση δεν είχε παραπροϊόντα και παράχθηκε αποκλειστικά ο επιθυμητός α- κετο- εστέρας. Για τις αρχικές ενώσεις **7** και **9**, λόγω της ισχυρής ενολικής μορφής, περισσότερα ισοδύναμα Oxone και AlCl₃ προστέθηκαν για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Με βάση τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις ενώσεις **1-11**, μελετήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο σε μια σειρά 1,3-δικετονών, **12-16**, πίνακας 2. Οι τέσσερις δικετόνες που χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικές ενώσεις ήταν άκυκλες (**12-15**) και η μια κυκλική (**16**). Προς ευχαρίστησή μας, οι δικετόνες με το σύστημα Oxone/AlCl₃, έδωσαν ως αποκλειστικά προϊόντα τις αντίστοιχες 1,2-δικετόνες **12a-16a**, σε μικρούς χρόνους αντίδρασης και με εξαιρετικές αποδόσεις σε απομονωμένο προϊόν. Στην περίπτωση αρχικής δικετόνης **13**, προστέθηκαν περισσότερα ισοδύναμα Oxone και AlCl₃, λόγω της ισχυρής ενολικής μορφής, και η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες.

Αξιοσημείωτο είναι πως στις περιπτώσεις **1-7**, **9-14** και **16**, τα προϊόντα απομονώθηκαν με απλή εκχύλιση και χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό.

Πίνακας 2. Οξειδωτική μετατροπή των 1,3-δικετονών 1,2-δικετόνες.



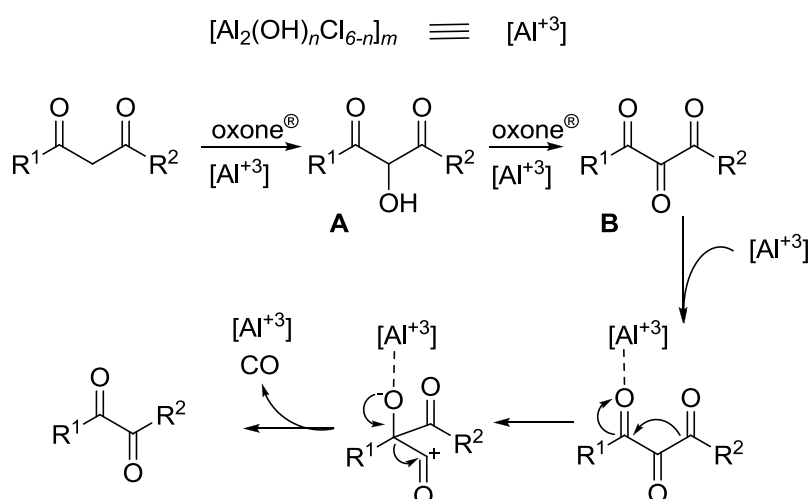
<i>a/a</i>	Δικετόνες	Oxone (eq)	AlCl ₃ (eq)	Χρόνος	Απόδοση% (απομονωμένο προϊόν) ^a
12		2.1	2.3	1 hr	90
13		3.4	4.3	24 hr	98

14		2.1	2.3	5 min	95
15		2.1	2.3	1.5 hr	94
16		2.1	2.3	1.5 hr	97

^a Σε όλες τις περιπτώσεις η μετατροπή ήταν >99%.

Μηχανιστική προσέγγιση της αντίδρασης.

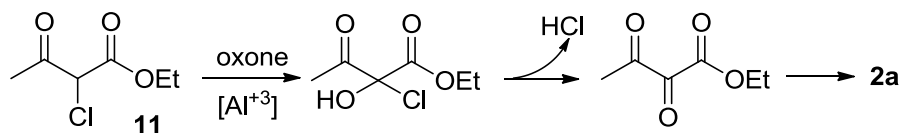
Μια μηχανιστική προσέγγιση της οξειδωτικής διάσπασης των 1,3-δικαρβόνυλο- ενώσεων **1-10** και **12-16**, παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3. Προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης.

Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός της α-υδρόξυ- δικαρβόνυλο- ένωσης **A**, ακολουθούμενη από την οξείδωσή της προς την τρι- καρβόνυλο- ένωση **B**. Τα oligομερή $[Al_2(OH)_nCl_{6-n}]_m$ από την υδρόλυση του $AlCl_3$ στο νερό, συμβολίζονται ως $[Al^{+3}]$. Η ενεργοποίηση της ένωσης **B** από τα $[Al^{+3}]$, οδηγεί σε μια επαναδιάταξη του μορίου με ταυτόχρονη απόσπαση μονοξειδίου του άνθρακα, ωθώντας την αντίδραση προς το επιθυμητό 1,2- δικαρβόνυλο προϊόν.

Στην περίπτωση του α- χλωρο-κετοεστέρα **11**, ο σχηματισμός του α- κετο-εστέρα **2a** τροποποιείται όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 4. Προτεινόμενος μηχανισμός για την παραγωγή του προϊόντος **2a** από τον α -Cl- β -κετοεστέρα **11**.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μια εξαιρετικά αποτελεσματική, ήπια, πρακτική και εύκολη μέθοδος για την σύνθεση απλών α -κετο-εστέρων και 1,2-δικετονών χρησιμοποιώντας φθηνά, μη τοξικά αντιδραστήρια, σε υδατικό μέσο. Επιπρόσθετα, τα προϊόντα συντέθηκαν απευθείας από τις αντίστοιχες 1,3-δικαρβονυλο ενώσεις, τα περισσότερα σε μικρούς χρόνους αντίδρασης (10 λεπτά έως 4 ώρες). Επίσης σημαντικό, είναι πως η απομόνωση των προϊόντων είναι πολύ απλή και στην μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν υπήρχαν παραπροϊόντα. Η αντίδραση που περιγράφηκε, μπορεί να αποτελέσει μια φιλική προς το περιβάλλον πολύτιμη εναλλακτική μέθοδο για την σύνθεση τέτοιων μορίων και τον περιορισμό της χρήσης μετάλλων μετάπτωσης σε οξειδωτικές πορείες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β' ΜΕΡΟΥΣ

Όργανα και αντιδραστήρια.

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια ήταν υψηλής καθαρότητας. Το AlCl_3 ήταν σε μορφή πούδρας. Ξηρό THF παράχθηκε με απόσταξη παρουσία μεταλλικού νατρίου και βενζοφαινόνης σε συσκευή Soxhlet. Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί (χρωματογραφία στήλης), πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα κολώνας silica gel με διαλύτες εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα. Για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel (grade 60 F₂₄₅). Ο αέριος χρωματογράφος ήταν εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και τριχοειδή κολώνα 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm. Απλά φάσματα ¹H NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο 300 MHz ή 500 MHz σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και τα φάσματα ¹³CNMR με φασματόμετρο 75 MHz σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, χρησιμοποιώντας και στις δυο περιπτώσεις Me_4Si , ως εσωτερικό πρότυπο. Οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε ppm με σημείο αναφοράς στο Me_4Si . Thermo LTQ-Orbitrap XL με ETD παγίδα ιόντων χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των φασμάτων μάζας υψηλής ανάλυσης των προϊόντων.

Γενικές μέθοδοι σύνθεσης των αρχικών ενώσεων.

Οι ενώσεις **7**, **8**, **15** συνθέθηκαν με αλδολική συμπύκνωση ακολουθούμενη από οξειδωση. Η ένωση **10** συντέθηκε με καταλύομενη από αμινοξύ εποξειδωση της ένωσης **8**.

Γενική μέθοδος σύνθεσης του 3-υδροξυ 3-φαινυλο-προπανοϊκού μεθυλεστέρα, 3-υδροξυ πεντ-4-εν-ικός τριτ-βουτυλο-εστέρας και 5-υδροξυ 1-φαινυλ-εξαν-3-ονη.

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ξηρή δι-ισοπροπυλαμίνη (462 μL, 3.3 mmol) διαλύθηκε σε ξηρό THF (10 mL). Το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και BuLi 1.6 M σε εξάνια (2.0 mL, 3.3 mmol) προστέθηκε στάγδην. Ανάδευση για 15 λεπτά στους 0 °C και ψύξη στους -78 °C, κατόπιν διάλυμα του εστέρα ή της κετόνης (3 mmol of οξικού αιθυλεστέρα, οξικού τριτ-βουτυλο-εστέρα και 4-φαινυλο-βουταν-2-ονης αντίστοιχα) σε ξηρό THF (2 mL) προστέθηκε και το μίγμα αναδεύτηκε για 20 min στους -78 °C. Αποσταγμένη αλδεύδη, αποσταγμένη πολύ πρόσφατα, (6 mmol βενζαλδεύδης, ακρυλο-αλδεύδης and 4.5 mmol ακεταλδεύδης αντίστοιχα) διαλυμένη σε 3 mL ξηρού

THF, προστέθηκαν στάγδην. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ελέγχθηκε με TLC, κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (10 mL) προστέθηκε. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2 × 15 mL) και οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις εκπλύθηκαν με κορεσμένο χλωριούχο νάτριο (Brine) (30 mL), ξηράθηκε με άνυδρο MgSO₄ και συμπυκνώθηκε στο ρότορα.

3-υδρόξυ 3-φαινυλο-προπανοϊκός μεθυλεστέρας

Οξικός αιθυλεστέρας (3 mmol, 222 mg) και βενζαλδεΐδη (6 mmol, 636 μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο της αλδολικής συμπύκνωσης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 h. Δεν απαιτήθηκε περαιτέρω καθαρισμός. (450mg, 83%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 2.68 (m, 2H, CH₂), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (broad s, 1H, OH), 5.08 (m, 1H, CH(OH)) και 7.28 (m, 5H, αρωματικά-H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 43.4, 51.8, 70.3, 125.7 (2C), 127.7, 128.5 (2C), 142.9 και 172.5; HRMS (ESI-ion trap) m/z: [M – H₂O + H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₂O₃ 163.0754; Found 163.0753.

3-υδρόξυ πεντ-4-εν-οϊκός τριτ-βουτυλο-εστέρας

Οξικός τριτ-βουτυλο-εστέρας (3 mmol, 348 mg) και ακρυλαλδεΐδη (6 mmol, 395 μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο της αλδολικής συμπύκνωσης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 h. Δεν απαιτήθηκε περαιτέρω καθαρισμός. (500 mg, 90%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.43 (s, 9H, *t*-Bu), 2.43 (m, 2H, CH₂), 3.24 (broad s, 1H, OH), 4.44 (m, 1H, CH(OH)), 5.10 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, *vinyl-H*), 5.27 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, *vinyl-H*) και 5.83 (ddd, *J*₁ = 17.2 Hz, *J*₂ = 10.5 Hz, *J*₃ = 5.5 Hz, 1H, *vinyl-H*); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 28.0, 42.1, 69.0, 81.3, 115.0, 138.9 και 171.6; HRMS (ESI-ion trap) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₉H₁₆O₃ 195.0992; Found 195.0993.

5-υδρόξυ 1-φαινυλ-εξαν-3-όνη

4-φαινυλ-βουταν-2-όνη (3 mmol, 450 μL) και ακεταλδεΐδη (4.5 mmol, 264 μL) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο της αλδολικής συμπύκνωσης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 h. Το crude προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 5/1). (489 mg, 85%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.17 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 2.53 (m, 2H, C(O)CH₂C(OH)), 2.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, PhCH₂), 2.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂C(O)), 3.07 (br s, 1H,

OH), 4.22 (m, 1H, CH(OH) και 7.24 (m, 5H, αρωματικά-H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 22.4, 29.4, 44.9, 50.8, 63.8, 126.2, 128.2 (2C), 128.5 (2C), 140.7 και 210.9; HRMS (ESI-ion trap) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₁₂H₁₆O₂ 193.1223; Found 193.1223.

Γενική μέθοδος οξείδωσης Jones για τη σύνθεση του 3-οξο-3-φαινυλπροπανοϊκού μεθυλεστέρα, 3-οξο-πεντ-4-ενοϊκού τριτ-βουτυλο-εστέρα και 6-φαινυλο-εξαν-2,4-διόνης.²⁰

1 mmol από τον αντίστοιχο υδροξυ εστέρα ή υδροξυ κετόνη (3-υδροξυ- 3-φαινυλο-προπανοϊκός μεθυλεστέρας, 3-υδροξυ- πεντ- 4- εν-ικός τριτ- βουτυλο- εστέρας and 5-υδροξυ- 1-φαινυλ-εξαν-3-όνη αντίστοιχα) διαλύθηκε σε 5 mL ακετόνης (absolute). Το μίγμα ψύχθηκε στους 0°C και προστέθηκε σταδιακά αντιδραστήριο Jones (1.08 mmol, 360 μL, διαλυμένο σε 1 mL ακετόνης). Μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου Jones, αφέθηκε να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Με το τέλος της αντίδρασης που ελέγχθηκε με TLC, σταγόνες 2-προπανόλης προστέθηκαν για να εξουδετερωθεί η περίσσεια του αντιδραστήριου Jones. Προστέθηκε νερό και το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με διεθυλο- αιθέρα (2 × 10 mL). Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο MgSO₄ και συμπυκνώθηκαν στο ρότορα. Δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός.

3-οξο-φαινυλο-προπανοϊκός μεθυλεστέρας (7)

3-υδροξυ- 3-φαινυλο- προπανοϊκός μεθυλεστέρας (1mmol, 178 mg) και αντιδραστήριο Jones (360 μL) προστέθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 h. (175 mg, 98%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 3.74 (s, 3H, κετο- CH₃), 3,79 (s, 3H, ενολ- CH₃), 4.00 (s, 2H, κετο- CH₂), 5.67 (s, 1H, ενολ- C(OH)=CH), 7.45 (m, 2H για κετο- και 2H για ενολ- ορθο-H), 7.59 (dd, J₁ = 8.4 Hz, J₂ = 7.3 Hz, 1H για κετο- και 1H για ενολ- παρα-H), 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ενολ- μετα-H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H, κετο μετα-H) και 12.50 (s, 1H, ενολ- OH); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 45.7 (κετο), 51.4 (ενολ), 52.5 (κετο), 87.0 (ενολ), 126.1 (ενολ, 2C), 128.50 (κετο, 2C), 128.53 (κετο), 128.79 (κετο, 2C), 130.1 (κετο), 131.3 (κετο), 133.8 (κετο, 2C), 135.9 (κετο), 167.9 (κετο), 171.5 (κετο), 173.5 (κετο) και 192.4 (κετο); HRMS (ESI-ion trap) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₀O₃ 179.0703; Found 179.0700.

3-οξο-πεντ-4-ενοϊκός τριτ-βουτυλο-εστέρας (8)

3-υδροξυ- πεντ- 4- εν-ικός τριτ- βουτυλο- εστέρας (1mmol, 172 mg) και αντιδραστήριο Jones (360 μ L) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 h. (165 mg, 97%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.44 (s, 9H, κετο- *t*-Bu), 1.47 (s, 9H, ενολ- *t*-Bu), 3.51 (s, 2H, κετο- CH_2), 4.96 (s, 1H, ενολ- $\text{CH}=\text{CH}$), 5.47 (dd, $J_1 = 6.1$ Hz, $J_2 = 5.9$ Hz, 1H), 5.9 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 6.04 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 6.23 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 6.37 (dd, $J_1 = 17.6$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, 1H) και 11.91 (s, 1H, ενολ- OH); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 27.9 (ενολ), 28.2 (κετο), 47.8 (κετο), 81.1 (κετο), 82.0 (ενολ), 93.4 (ενολ), 121.8 (ενολ), 129.7 (ενολ), 131.4 (ενολ), 135.8 (ενολ), 166.3 (ενολ), 168.1 (κετο), 172.5 (ενολ) και 193.0 (ενολ); HRMS (ESI-ion trap) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3$ 171.0943; Found 171.1012.

6-φαινυλο-εξαν-2,4-διόνη (15)

5- υδροξυ- 1-φαινυλ-εξαν-3-όνη (192 mg) και αντιδραστήριο Jones (360 μ L) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 h. (185 mg, 97%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 2.05 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.62 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, 2H, PhCH_2C), 2.95 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 5.49 (s, 1H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$) και 7.25 (m, 5H, αρωματικά-H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 24.6, 31.3, 39.8, 99.8, 126.0, 128.1 (2C), 128.3 (2C), 140.5, 190.8 και 193.1; HRMS (ESI-ion trap) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$ 191.0994; Found 191.1064.

3-οξο-5-φαινυλο-πεντ-4-ενοϊκός αιθυλεστέρας (9).²¹

Για τη σύνθεση του σταθεροποιημένου υλιδίου 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, τρι-φαινυλο-φωσφίνη (63.6 mmol, 16.7 g) και 4-χλωρο-3-οξο-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας (70 mmol, 9.46 mL) σε 50 mL τολουόλιο, αναδεύτηκαν για 24 ώρες στους 50 $^\circ\text{C}$. Το στερεό προϊόν ξεπλύθηκε με τολουόλιο και προστέθηκε απεσταγμένο νερό έως ότου διαλυθεί το στερεό προϊόν. Το μίγμα εκχυλίστηκε δυο φορές με διαίθυλο-αιθέρα. Κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου προστέθηκε μέχρι το pH να γίνει 8. Το στερεό φιλτραρίστηκε με χωνί Buchner και πλύθηκε δυο φορές με απεσταγμένο νερό και δυο φορές με διαίθυλο-αιθέρα. Για την ξήρανσή του τοποθετήθηκε σε αντλία κενού. (15 g, 60%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 3.35 (s, 2H), 3.8 (d, 1H, $J = 24.9$ Hz), 4.2 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 7.5 (m, 15 αρωματικά-H); ^{13}C NMR

(75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 14.2 (2C), 48.3, 48.5, 51.5, 53.0, 60.4 (2C), 126.0 (2C), 127.2 (2C), 128.7 (2C), 128.9 (2C), 132.09 (2C), 132.13 (2C), 133.0 (2C), 133.2 (2C), 170.7 (2C), 183.96, 184.00;

2 mmol 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (780 mg) και 4 mmol βενζαλδεΐδης (407 μ L) προστέθηκαν σε ξηρό THF (10 mL) και το μίγμα αφέθηκε σε ήπιο βρασμό (reflux) για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο περισσότερος διαλύτης συμπυκνώθηκε, κατόπιν προστέθηκε εξάνιο (3 mL) για να καταβυθιστούν τα φωσφινοξείδια και το μίγμα φιλτραρίστηκε μέσω πορώδη ηθμού στρωμένου με silica gel. Ο ηθμός ξεπλήθηκε με μίγμα εξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 2/1 (6 mL) και η οργανική φάση συμπυκνώθηκε στο ρότορα. Το crude προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 70/1). (196 mg, 45%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.26 (t, 3H κετο- και 3H ενολ- CH₃), 3.70 (s, 2H ,C(O)CH₂C(O)), 4.22 (q, 2H κετο- και 2H ενολ- CH₃CH₂O), 5.17 (s, 1H, ενολ- CH=CH), 6.43 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz, ενολ- CH=CHC(OH)=C), 6.81 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz, κετο- CH=CHC(O)), 7.34 (m, 5 αρωματικά-H κετο- και 5 αρωματικά-H για την ενολική μορφή, 1 βινυλικό-H για τη κετο- και 1 βινυλικό-H για την ενολική μορφή) και 12.00 (s, ενολ- OH); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 14.1 (κετο), 14.2 (ενολ), 47.6 (κετο), 60.2 (ενολ), 61.4 (ενολ), 91.9 (ενολ), 121.9 (ενολ), 125.2 (ενολ), 127.5 (ενολ, 2C), 128.5 (κετο, 2C), 128.8 (ενολ, 2C), 129.0 (ενολ, 2C), 129.3 (κετο), 130.9 (κετο), 134.1 (ενολ), 135.3 (ενολ), 136.7 (κετο), 144.5 (ενολ), 167.3 (ενολ), 169.2 (ενολ), 172.8 (ενολ) και 191.9 (ενολ); HRMS (ESI-ion trap) *m/z*: [M + H]⁺ Calcd for C₁₃H₁₄O₃ 219.0943; Found 219.1012.

3-(οξυραν-2-υλ)-3-οξο-προπανοϊκός τριτ-βουτυλο-εστέρας (10)²²

1 mmol (170 mg) 3-οξο-πεντ-4-ενοϊκού τριτ-βουτυλο-εστέρα, 3 mmol υπεροξειδίου του υδρογόνου (830 μ L 30% διάλυμα), 0.2 mmol L-αργινίνης (35 mg) διαλυμένο σε 2 mL absolute MeOH και 2 mL απεσταγμένου νερού αναδεύτηκαν για 5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε Brine και αρκετός διαιθυλο- αιθέρας και το μίγμα αναδεύτηκε έντονα για 30 λεπτά. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και η υδατική εκχυλίστηκε δυο φορές με διαιθυλο-αιθέρα. Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις ξηράθηκαν σε άνυδρο MgSO₄ και συμπυκνώθηκαν στο ρότορα. Το crude προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 15/1). (120 mg, 65%); ¹H NMR (300 MHz;

CDCl₃; Me₄Si): δ 1.47 (s, 9H, κετο- *t*-Bu), 1.49 (s, 9H, ενολ- *t*-Bu) 2.95 (m, 1H), 3.00 (dd, $J_1 = 6.7$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 3.06 (s, 2H, κετο- *CH*₂), 3.30 (s, 2H), 3.51 (m, 1H), 5.18 (s, ενολ- 1H) και 12.08 (s, 1H, ενολ- OH); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 27.9 (κετο), 28.2 (ενολ), 29.7 (ενολ), 44.5 (κετο), 46.0 (κετο), 47.5 (ενολ), 49.6 (ενολ), 53.5 (κετο), 82.4 (ενολ), 91.6 (κετο), 165.6 (κετο) και 200.4 (κετο); HRMS (ESI-ion trap) *m/z*: [M + H]⁺ Calcd for C₉H₁₄O₄ 187.0965; Found 187.0969.

Γενική περαματική πορεία για την οξειδωτική διάσπαση των β- κετοεστέρων και των 1,3-δικετονών προς τους αντίστοιχους α- κετοεστέρες και 1,2 δικετόνες.

1 mmol (με εξαίρεση την ένωση **10** που χρησιμοποιήθηκαν 0.56 mmol) β- κετο- εστέρα ή 1,3- δικετόνης (200 mM) διαλύθηκε σε 50 mL απεσταγμένου νερού. Oxone (2.1 – 4.6 eq) και AlCl₃ (1 – 6.4 eq) προστέθηκαν και το μίγμα αναδεύτηκε 5 λεπτά έως 24 ώρες. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε κορεσμένο υδατικό διάλυμα άλατος Rochelle. Το μίγμα εκχυλίστηκε με διαιθυλο- αιθέρα. Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο MgSO₄ και ο διαλύτης συμπυκνώθηκε στο ρότορα.

2-οξο-προπανοϊκός τριτ- βουτυλο- εστέρας (1a)

ακετοξικός τριτ-βουτυλο- εστέρας (1 mmol, 144 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl₃ (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 10 λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (139 mg, 93%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.51 (s, 9H, *t*-Bu) και 2.44 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 23.6, 27.5, 86.4, 161.8 και 191.3; HRMS (ESI-ion trap) *m/z*: [M + H]⁺ Calcd for C₇H₁₂O₃ 145.0786; Found 145.0857.

2-οξο-προπανοϊκός αιθυλεστέρας (2a)

ακετοξικός αιθυλεστέρας (1mmol, 130 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl₃ (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 10 λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (114 mg, 98%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃) και 4.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 13.7, 23.4, 64.6, 163.3 και 191.3; HRMS (ESI-ion trap) *m/z*: [M + H]⁺ Calcd for C₅H₈O₃ 117.0473; Found 117.0542.

2-οξο-βουτανοϊκός μεθυλεστέρας (3a)

3-οξο-βουτανοϊκός μεθυλεστέρας (1 mmol, 130 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 gr) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 10 λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (114 mg, 98%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2.86 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2CH_3) και 3.90 (s, 3H, OCH_3) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 8.5, 29.3, 54.8, 164.0 και 195.1; HRMS (ESI-ion trap) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ 117.0473; Found 117.0542.

2-οξο-εξανοϊκός μεθυλεστέρας (4a)

3-οξο-εξανοϊκός μεθυλεστέρας (1 mmol, 158 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 gr) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στη 1 ώρα λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (138 mg, 96%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1.36 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$) και 3.91 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 13.6, 21.9, 26.2, 35.4, 54.8, 164.0 και 194.3; HRMS (ESI-ion trap) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$ 145.0786; Found 145.0855.

2-οξο-πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (5a)

3-οξο-πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (1 mmol, 158 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl_3 (2.3, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 20 λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (137 mg, 95%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.66-1.78 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.80 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) και 4.36 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 13.3, 13.7, 17.7, 37.6, 64.5, 163.4 και 194.0.

Οξαλικός διαιθυλεστέρας (6a)

μαλονικός διαιθυλεστέρας (1 mmol, 160 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 10 λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω

καθαρισμός. (139 mg, 95%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_2CH_3) και 4.35 (q, 4H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 13.7 (2C), 64.6 (2C) και 162.8 (2C); HRMS (ESI-ion trap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ 147.0579; Found 147.0649.

2-οξο-φαινυλο-οξικός μεθυλεστέρας (7a)

3-οξο-φαινυλο-οξικός μεθυλεστέρας (1 mmol, 178 mg, 200 mM), Oxone (4.6 mmol, 2.828 g) και AlCl_3 (6.4 mmol, 853 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (161 mg, 98%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.85 (s, 3H, OCH_3), 7.46 (dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, 2H, *ορθο*-H), 7.60 (dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz, 1H, *παρα*-H) και 8.03 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, *μετα*-H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 55.0, 128.7 (2C), 130.1 (2C), 130.7, 134.3, 164.6 και 183.3; HRMS (ESI-ion trap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$ 165.0473; Found 165.0546.

2-οξο-βουτ-3-εν-οϊκός τριτ-βουτυλο-εστέρας (8a)

3-οξο-πεντ-4-εν-οϊκός τριτ-βουτυλεστέρας (1 mmol, 170mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mgr) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 15 λεπτά. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 80:1). (78 mg, 50%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.51 (s, 9H, *t*-Bu), 6.00 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H) και 6.79 (dd, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 27.5, 86.4, 128.2, 133.2, 161.8 και 182.7; HRMS (ESI-ion trap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$ 157.0786; Found 157.0854.

2-οξο-4-φαινυλο-βουτ-3-εν-οϊκός αιθυλεστέρας (9a)

3-οξο-5-φαινυλο-πεντ-4-εν-οϊκός αιθυλεστέρας (1 mmol, 218 mg, 200 mM), Oxone (3.4 mmol, 2.090 g) και AlCl_3 (3 mmol, 400 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (200 mg, 98%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.40 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 7.18 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, $\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})$), 7.43 (m, 3H, 2 *μετα*-H και 1 *παρα*-H), 7.61 (m, 2 *ορθο*-H) και 7.91 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, $\text{PhCH}=\text{CH}$); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 13.8, 64.6, 117.2, 128.9, 129.1, 131.6, 133.8, 148.4, 163.5 και 183.1; HRMS (ESI-ion trap)

m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₁₂H₁₂O₃ 205.0786; Found 205.0854.

2-(οξυραν-2-υλ)-2-οξο-οξικός τριτ- βουτυλο- εστέρας (10a)

3-(οξυραν-2-υλ)-3-οξο-προπανοϊκός τρι- βουτυλο- εστέρας(0.56 mmol, 105 mg, 200 mM), Oxone (1.3 mmol, 798 mg) και AlCl₃ (1.2 mmol, 160 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 1.5 ώρες και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (146 mg, 85%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.55 (s, 9H, *t*-Bu), 3.04-3.11 (m, 2H) και 3.93-3.95 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 27.5, 49.0, 50.0, 87.2, 161.2 και 188.9.

2-οξο-προπανοϊκός αιθυλεστέρας (2a) από την οξειδωτική διάσπαση της ένωσης 11

α-χλωρο-ακετοξικός αιθυλεστέρας ,**11**, (1mmol, 130 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl₃ (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (114 mg, 98%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃) και 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 13.7, 23.4, 64.6, 163.3 και 191.3; HRMS (ESI-ion trap) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₅H₈O₃ 117.0473; Found 117.0542.

φαινυλο-προπαν-1,2-διόνη (12a)

1-φαινυλο-βουτανο-1,3-διόνη (1 mmol, 162 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl₃ (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (133 mg, 90%); ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 2.44 (s, 3H, CH₃), 7.46 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, *μετα*-H), 7.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, *παρα*-H) και 8.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, *ορθο*-H); ¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 24.9, 128.7 (2C), 130.6 (2C), 130.7, 134.5, 185.9 και 192.2; HRMS (ESI-ion trap) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₉H₈O₂ 149.0524; Found 149.0593.

1,2-διφαινυλο-αιθαν-1,2-διόνη (Benzil) (13a)

1,3-διφαινυλο-προπαν-1,3-διόνη (1 mmol, 224 mg, 200 mM), Oxone (3.4 mmol, 2.090 g) και AlCl₃ (4 mmol, 537 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες και δεν χρειάστηκε

περαιτέρω καθαρισμός. (208 mg, 98%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 7.40 (dd, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, 2H, *μετα*-H), 7.54 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, *παρα*-H) και 7.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, *ορθο*-H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 128.7 (4C), 130.5 (4C), 131.5 (2C), 134.2 (2C) και 185.3 (2C); HRMS (ESI-ion trap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$ 211.0681; Found 211.0751.

εξαν-3,4-διόνη (14a)

επταν-3,5-διόνη (1 mmol, 114 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 5 λεπτά και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (108 mg, 95%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_3) και 2.84 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 8.4 (2C), 30.3 (2C) και 197.4 (2C); HRMS (ESI-ion trap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$ 115.0681; Found 115.0752.

5-φαινυλο-πενταν-2,3-διόνη (15a)

6-φαινυλο-εξαν-2,4-διόνη (1 mmol, 190 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1.5 ώρες. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 15/1). (165 mg, 94%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 2.41 (s, 3H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.96-3.02 (m, 2H, PhCH_2), 3.11-3.18 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$) και 7.19-7.25 (m, 5H, *αρωματικά*-H); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 24.3, 30.2, 38.7, 126.5, 128.4 (2C), 128.6 (2C), 139.8, 195.4 και 199.1.

κυκλοπενταν-1,2-διόνη (16a)

κυκλοεξαν-1,3-διόνη (1 mmol, 112 mg, 200 mM), Oxone (2.1 mmol, 1.291 g) και AlCl_3 (2.3 mmol, 306 mg) χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1.5 ώρες και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός. (95 mg, 97%); ^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 2.00 (quintet, 2H, CH_2) και 2.47 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$); ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 19.6, 32.9 (2C) και 178.7 (2C); HRMS (ESI-ion trap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ 99.0368; Found 99.0440.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Β΄ ΜΕΡΟΥΣ

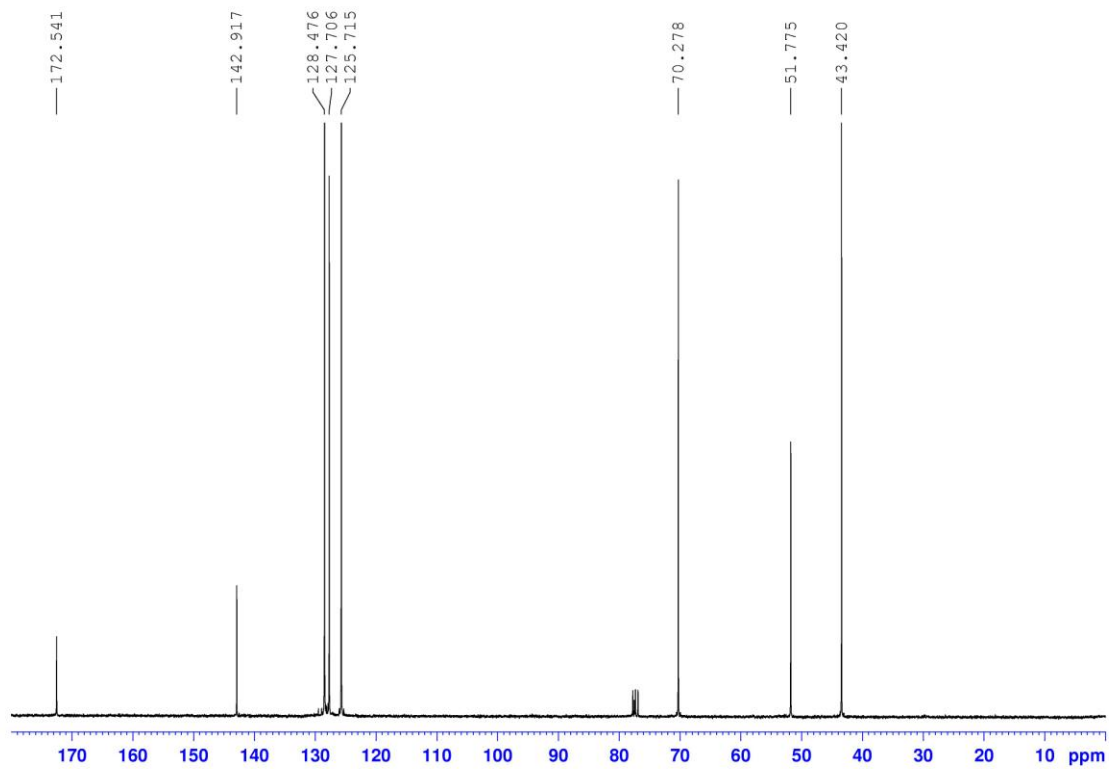
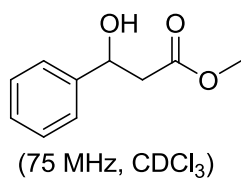
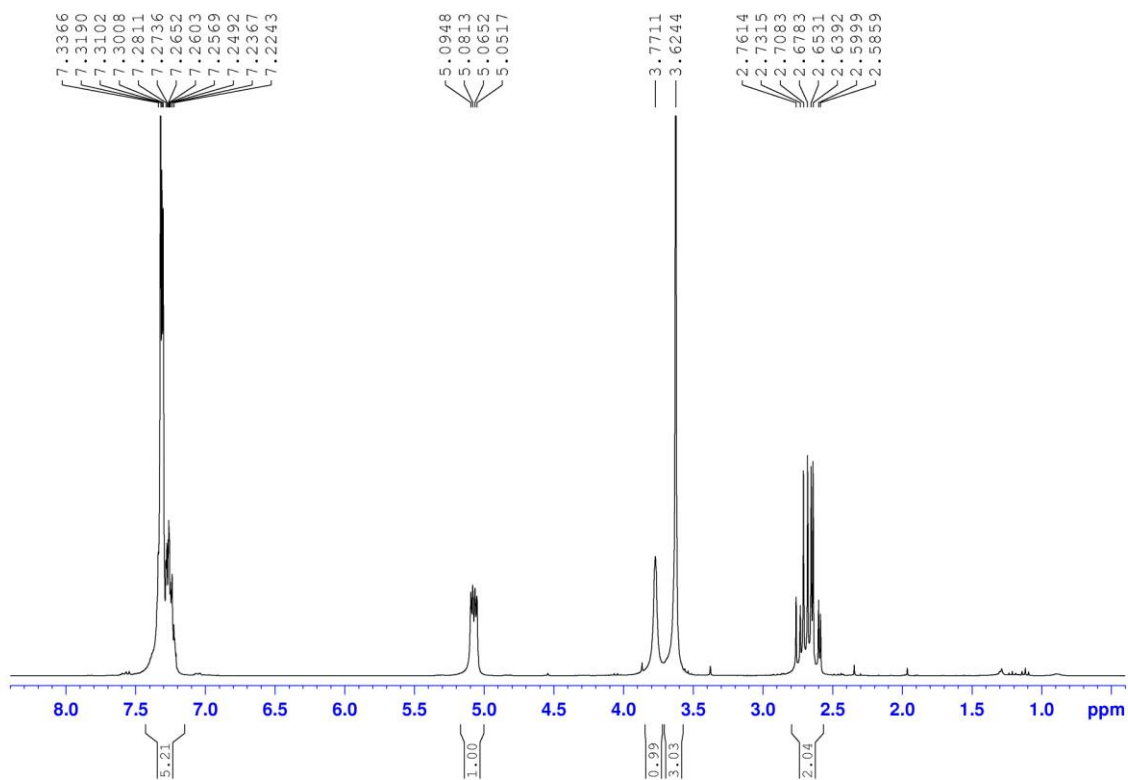
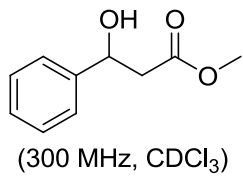
- (1) Crich, D.; Pavlovic, A. B.; Wink, D. J. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 359-377; (b) Méndez-Andino, J.; Paquette, L. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1263-1265; (c) Balskus, E. P.; Mendez-Andino, J.; Arbit, R. M.; Paquette, L. A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6695-6704; (d) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo M.; Giovannini, P. P.; Venturi, V.; Pacifico, S.; Massi, A. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8110-8115.
- (2) Khurana, J. M.; Sharma, P.; Gogia, A.; Kandpal, B. M. *Organic Preparations and Procedures* **2007**, *39*, 185-202.
- (3) Khan, F. A.; Dash, J.; Sudheer, Ch. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2507-2519.
- (4) (a) Hayakawa, R.; Sahara, T.; Shimizu, M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7939-7942; (b) Sinisterra, J.-V.; Molinary, F.; Alcántara, A.-R.; Domínguez De Maria, P. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 288-299; (c) Giovannini, P. P.; Fantin, G.; Massi, A.; Venturi, V.; Pedrini, P. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8038-8045.
- (5) Cabrera, A.; Sharma, B. P.; Ayala, M.; Rubio-Perez, L.; Amézquita-Valencia, M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6758-6762.
- (6) (a) Matsushita Electric Industrial Co. Ltd. Patent JP56098203, *Chem. Abstr.* **1981**, *95*, 188163; (b) Corrales, T.; Catalina, F.; Peinado, C.; Allen, N. S. *J. Photochem. Photobiol. A* **2003**, *159*, 103; (c) Husár, B.; Commereuc, S.; Lukáč, I.; Chmela, Š.; Nedelec, J. M.; Baba, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5315.
- (7) (a) Weiss, M.; Appel, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3666-3667; (b) McKillop, A.; Swann, B. P.; Ford, M. E.; Taylor, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3641-3645; (c) Bauer, D. P.; Macomber, R. S. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1990-1992; (d) Cofré, P.; Ross, B.; Sobbkowiak, A.; Sawyer, D. T.; Kanofsky, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1936-1942; (e) Khurana, J. M.; Kandpal, B. M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4909-4912; (f) Jain, S. L.; Sharma, V. B.; Sain, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1233-1235; (g) Antoniotti, S.; Duñach, E. *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2004**, *28*, 135-145; (h) Stepovic, L. P.; Gulenova, M. V.; Kalacheva, I. A.; Potkina, A. Yu. *Russian Journal of General Chemistry* **2011**, *81*, 550-558; (i) Taydakov, I. V.; Nelyubina, Y. V. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1704-1706.
- (8) (a) Wolfe, S.; Ingold, C.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7755-7757; (b) Tymonko, S. A.; Nattier, B. A.; Mohan, R. S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7657-7659; (c) Che, C. M.; Yu, W.-Y.; Chan, P.-M.; Cheng, W.-C.; Peng, S.-

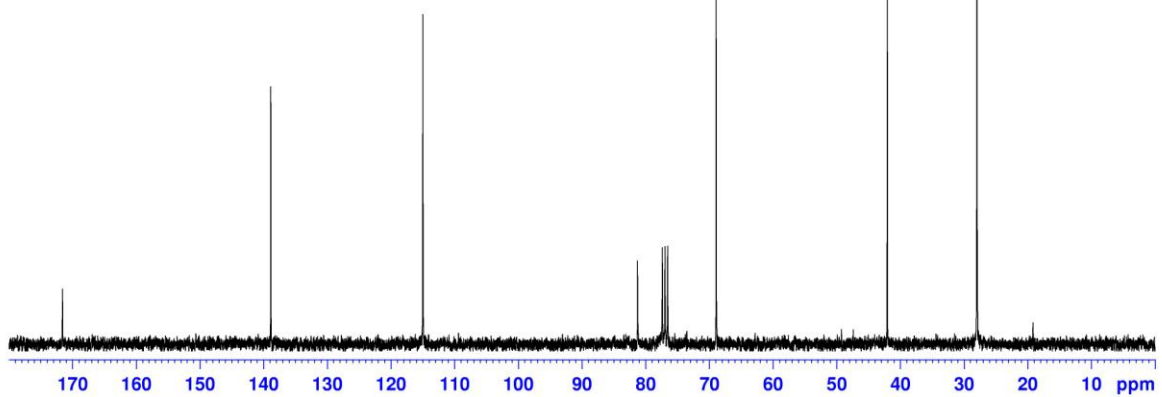
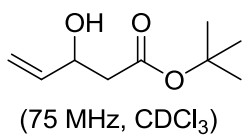
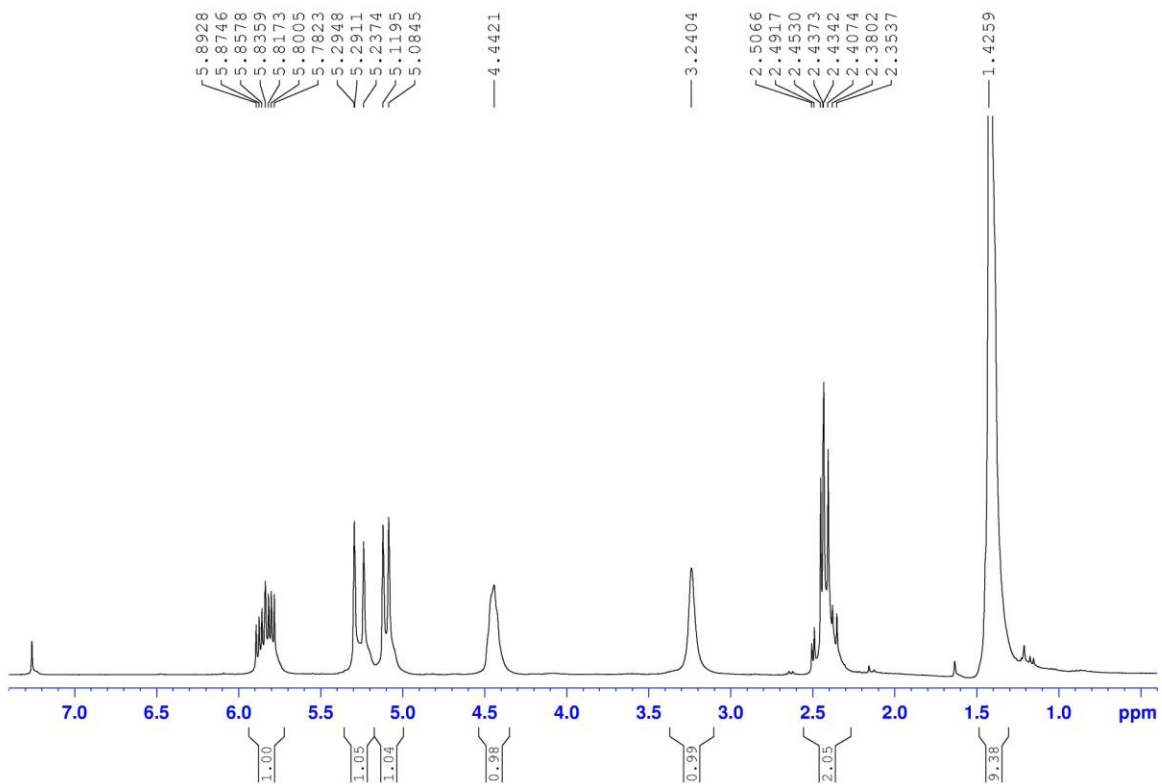
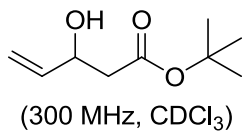
- M., Lau, K.-C.; Li, W.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11380-11392; (d) Lee, J. C.; Park, H.-J.; Park, J.Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5661-5663; (e) Paleo, M. R.; Calaza, M. I.; Graña, P.; Sardina, F.J. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1061-1063; (f) Antoniotti, S.; Duñach, E. *J. Mol. Catal. A: Chem* **2004**, *208*, 135-145; (g) Katritzky, A.-R.; Zhang, D.; Kirichenko, K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3271-3274; (h) Mecinović, J.; Hamed, R. B.; Schofield, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2796-2800; (i) Shimakawa, Y.; Morikawa, T.; Sakaguchi, S. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1786-1789; (j) Eddy, N. A.; Kelly, C. B.; Mercadante, M. A.; Leadbeater, N.E.; Fenteany, G. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 498-501.
- (9) (a) Yusubov, M. S.; Zholobova, G. A.; Vasilevsky, S. F.; Tretyakov, E. V.; Knight, D. W. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 1607-1610; (b) Wan, Z.; Jones, C. D.; Mitchell, D.; Pu, J. Y.; Zhang, T. Y. *J. Org. Chem* **2006**, *71*, 826-828; (c) Chen, M.; Zhao, Q.; She, D.-B.; Yang, M.-Y.; Hui, H.-H.; Huang, G.-S. *J. Chem. Sci.* **2008**, *119*, 347-351; (d) Ren, W.; Xia, Y.; Ji, S.-J.; Zhang, Y.; Wan, X.; Zhao, J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1841-1844; (e) Baranac-Stojanović, M.; Marković, R.; Stojanović, M.; *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8000-8008; (f) Gao, A.; Yang, F.; Li, L.; Wu, Y. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4950-4954.
- (10) (a) Saikia, P.; Laskar, D.-D.; Praiapararat, D.; Sandhu, J. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7525-7526; (b) Kobayashi, S.; Miyamura, H.; Akiyama, R.; Ishida, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9251-9254.
- (11) Wong, M. K.; Yu, C.-W.; Yuen, W.-H.; Yang, D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3606-3609.
- (12) Yuan, Y.; Zhu, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2*, 329-333.
- (13) Tada, N.; Shomura, M.; Nakayama, H.; Miura, T.; Itoh, A. *Synlett* **2010**, *13*, 1979-1983.
- (14) Nobuta, T.; Tada, N.; Hattori, K.; Hirashima, S.; Miura, T.; Itoh A. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 875-877.
- (15) Huang, L.; Cheng, K.; Yao, B.; Xie, Y.; Zhang, Y. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5732-5737.
- (16) (a) Curini, M.; Epifano, F.; Marcotullio, M. C.; Rosati, O. *Synlett*, **1999**, *6*, 777-779; (b) Travis, B. R.; Sivakumar, M. Hollist, G. O.; Borhan, B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1031-1034; (c) Yan, J.; Travis, B. R.; Borhan, B. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9299-9302; (d) Priewisch, B.; Rück-Braun, K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*,

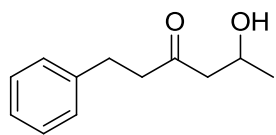
- 2350-2352; (e) Desai, L. V.; Malik, H. A.; Sanford, M. S. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1141-1144; (f) Sun, J.; Li, X.; Feng, J.; Tian, X. *Water Res.* **2009**, *43*, 4363-4369; (g) Wang, Y. R.; Chu, W. *Water Res.* **2011**, *45*, 3883-3889; (h) Cui, L.-Q.; Liu, K.; Zhang, C. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2258-2265.
- (17) Wu, S.; Ma, H.; Lei, Z. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8641-8647.
- (18)(a) Shaw, H. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1995**, *34*, 3761-3765; (b) Bohé, L.; Kammoun, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 747-751; (c) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Mari, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3831-3833; (d) Shu, H.-Y.; Perlmutter, D.; Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Mari, L. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4482-4490.
- (19) Zibuck, R.; Streider, J. *Org. Synth.* **1998**, *Coll. Vol. 9*, 432.
- (20)(a) Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Chemische Berichte* **1954**, *87*, 1318-1330; (b) Wittig, G.; Haag, W. *Chem. Ber.* **1955**, *88*, 1654-1666.
- (21) Kim, J.; Jung, S.; Park, S.; Park, S. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2866-2868.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄ ΜΕΡΟΥΣ

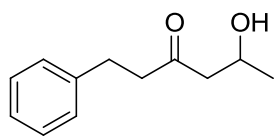
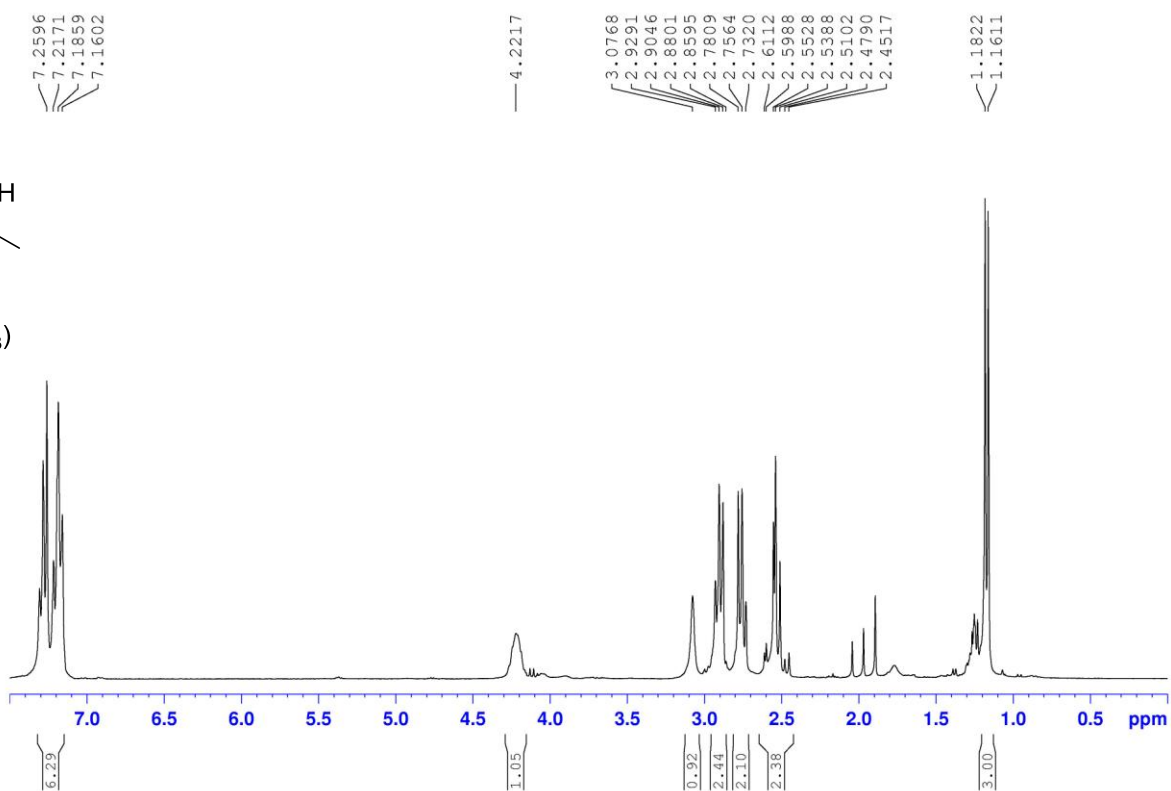
ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR ΚΑΙ ^{13}C NMR



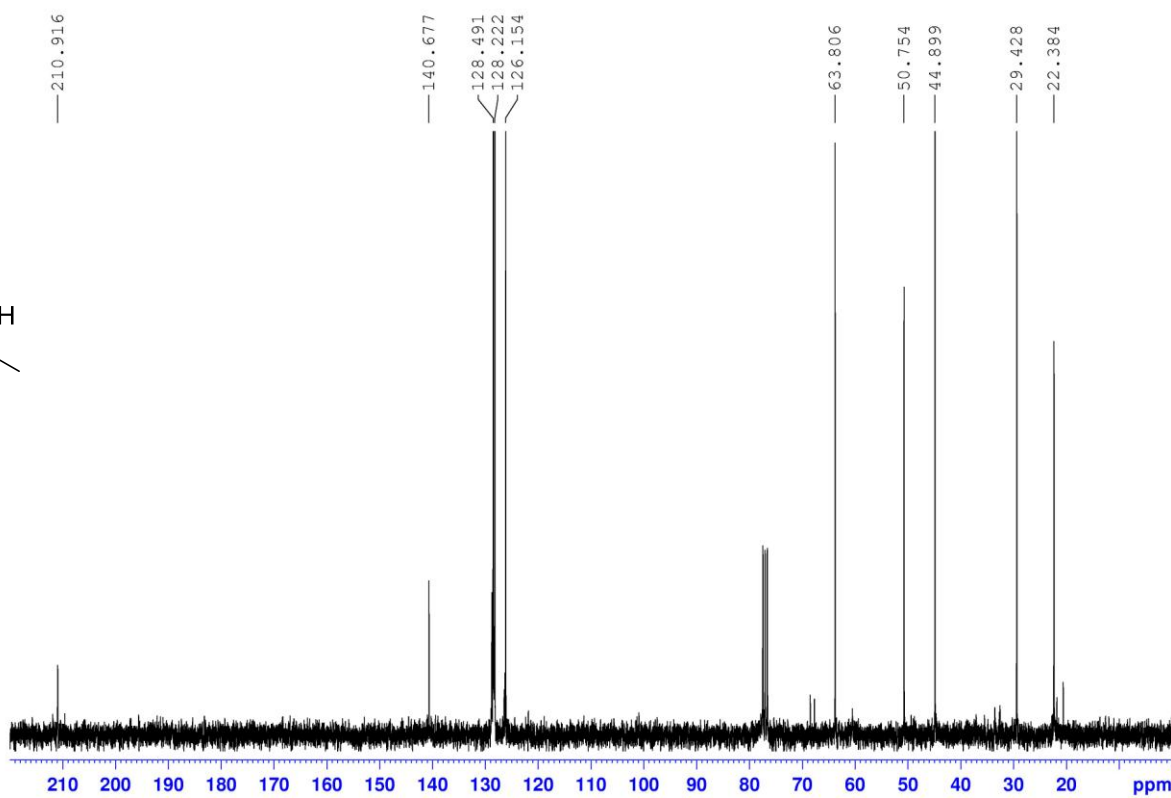


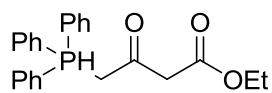


(300 MHz, CDCl₃)

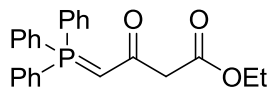
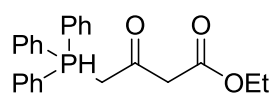
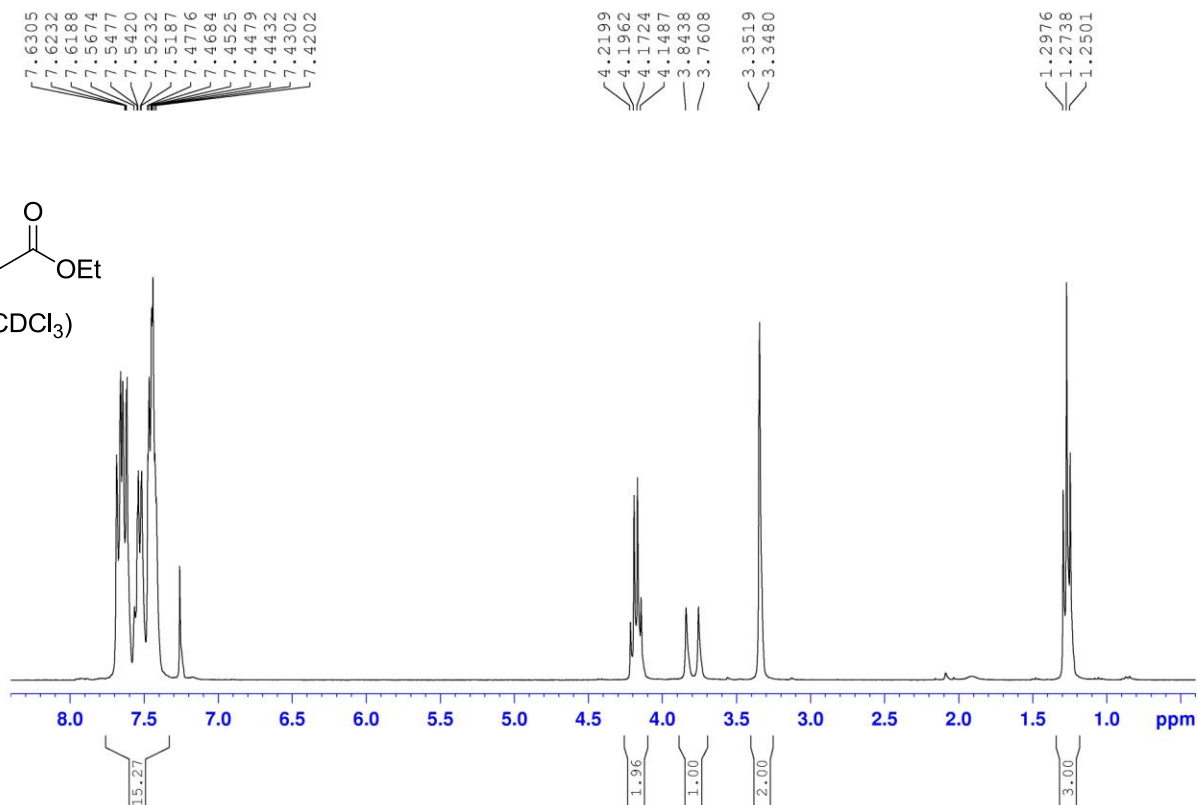


(75 MHz, CDCl₃)

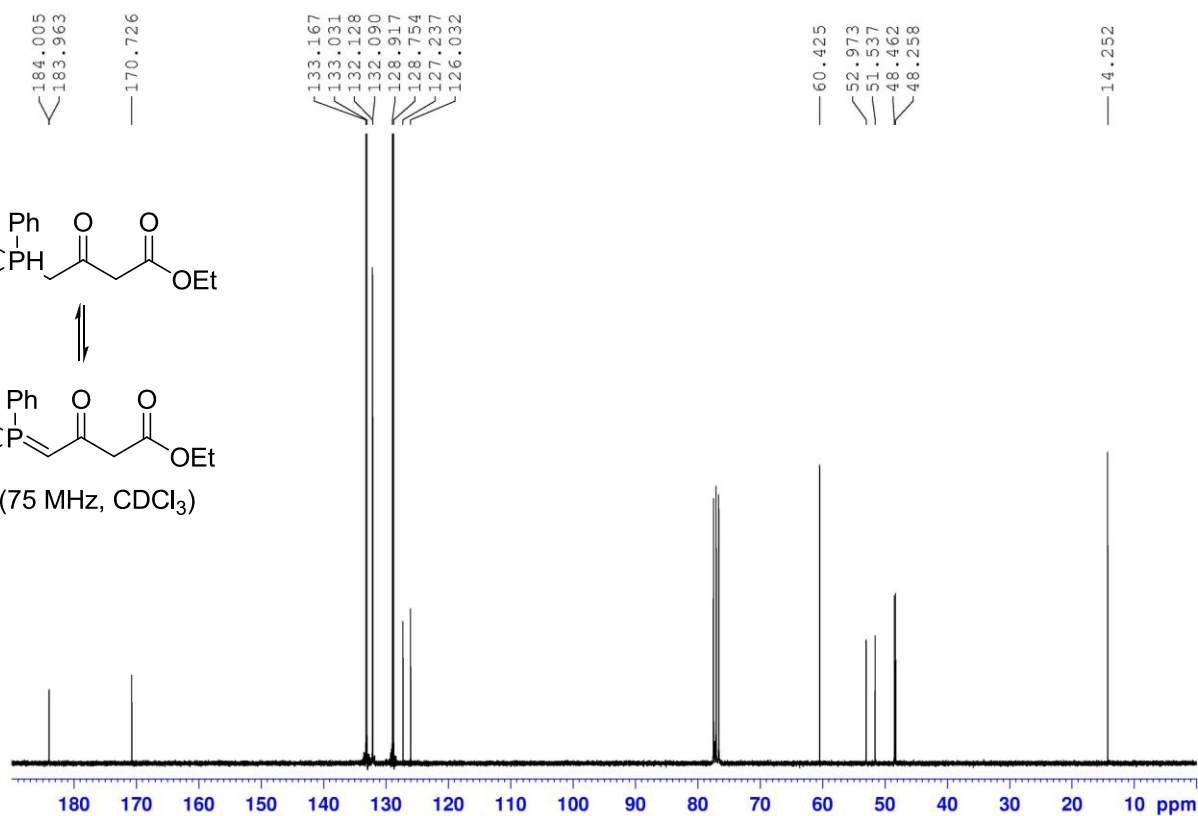


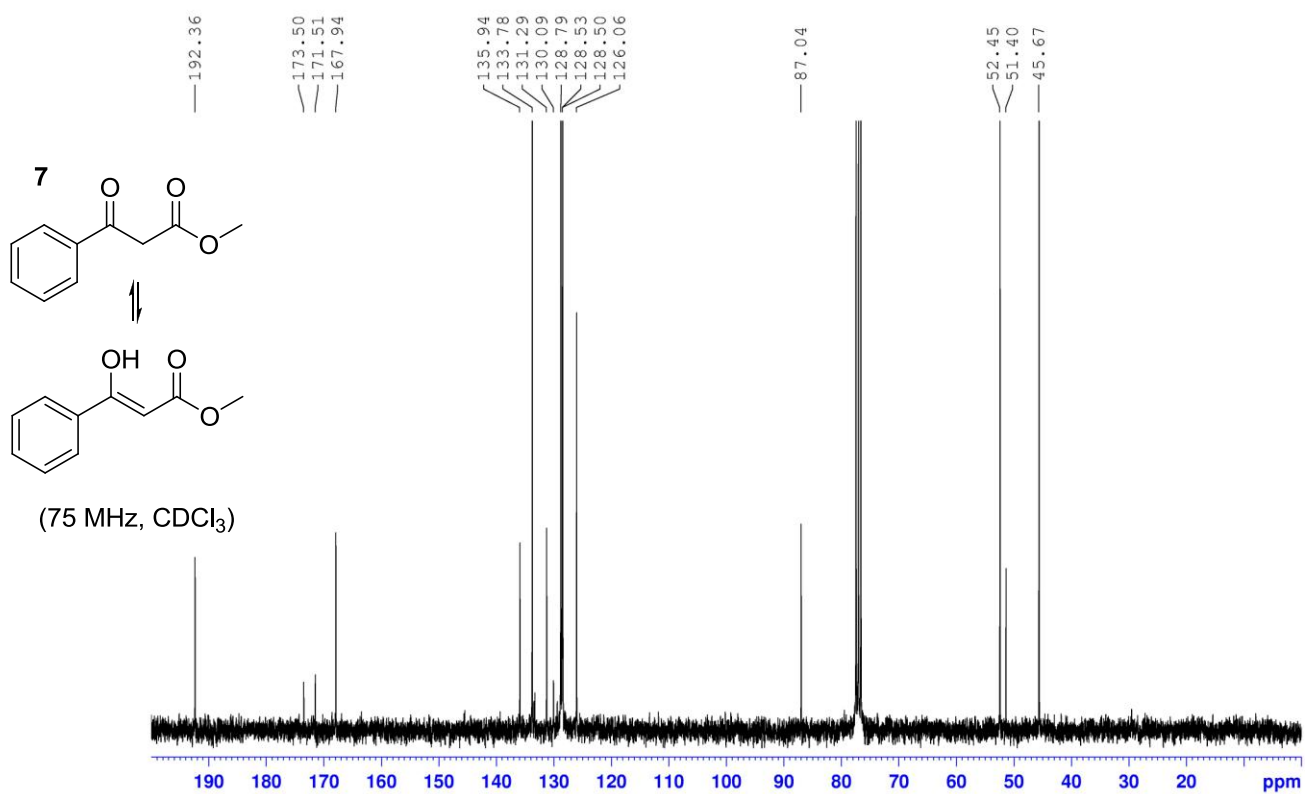
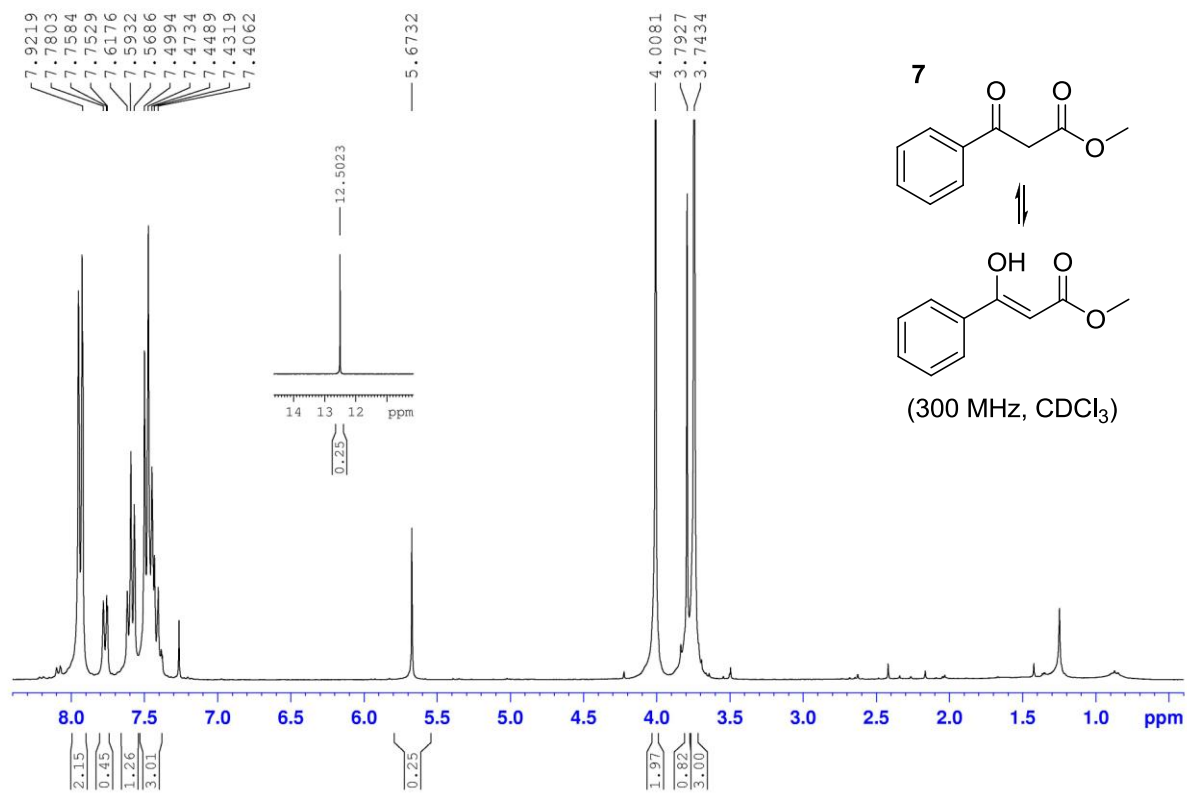


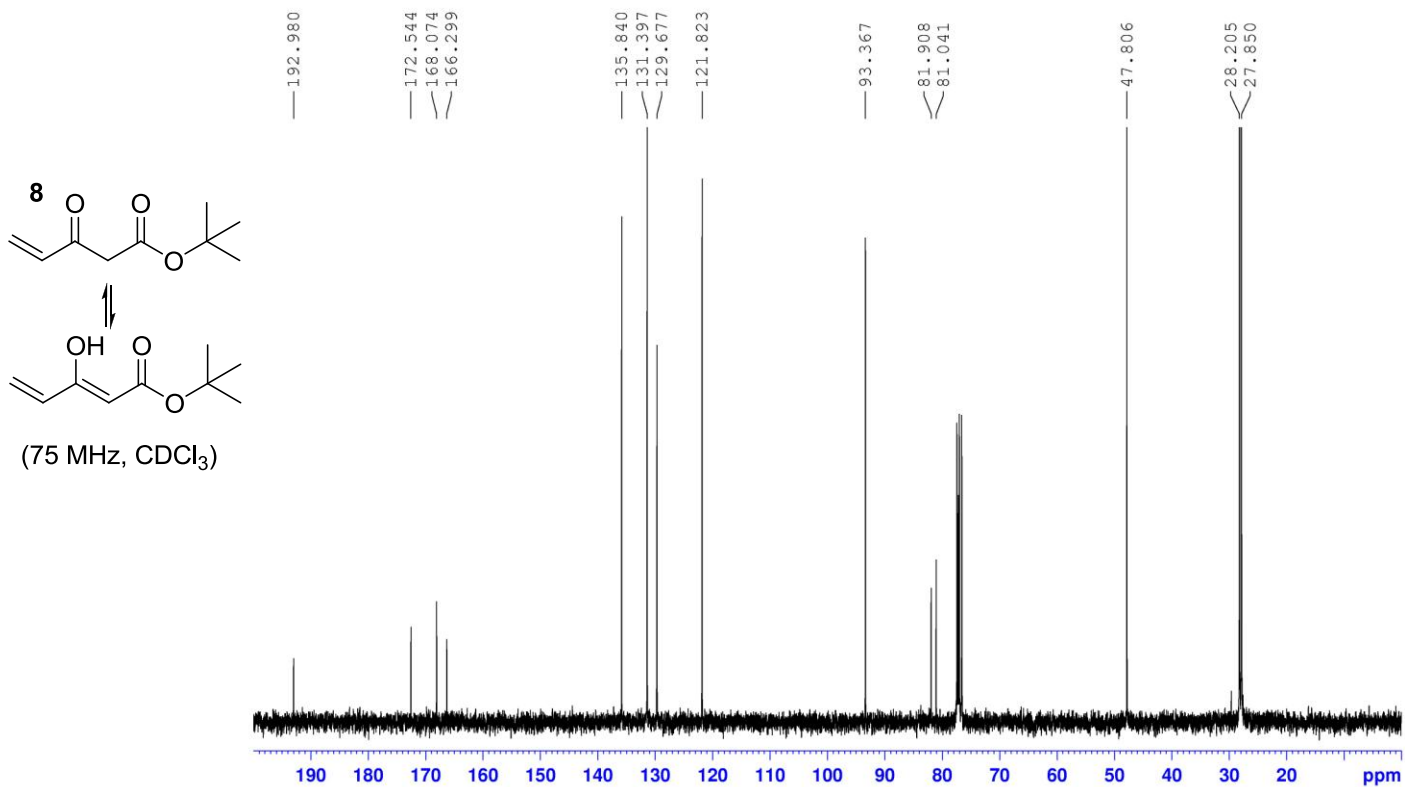
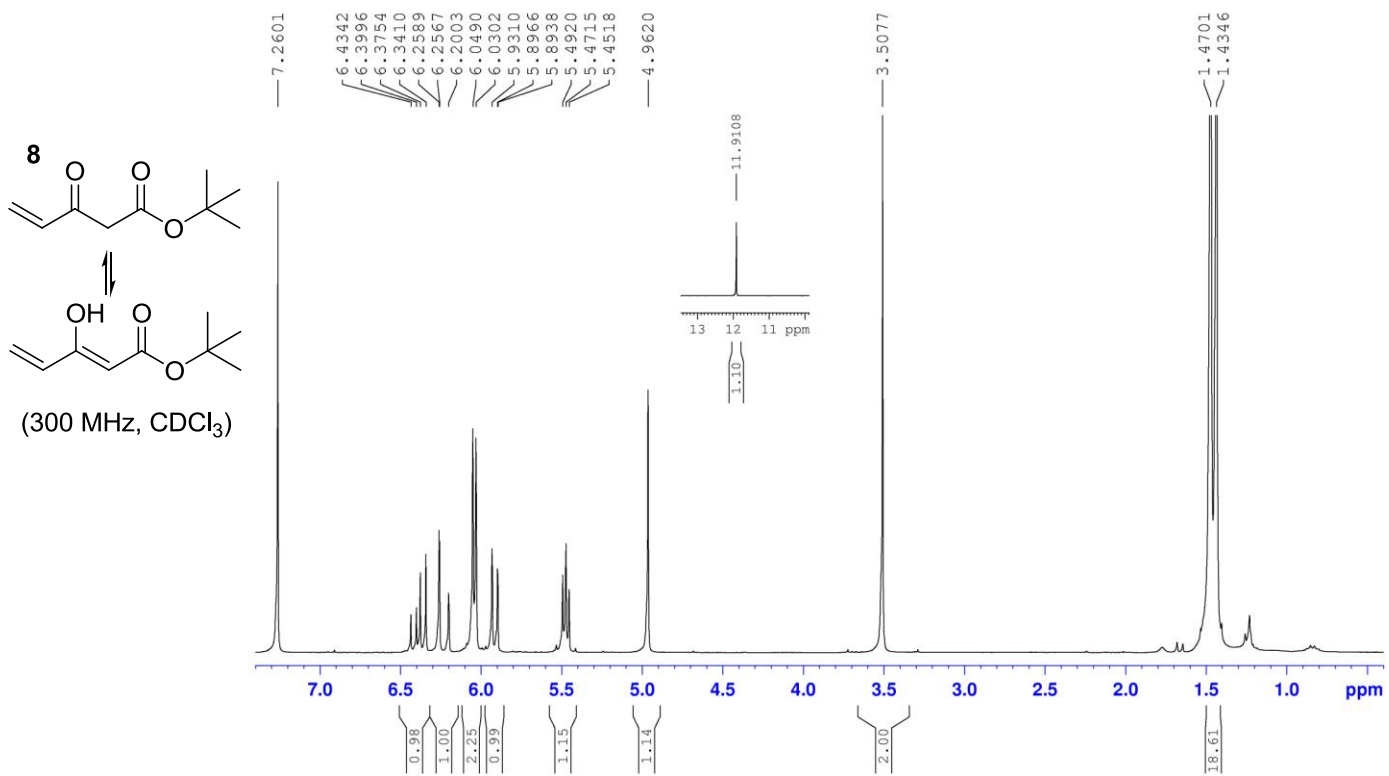
(300 MHz, CDCl₃)

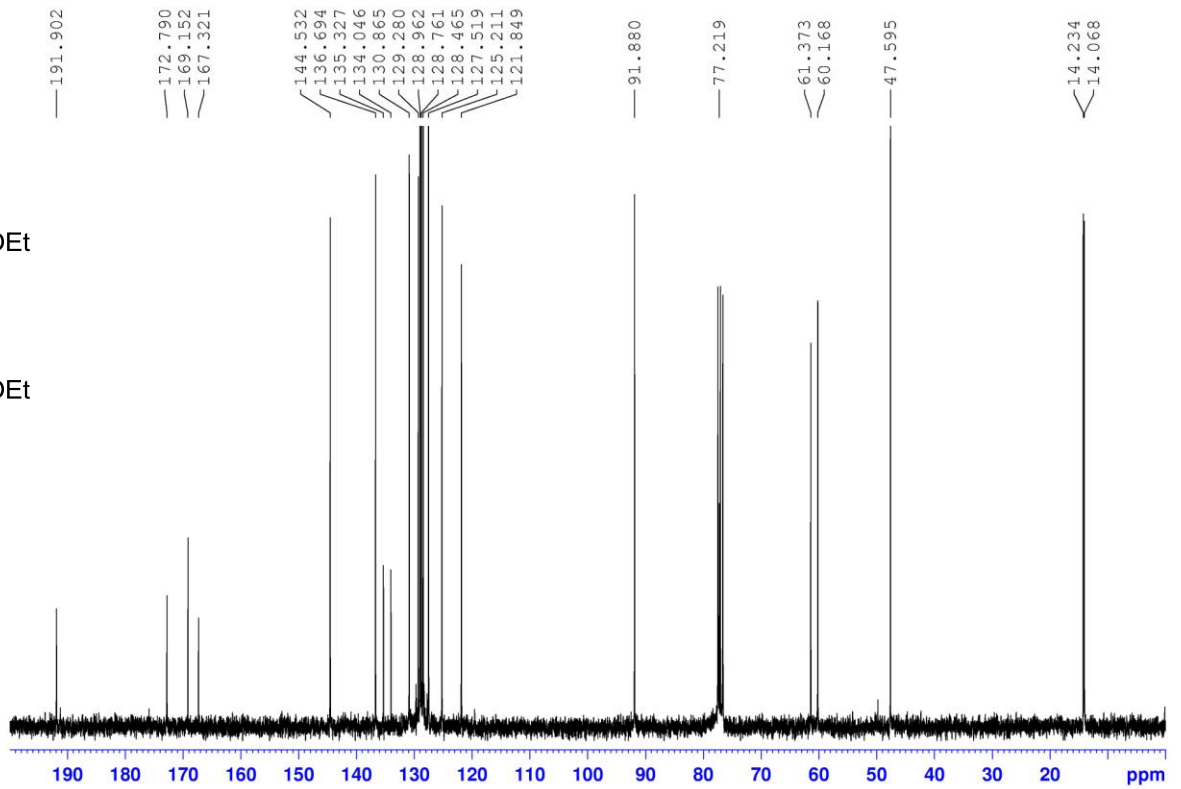
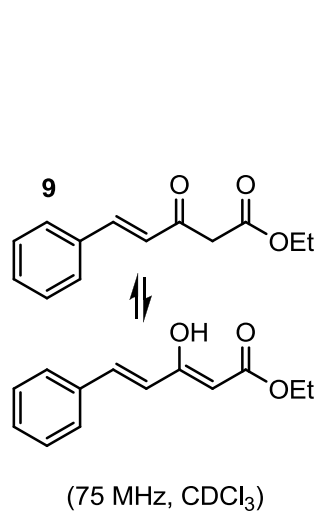
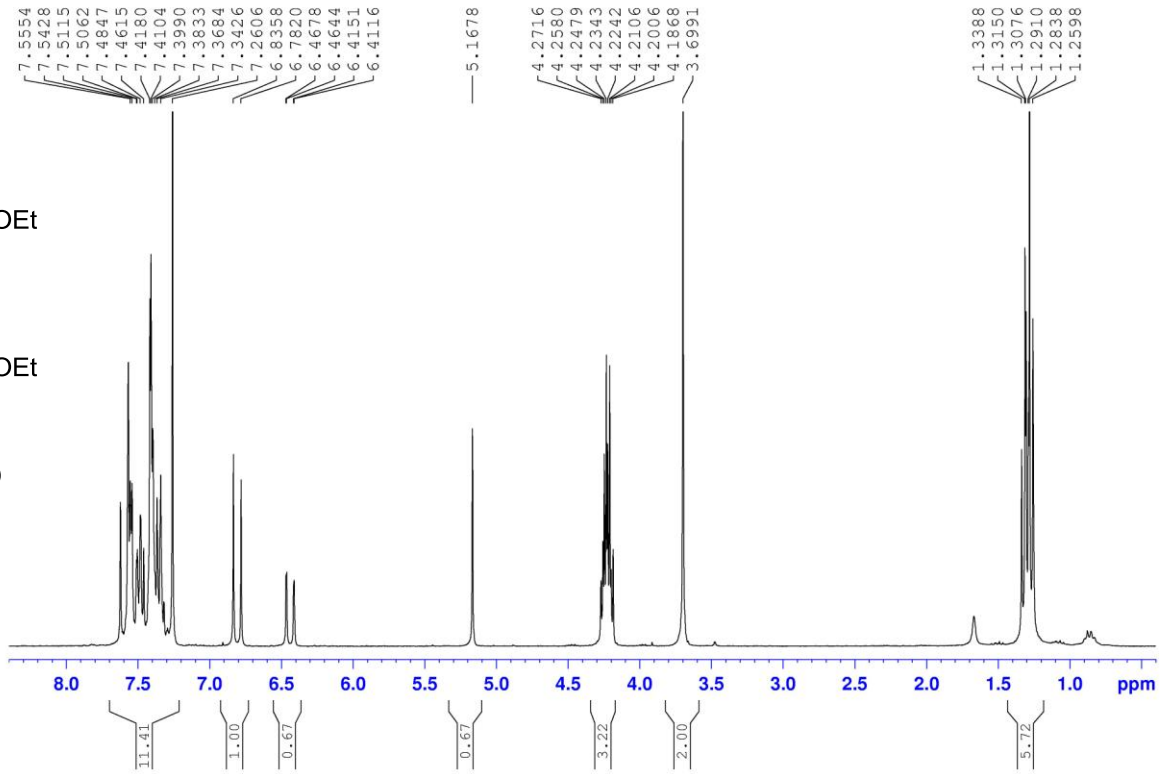
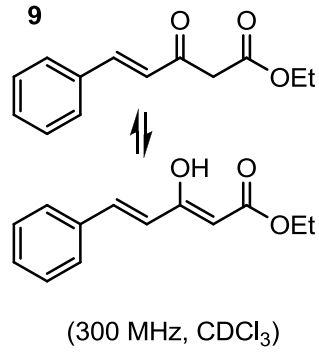


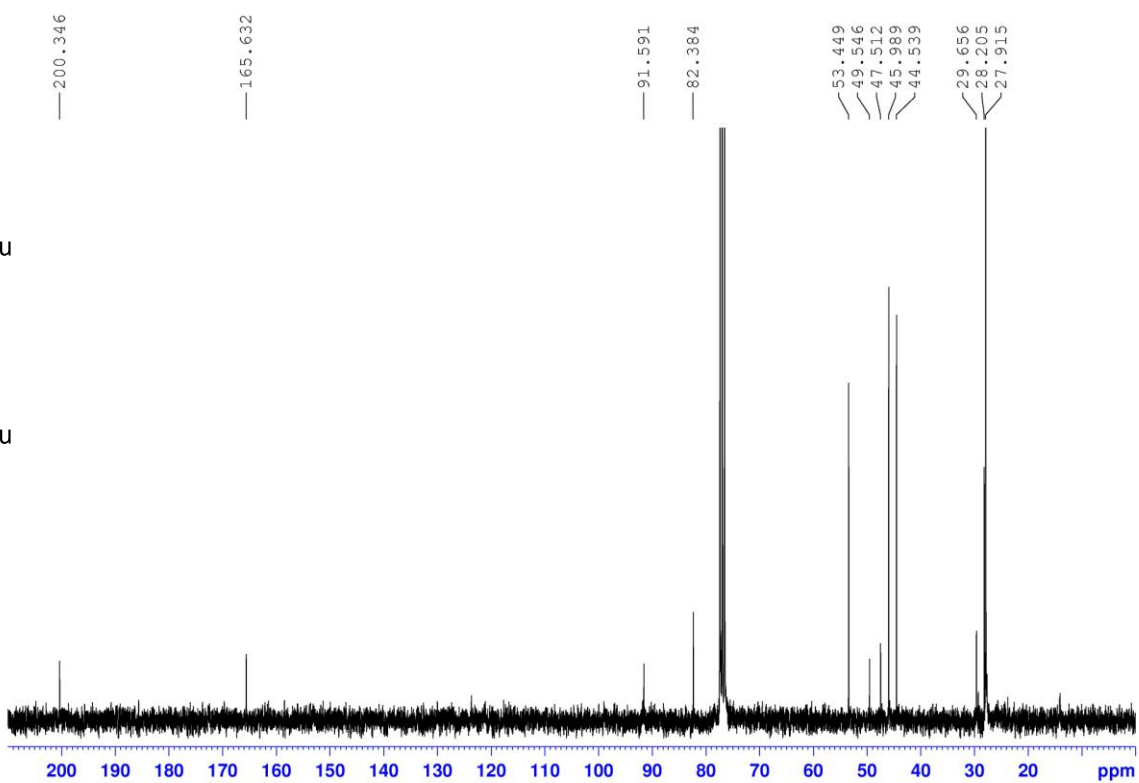
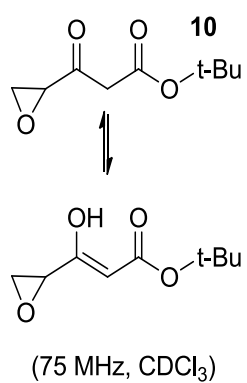
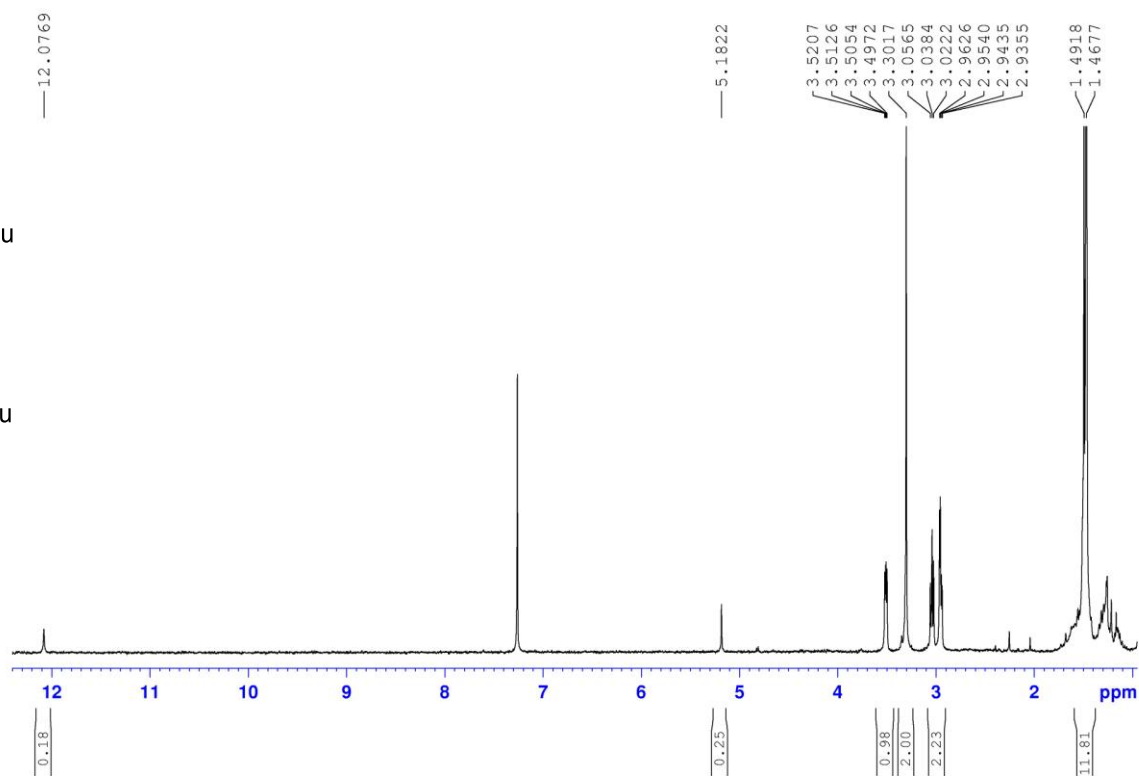
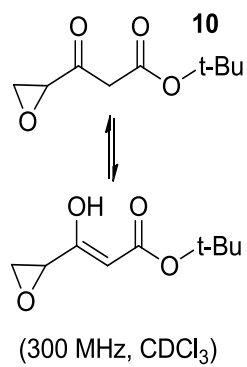
(75 MHz, CDCl₃)

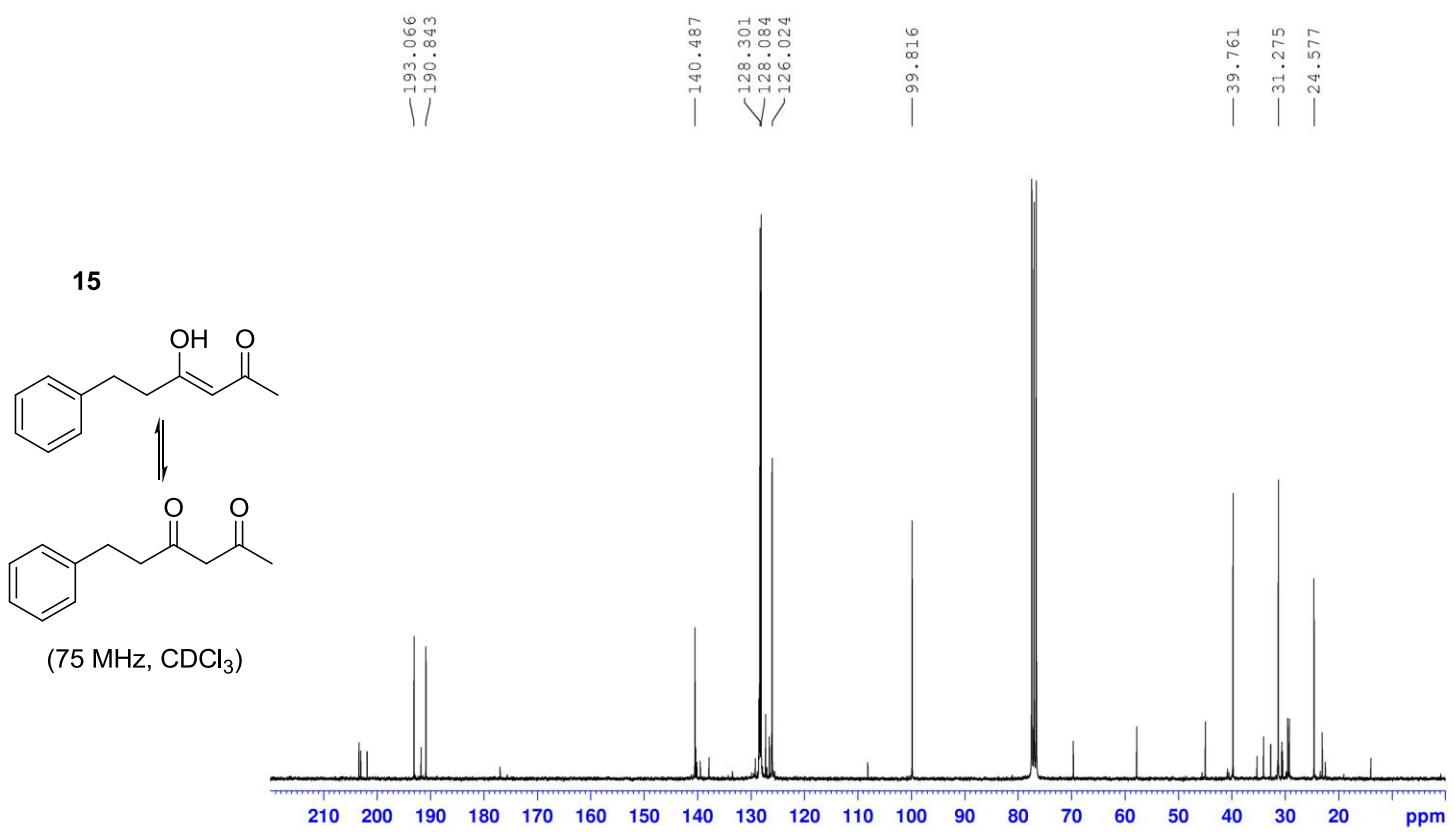
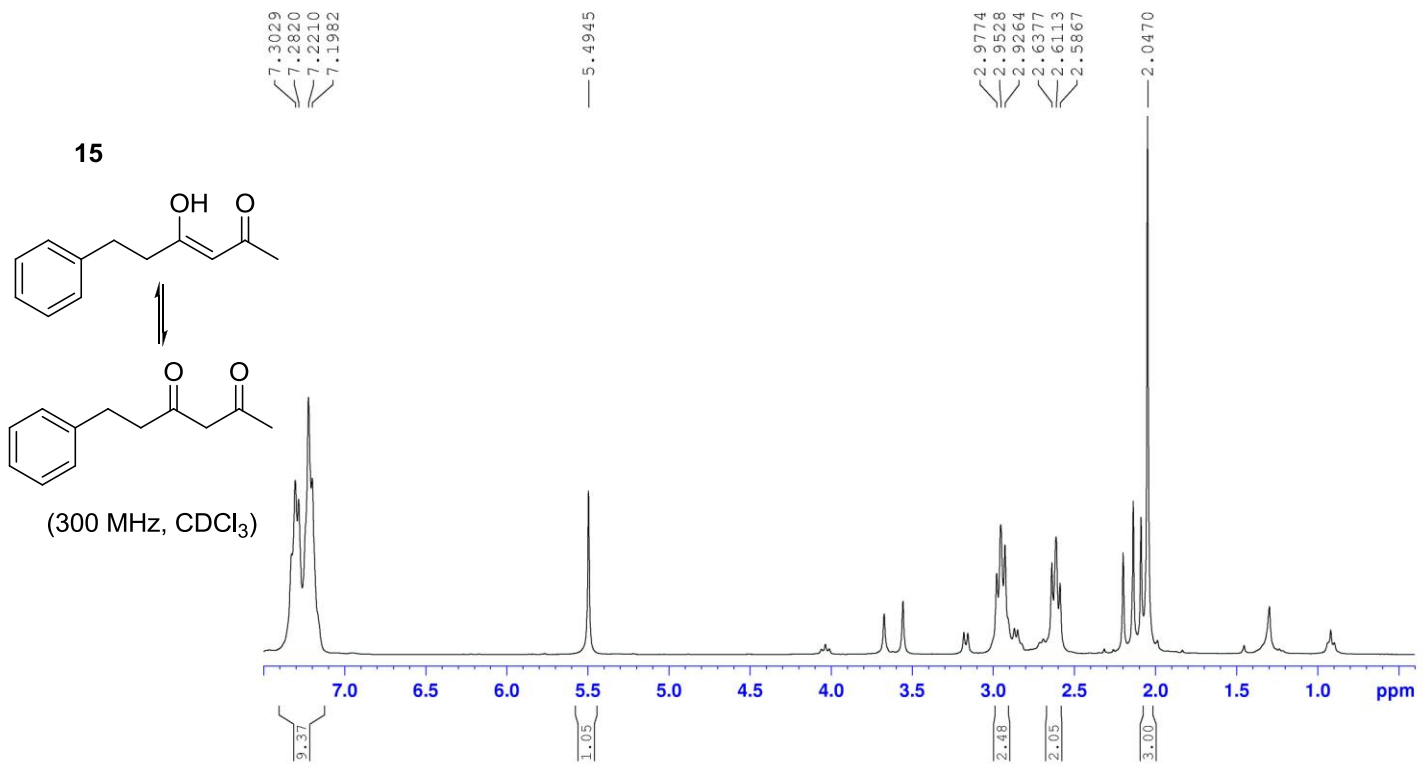


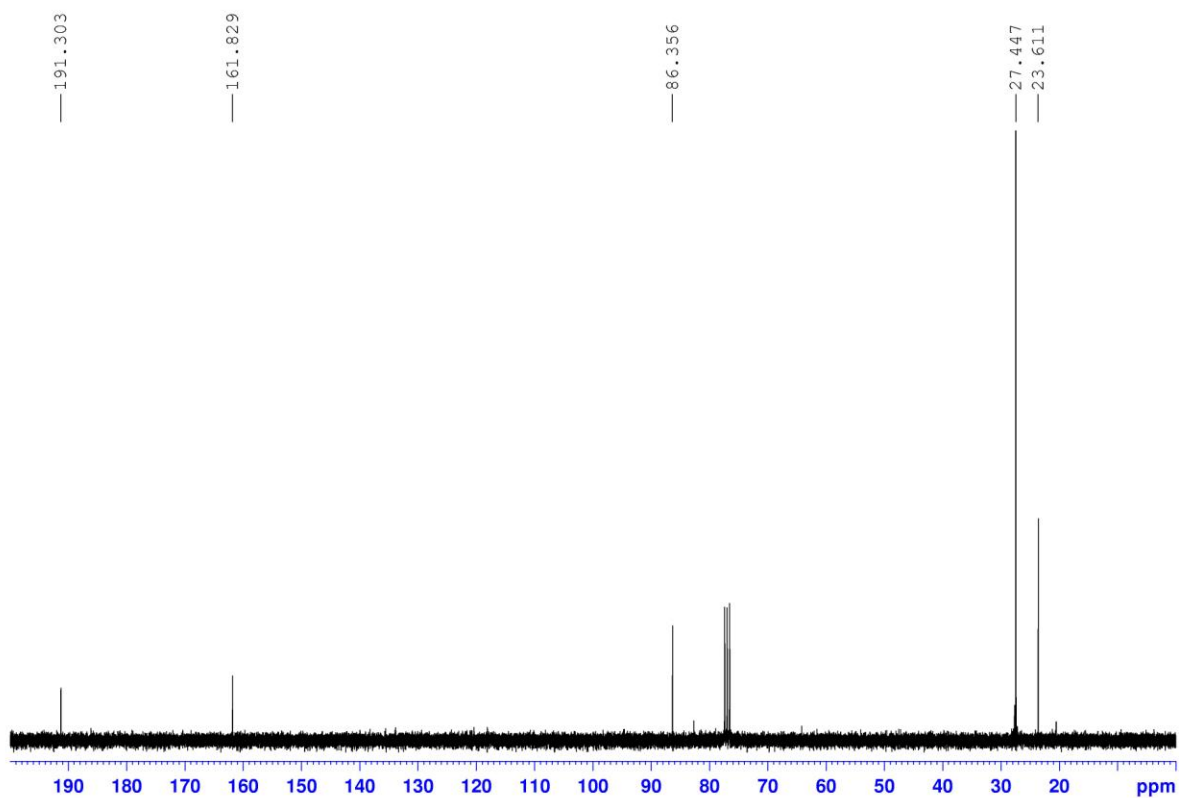
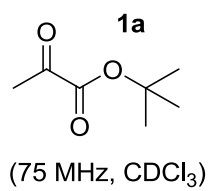
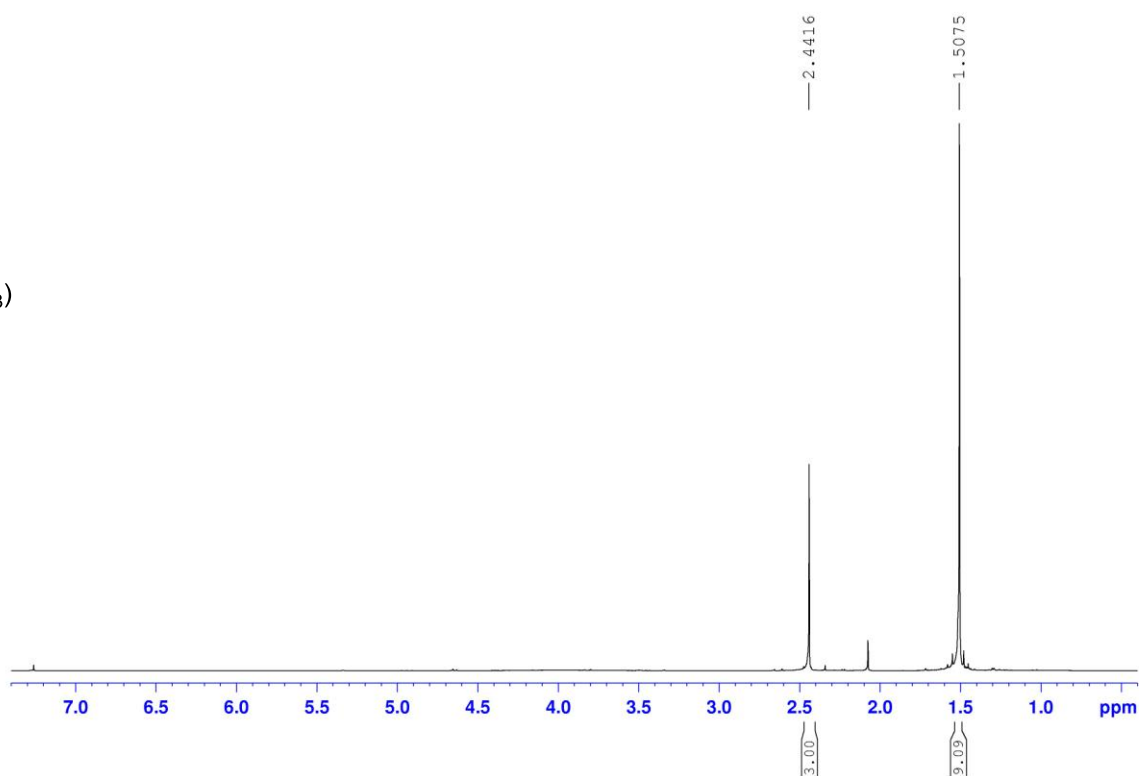
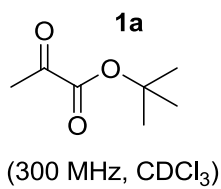


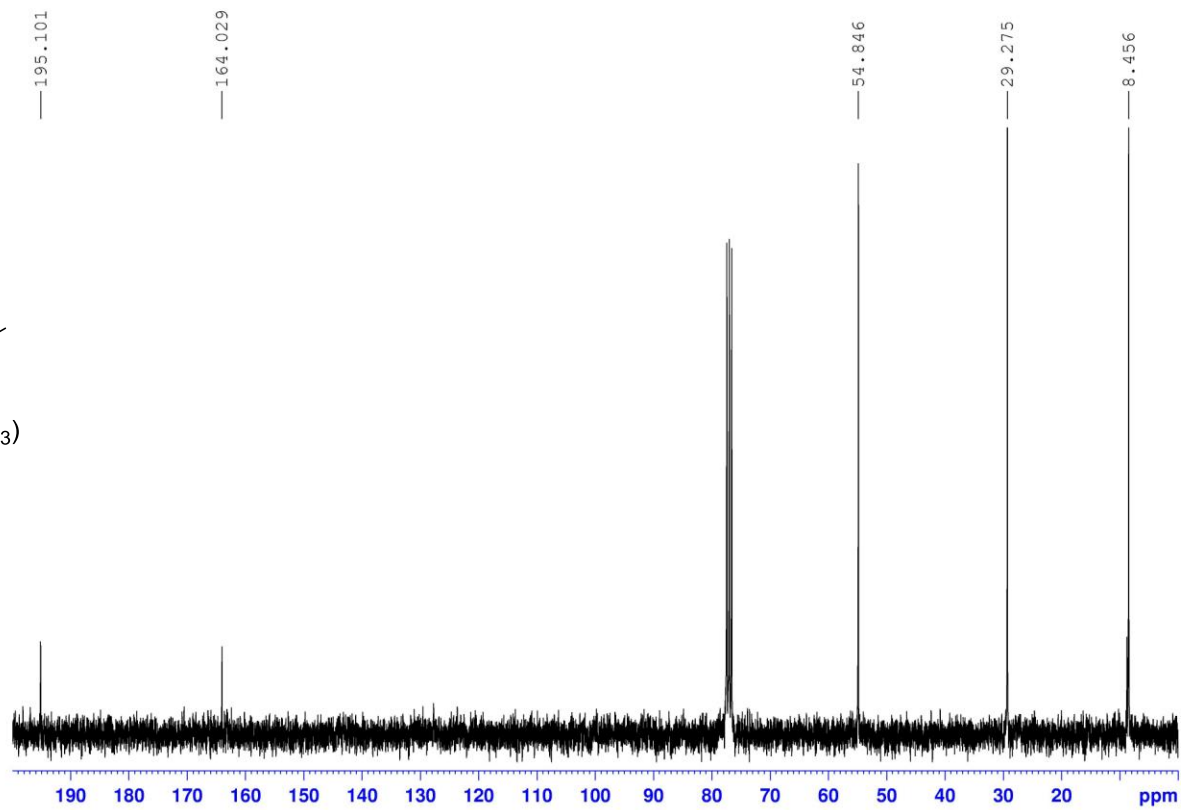
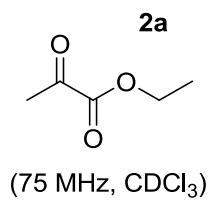
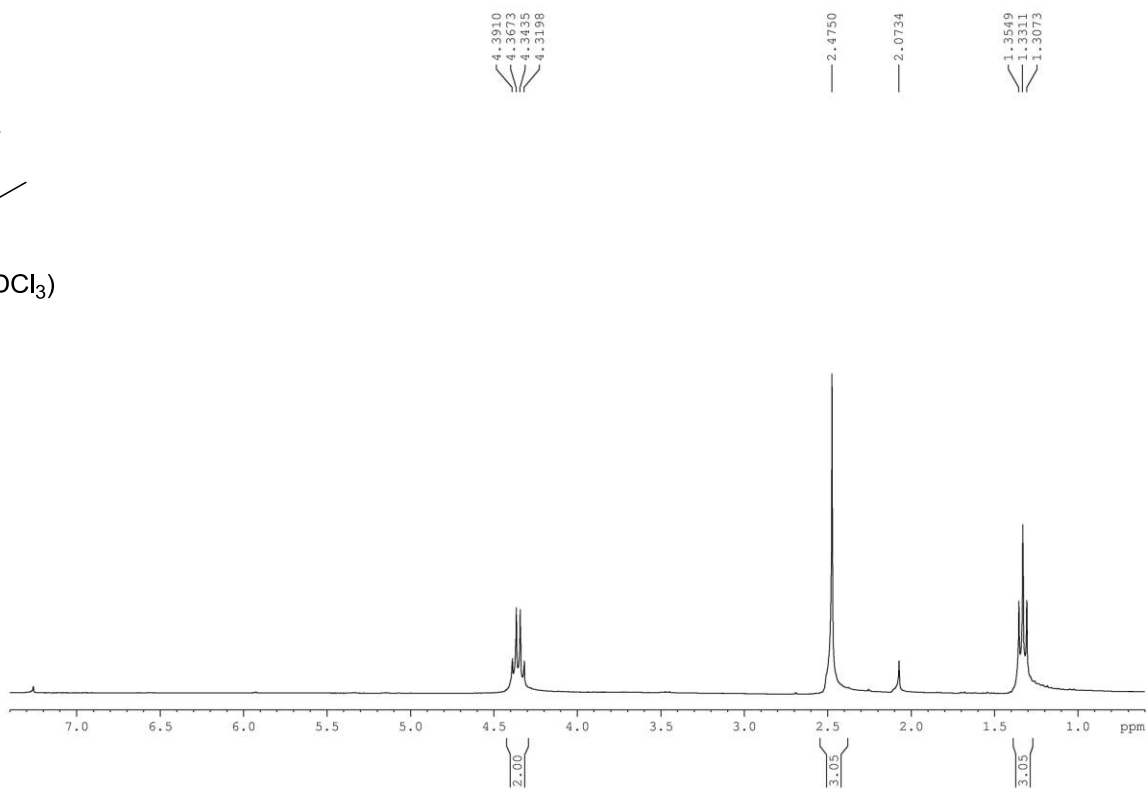
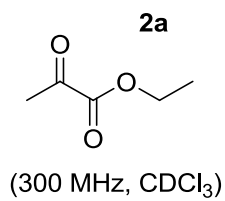


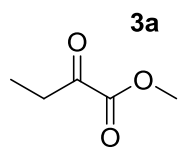




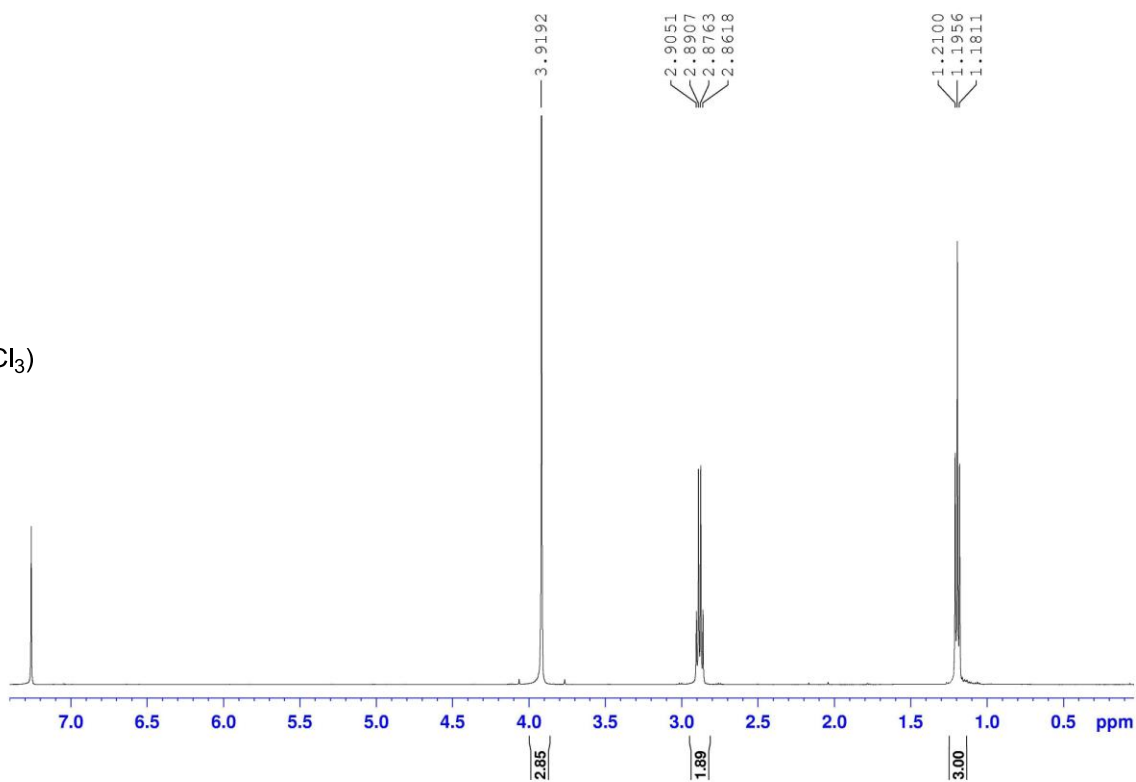








(500 MHz, CDCl₃)



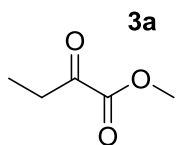
—195.101

—164.029

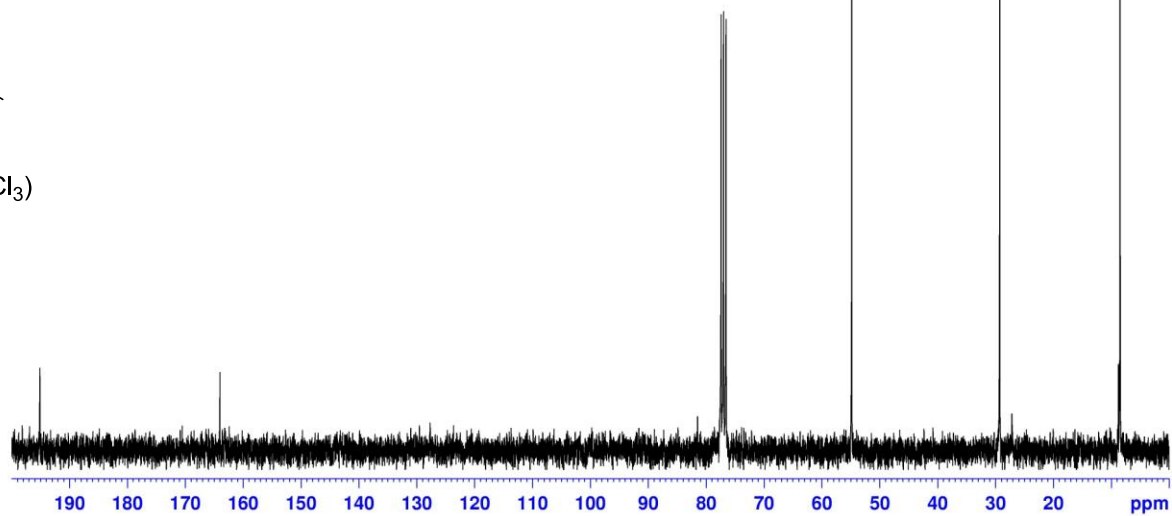
—54.846

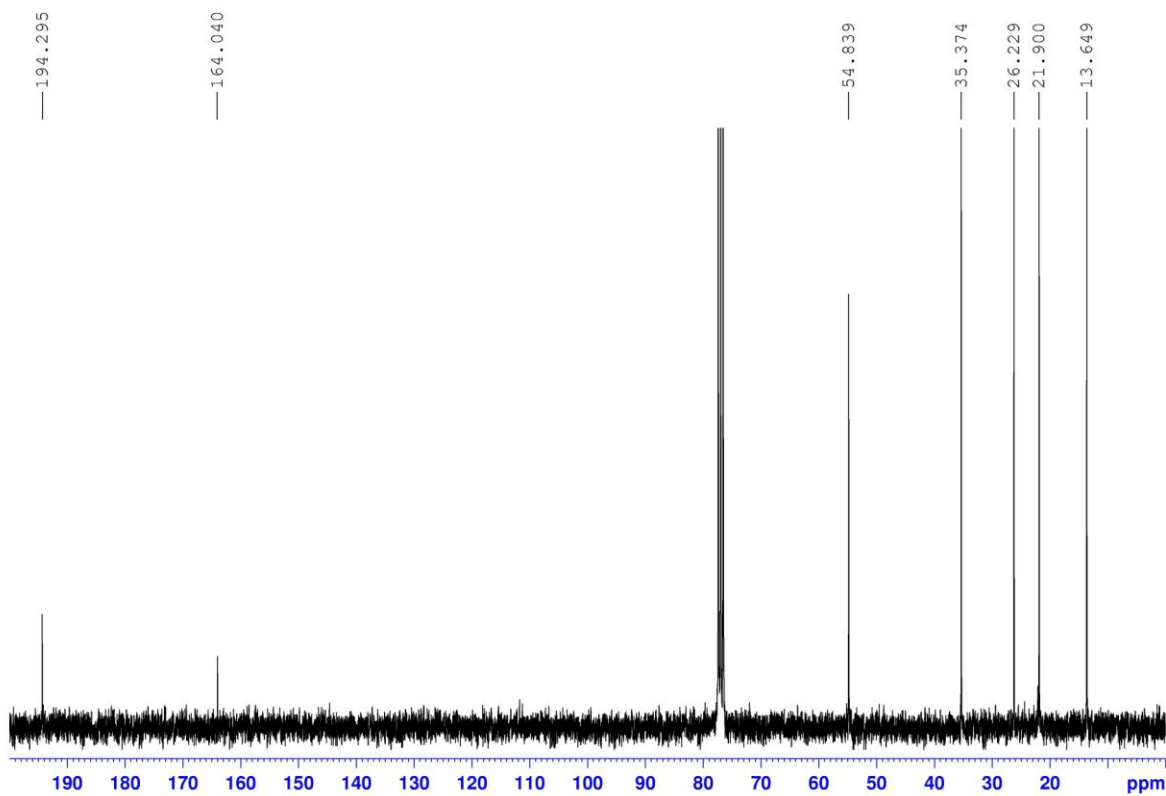
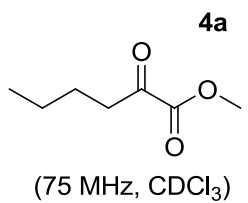
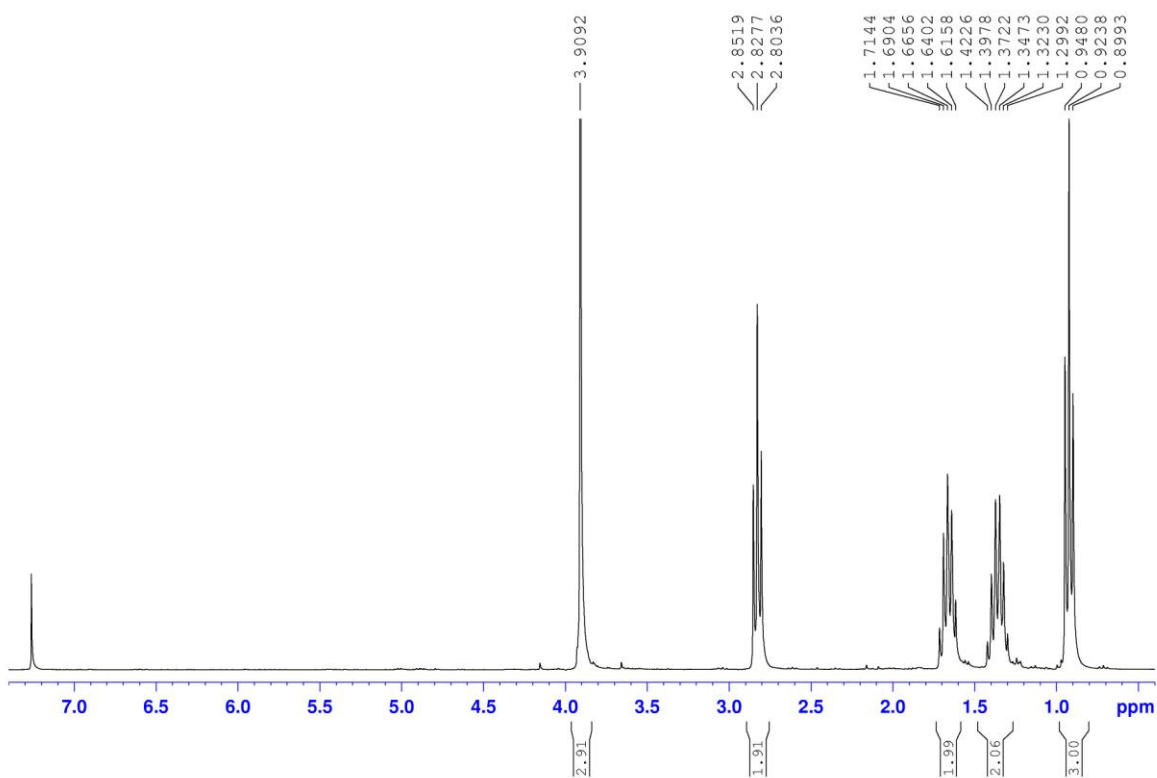
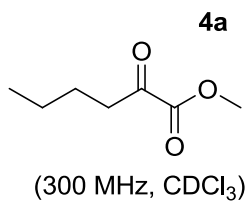
—29.275

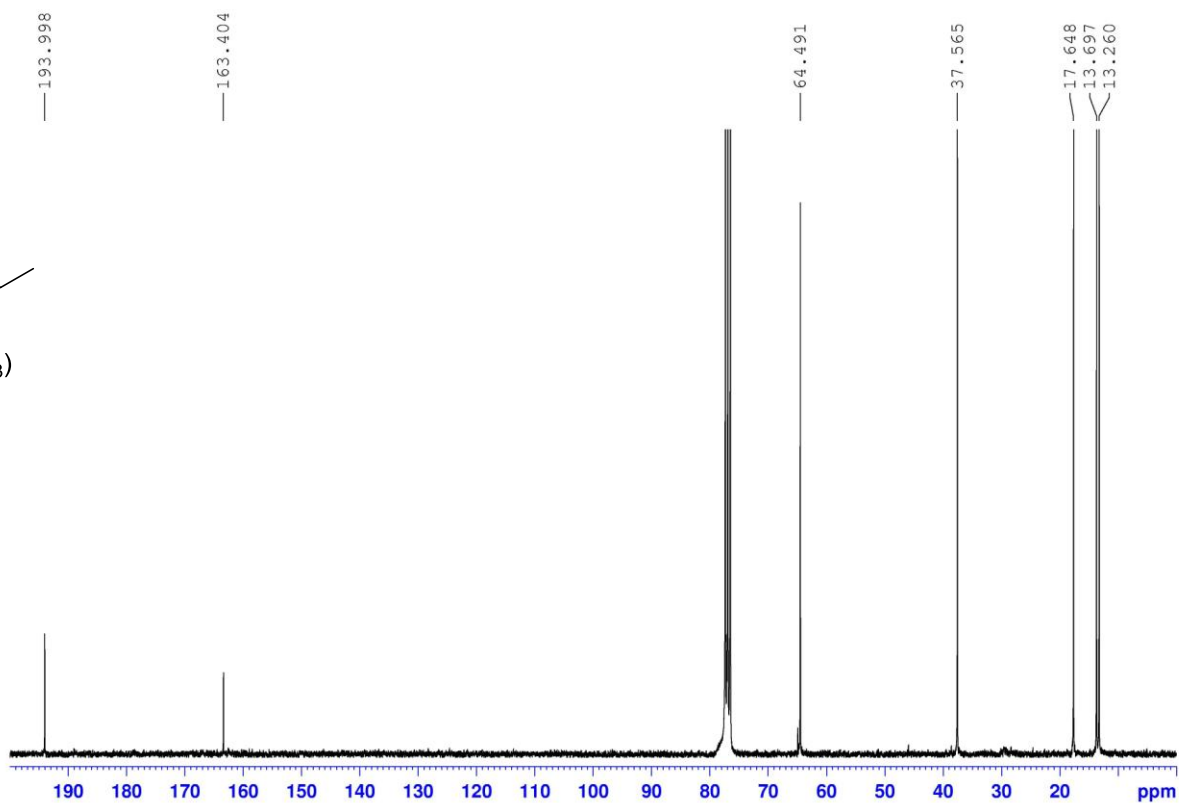
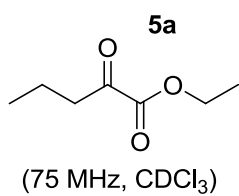
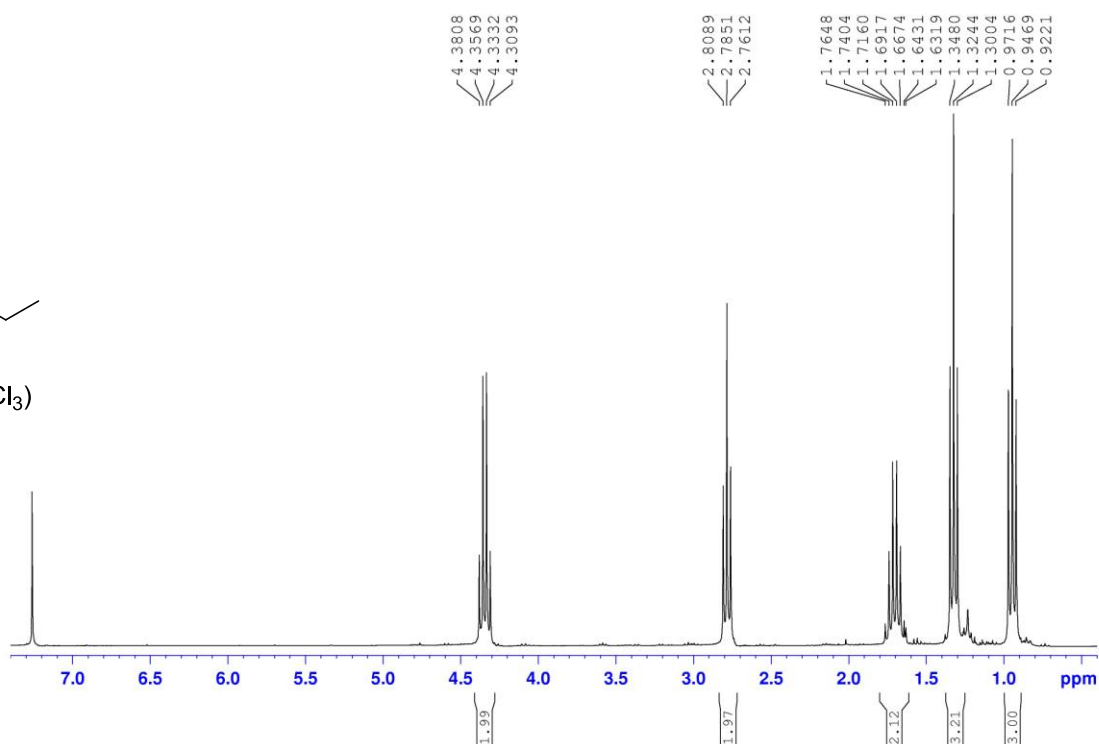
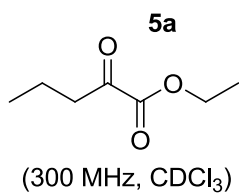
—8.456

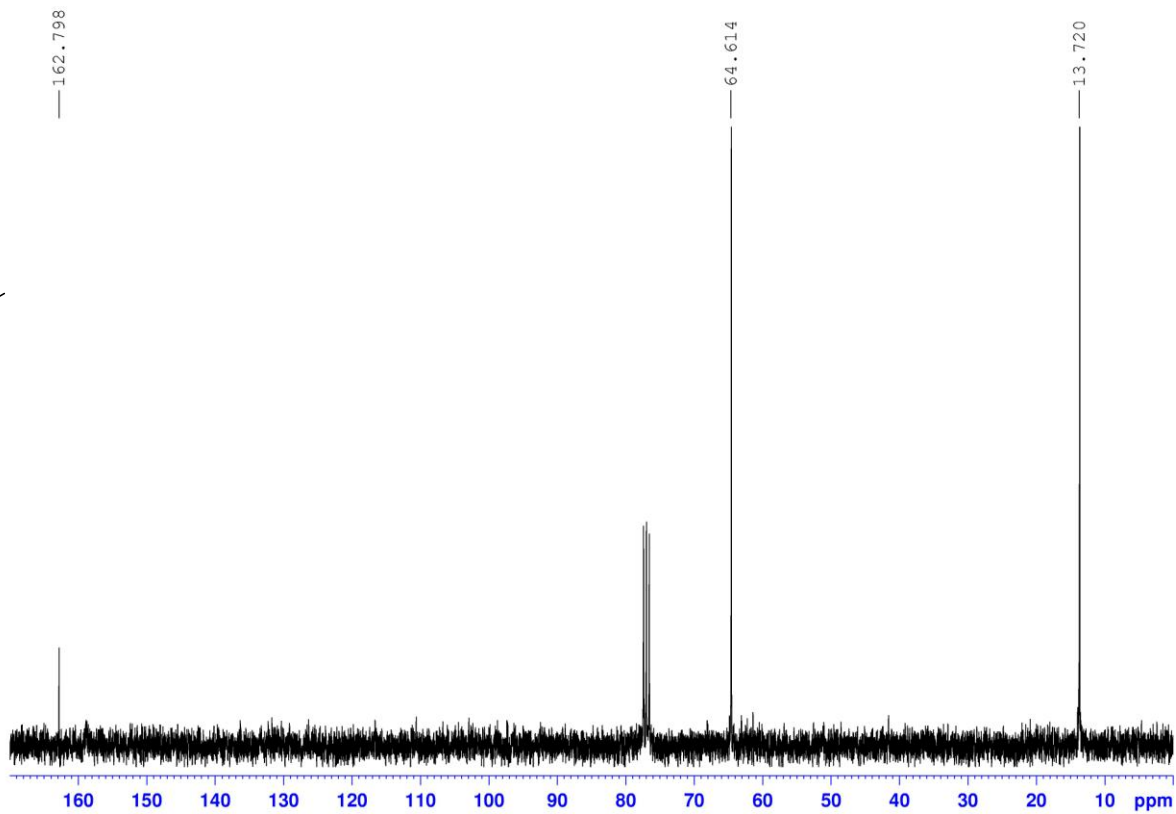
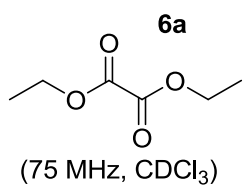
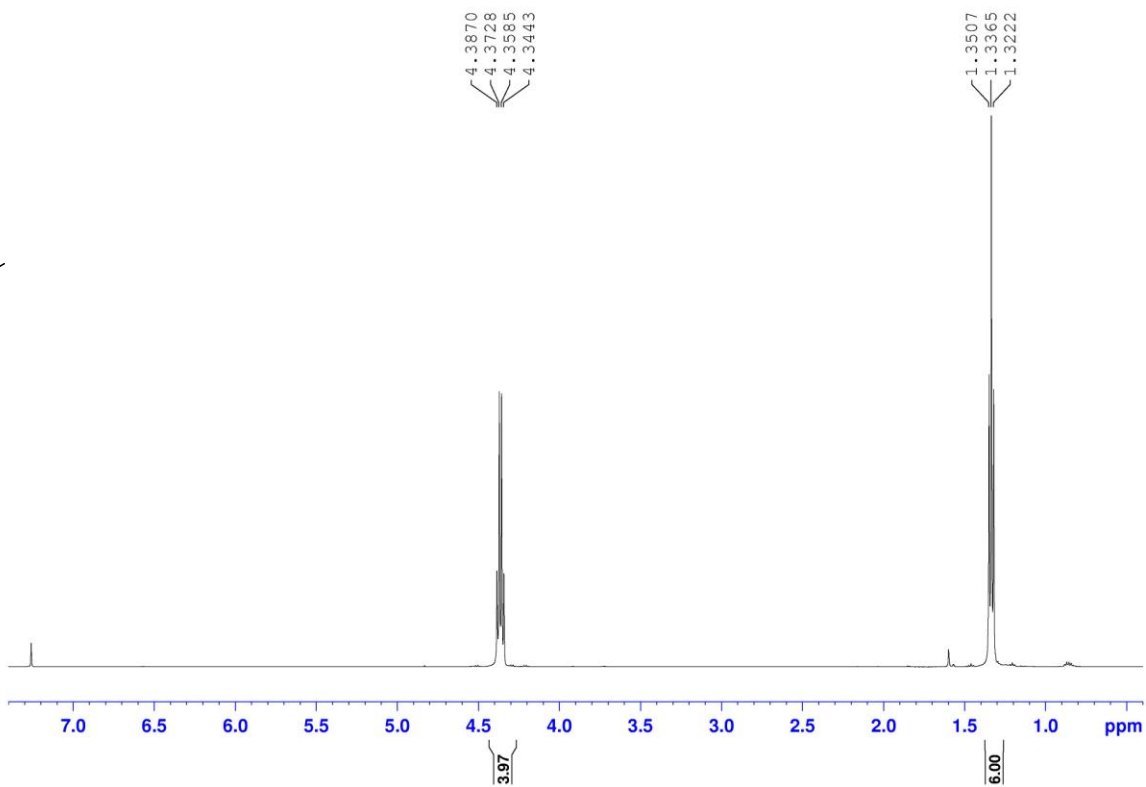
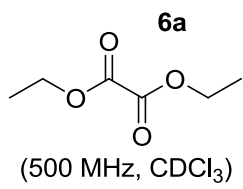


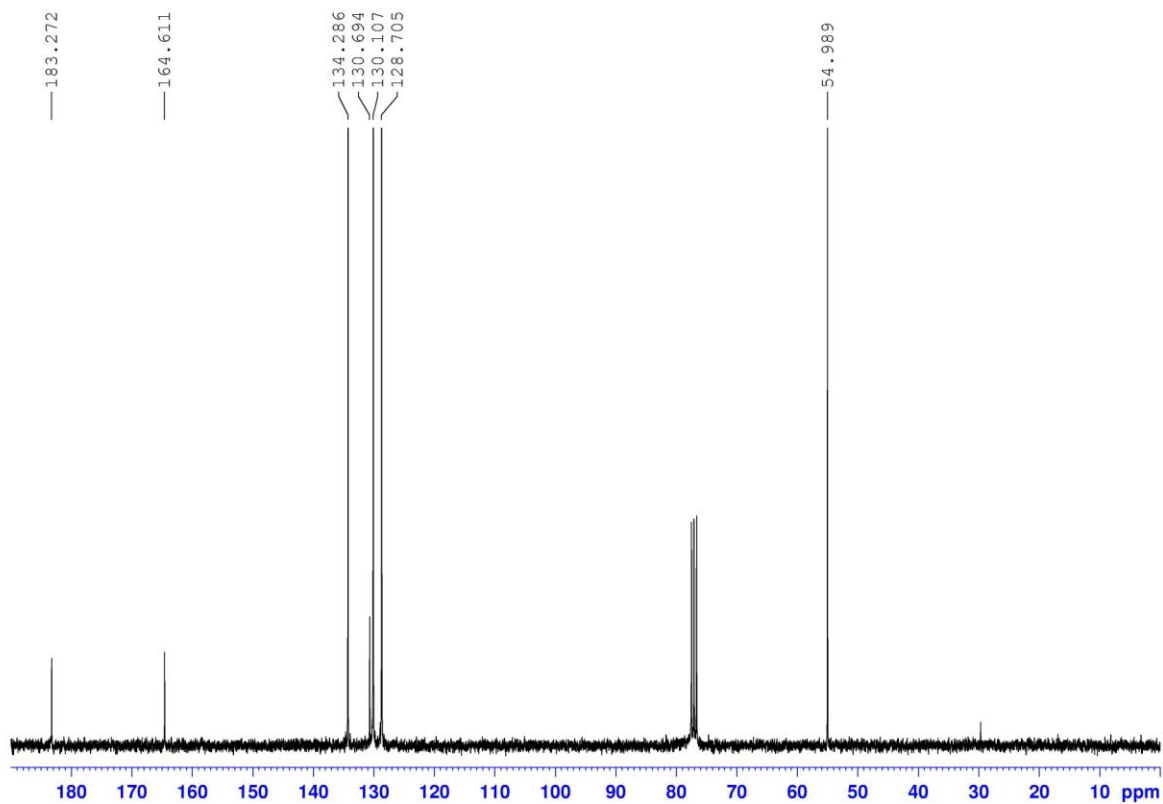
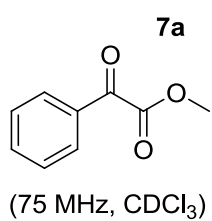
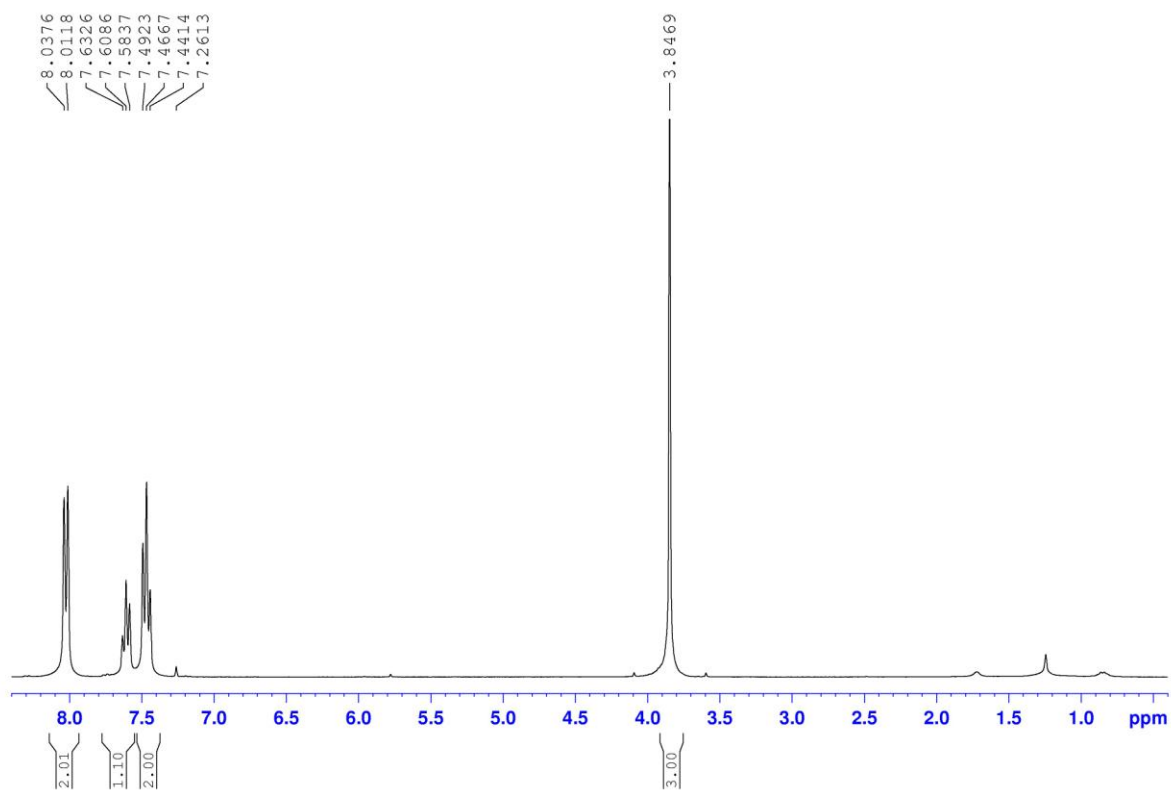
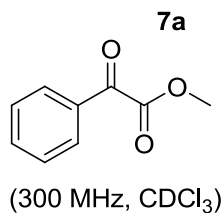
(75 MHz, CDCl₃)

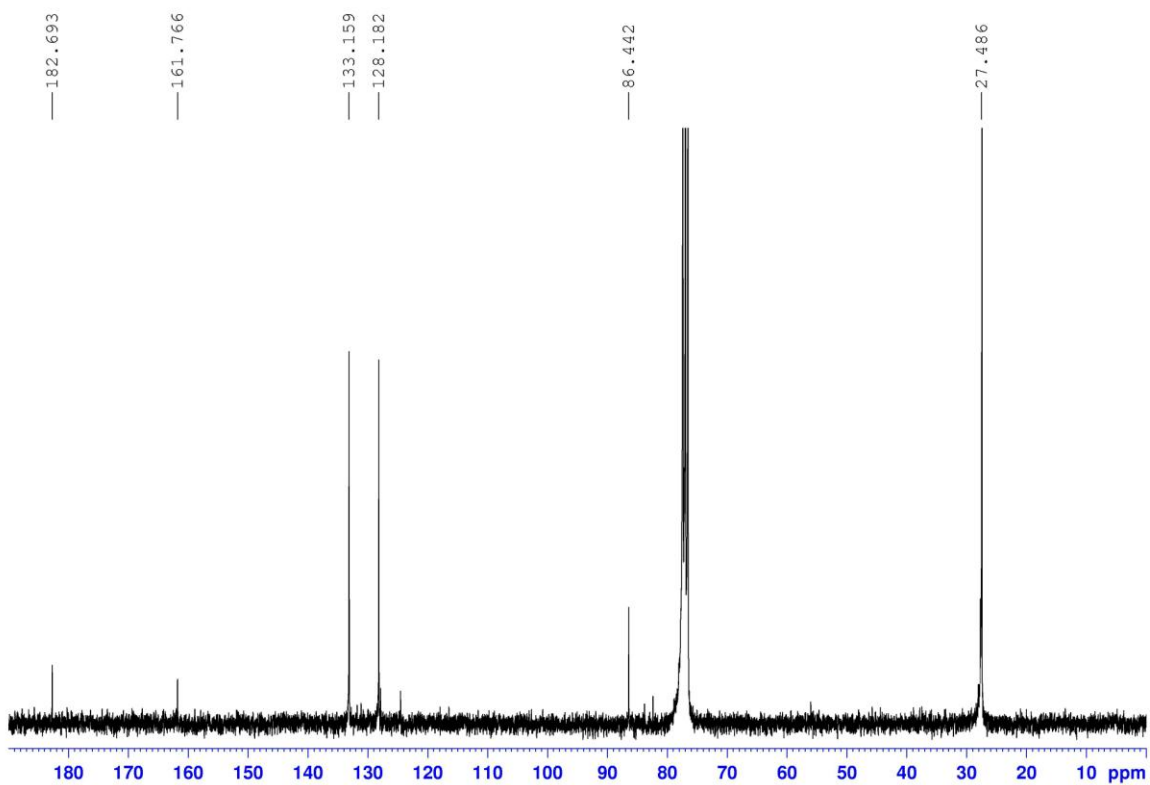
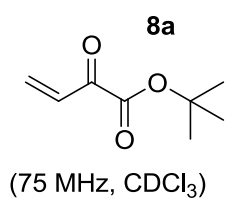
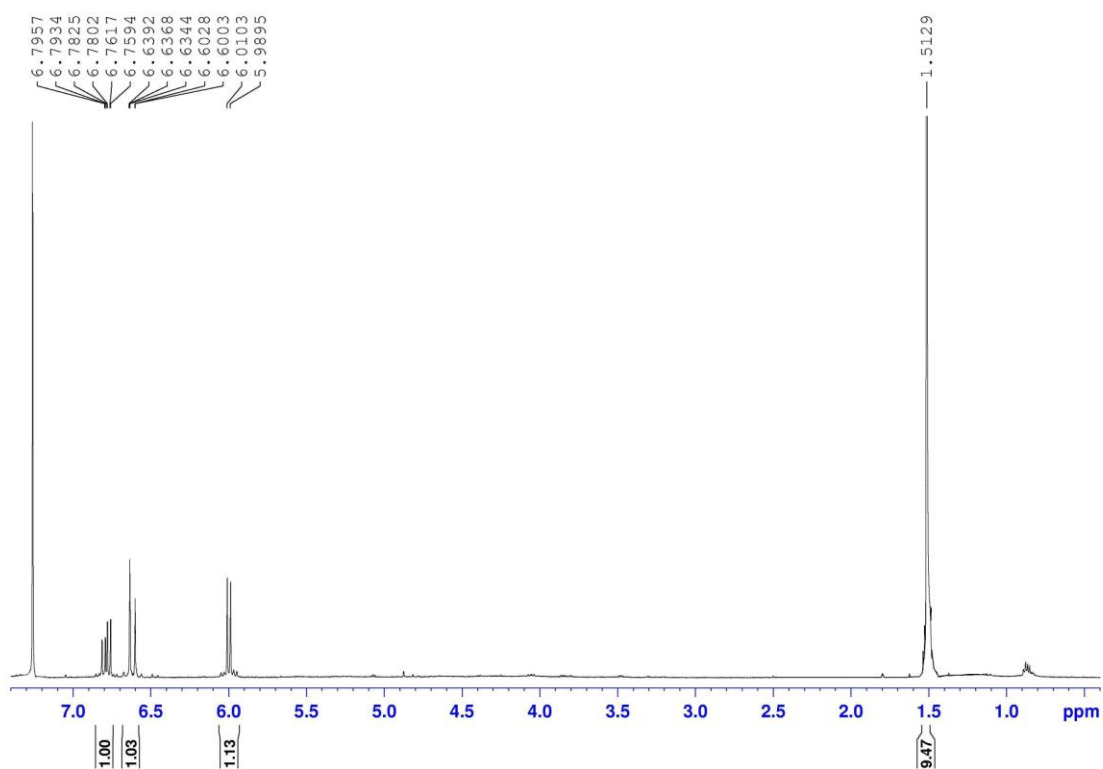
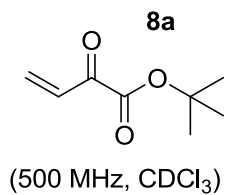


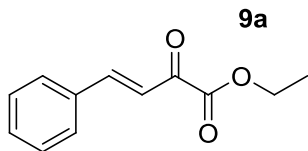




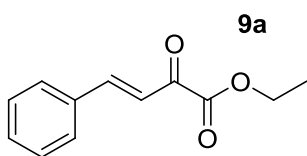
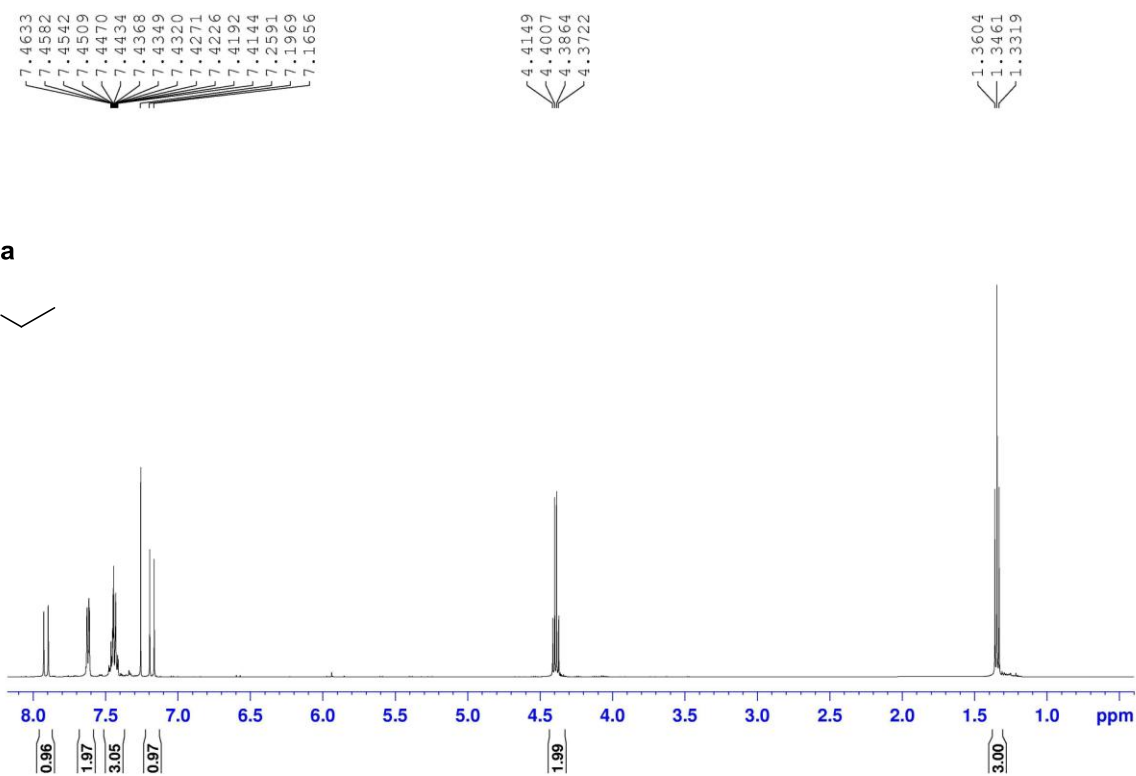




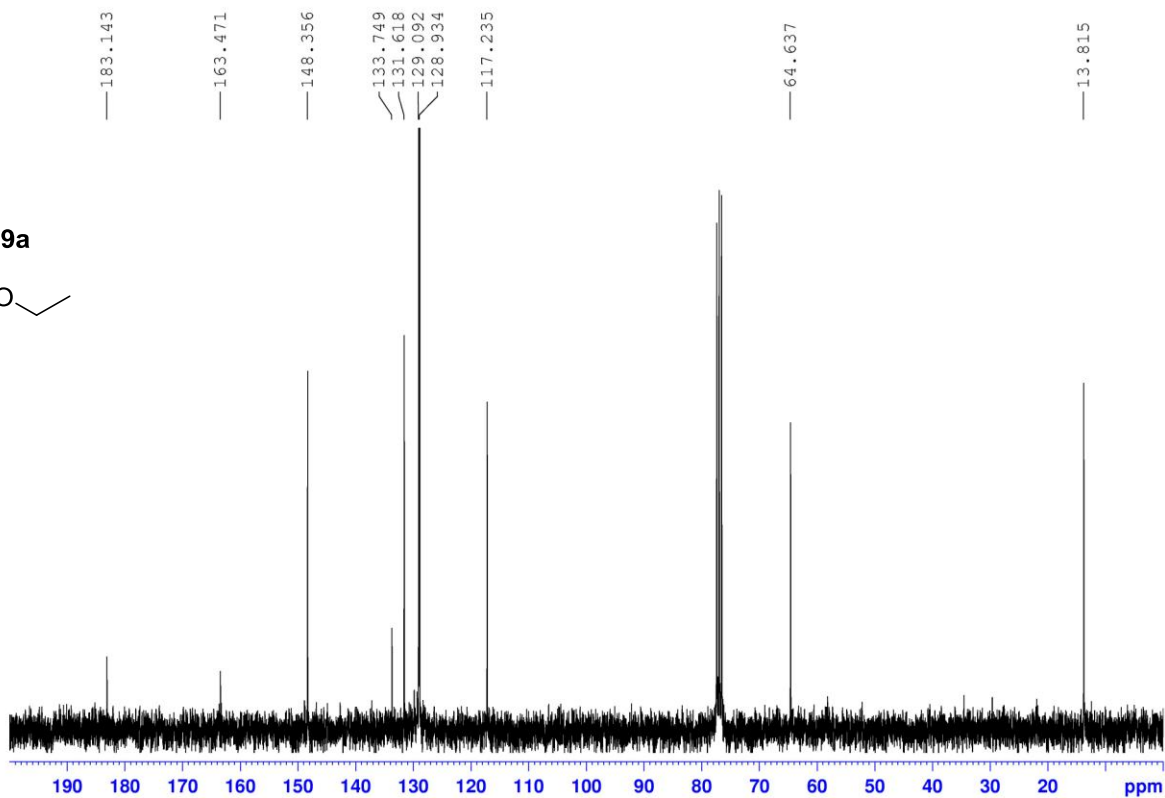


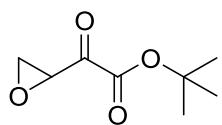


(500 MHz, CDCl₃)



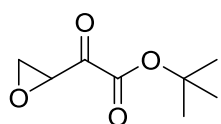
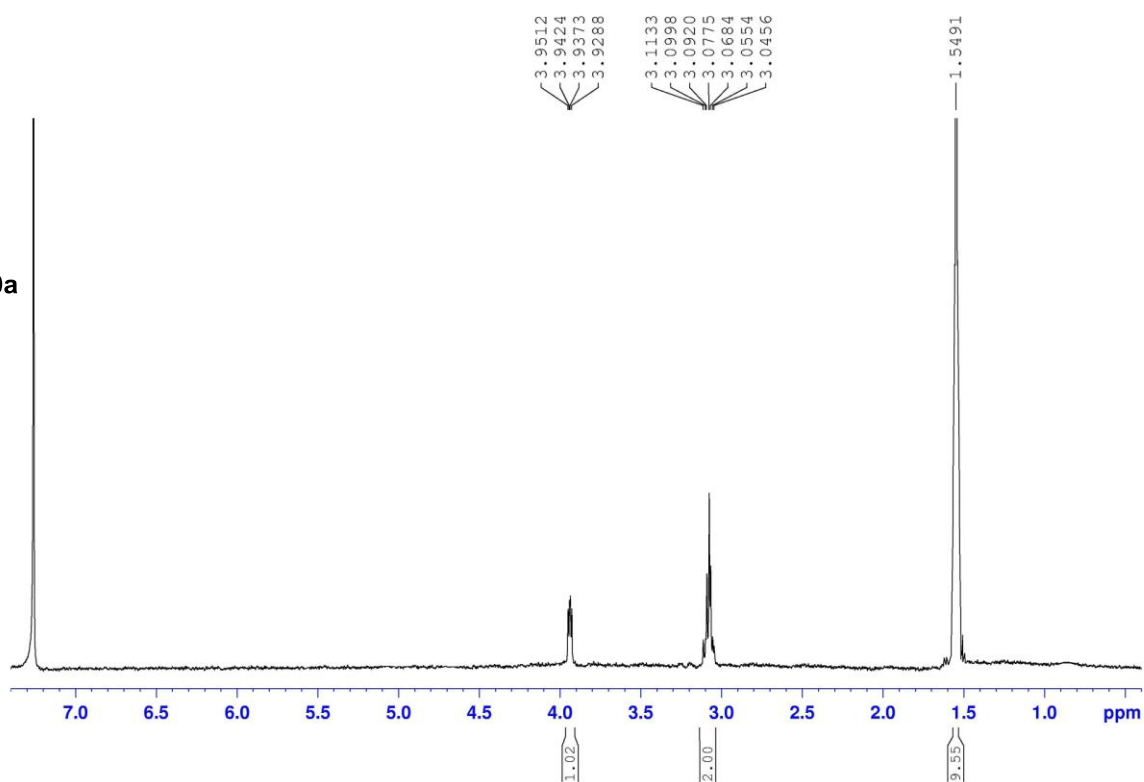
(75 MHz, CDCl₃)





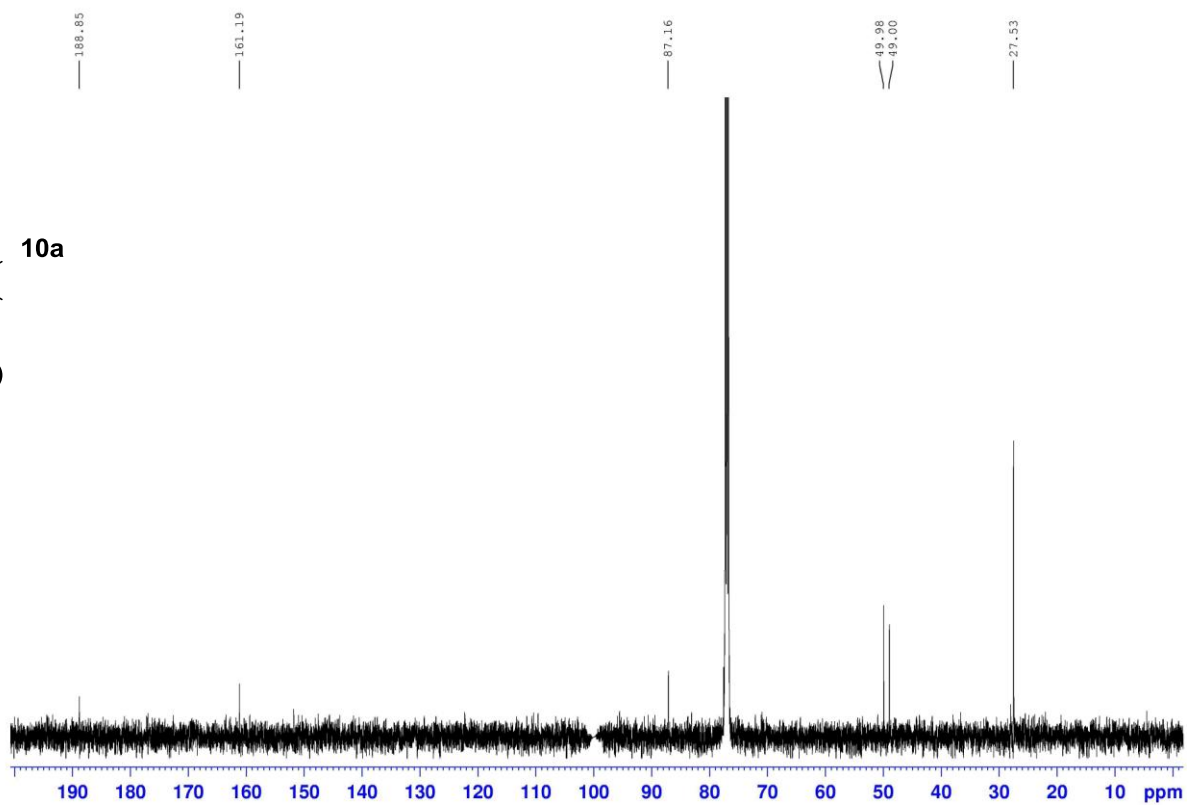
10a

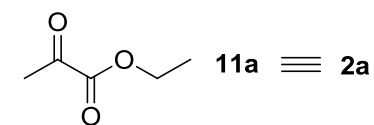
(300 MHz, CDCl₃)



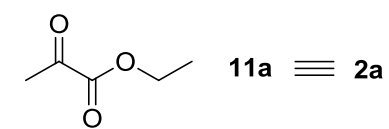
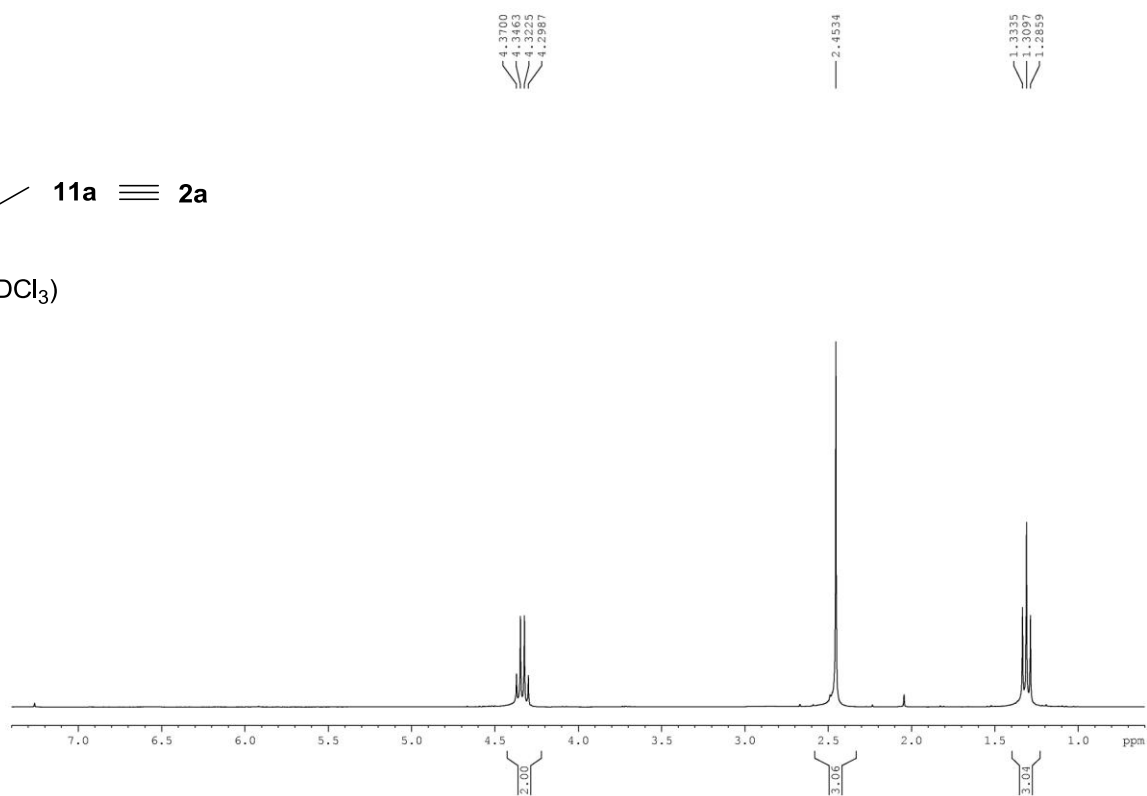
10a

(75 MHz, CDCl₃)

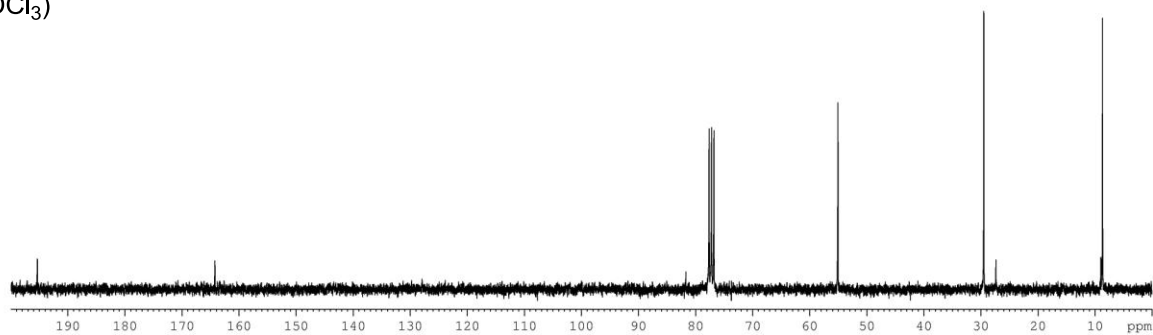


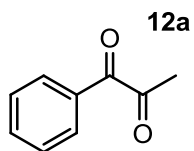


(300 MHz, CDCl₃)

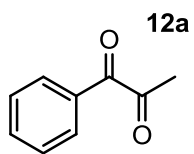
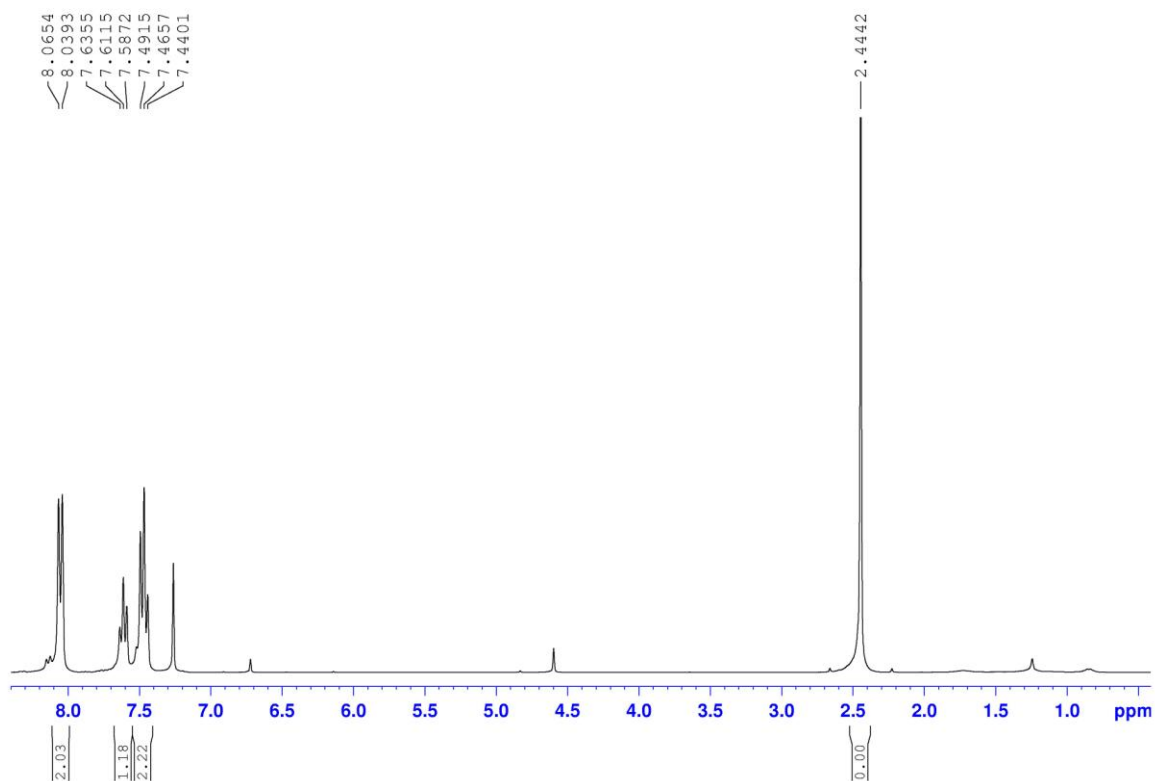


(75 MHz, CDCl₃)

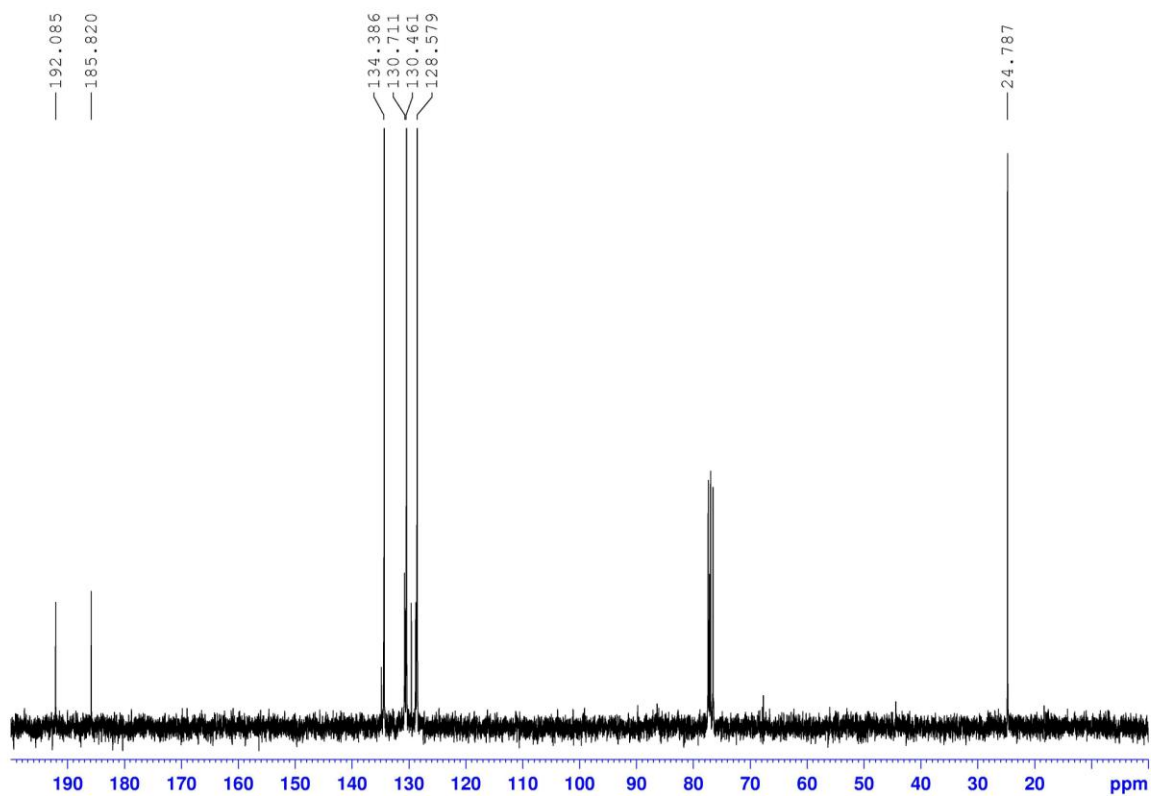




(300 MHz, CDCl₃)

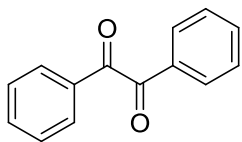


(75 MHz, CDCl₃)

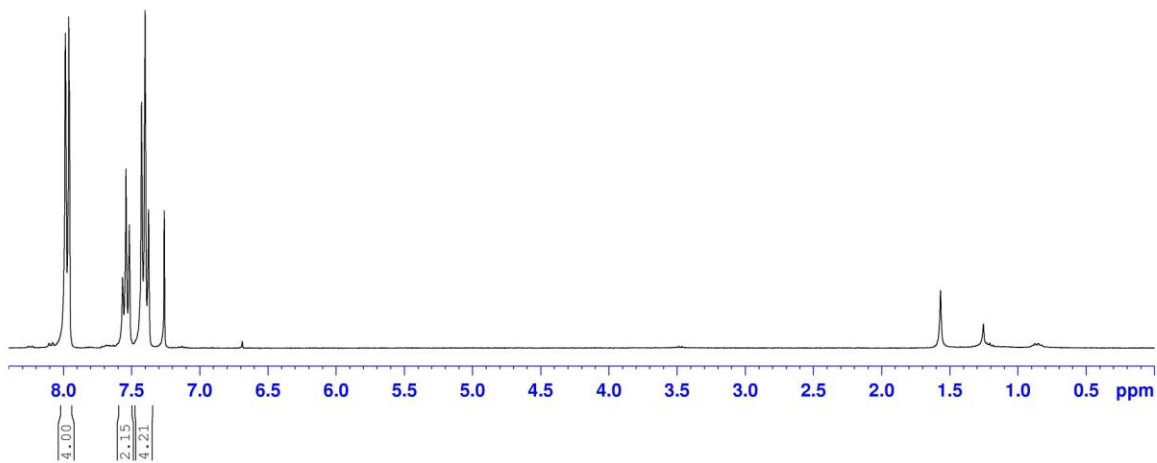


7.9860
7.9611
7.5669
7.5419
7.5175
7.4276
7.4013
7.3761

13a

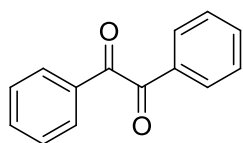


(300 MHz, CDCl₃)

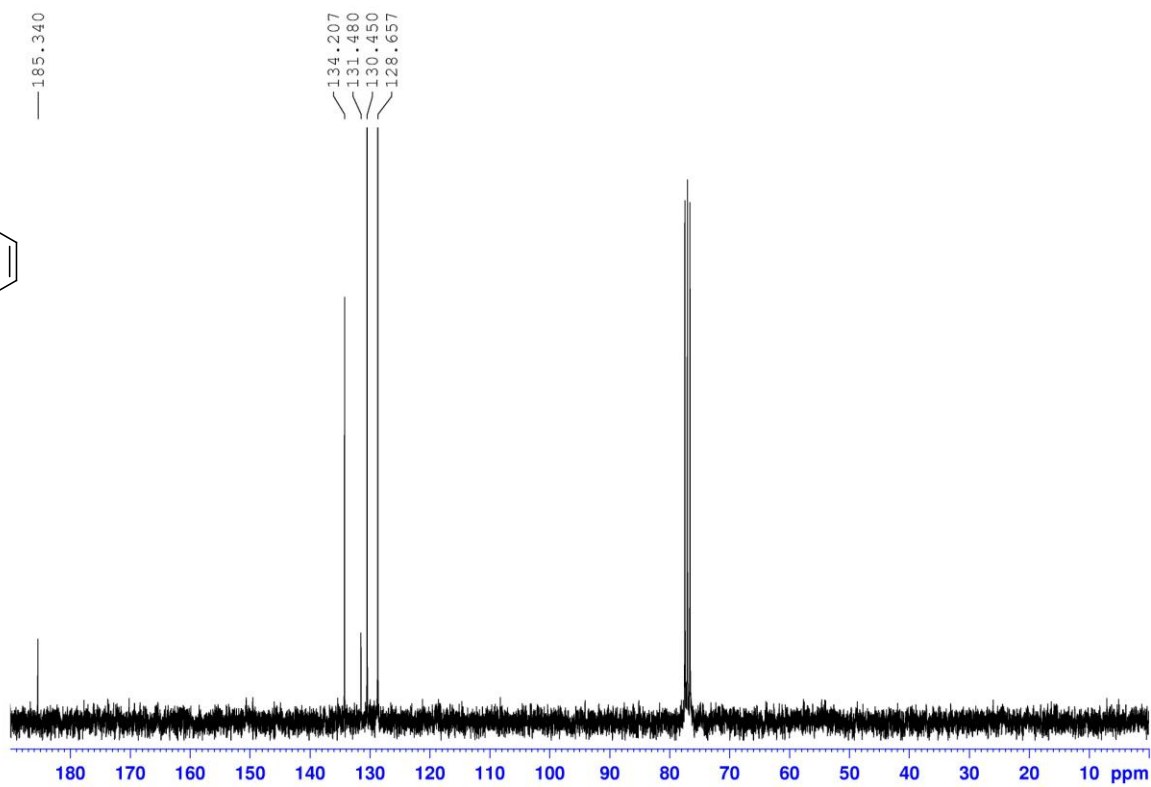


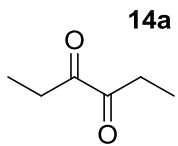
185.340

13a

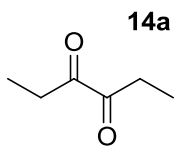
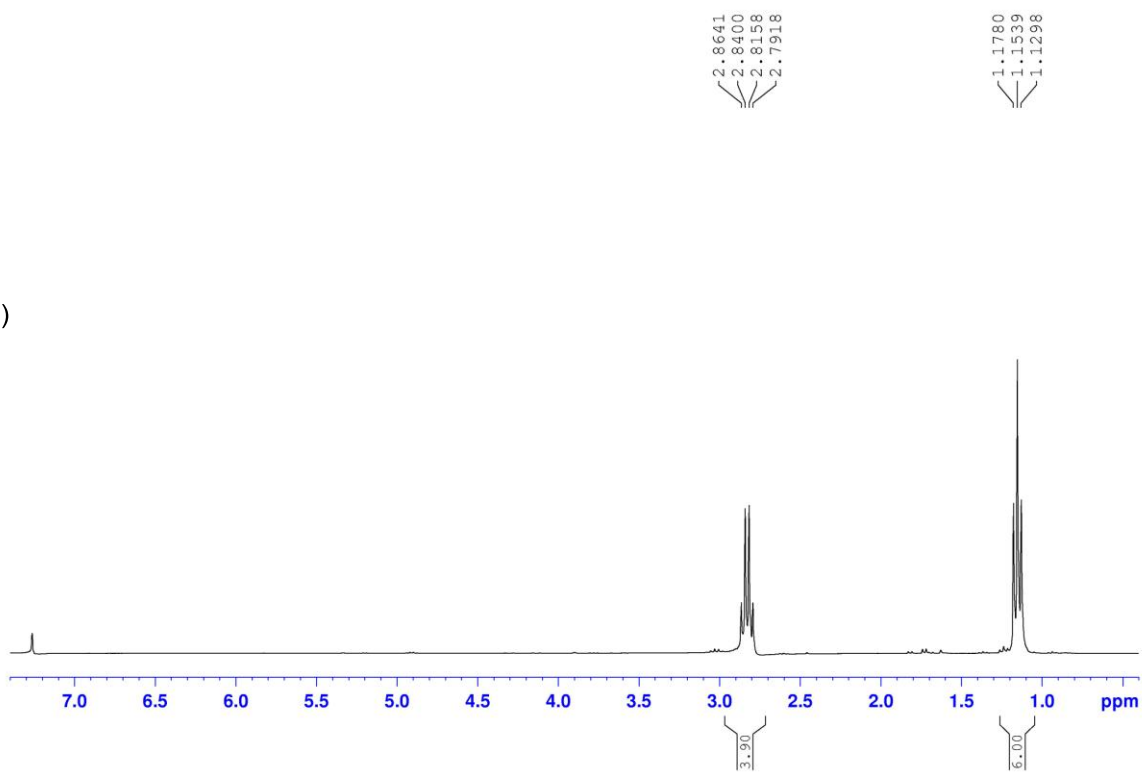


(75 MHz, CDCl₃)





(300 MHz, CDCl₃)



(75 MHz, CDCl₃)

