ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Γενικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών

Εργαστήριο Βιοκατάλυσης

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Εφαρμογή της Βιοκατάλυσης προς την χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών του κανθάρου των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp.*»

ΧΡΥΣΟΥΛΑ Δ. ΔΙΟΝΥΣΟΠΟΥΛΟΥ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΙΟΥΛΙΑ ΣΜΟΝΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

General postgraduate program

Laboratory of Biocatalysis

Master Thesis

“Application of Biocatalysis for chemoenzymatic synthesis of natural pheromones from red palm weevil *Rhynchophorus spp.***”**

CHRYSOULA D. DIONYSOPOULOU

Master Thesis Supervisor: IOULIA SMONOU

HERAKLION 2016

Στην οικογένειά
μου, που με στηρίζει και στους φίλους μου.

Εξεταστική Επιτροπή

Ιουλία Σμόνου, ***Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης***

Γεώργιος Βασιλικογιαννάκης, ***Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης***

Μανώλης Στρατάκης, ***Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοκατάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκε στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του καθώς και για την κάλυψη όλων των υλικοτεχνικών υποδομών που μου παρείχε για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ και την καθηγήτριά μου κ. Ιουλία Σμόνου, για την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου. Επίσης την ευχαριστώ για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε και για την εμπιστοσύνη και τη καταννόηση που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους Καθηγητές κ. Γιώργο Βασιλικογιαννάκη και κ. Μανώλη Στρατάκη που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς μου επιτροπής καθώς και για τη βοήθεια τους.

Ευχαριστώ και τον Δρ. Α. Σπύρο για τη βοηθεία του στην επίλυση οποιουδήποτε τεχνικού προβλήματος του φασματόμετρου NMR.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Άννα Μπαριωτάκη για τη βοήθεια της στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ και τους Θοδωρή Τυρίκο Εργά και Βασίλη Γιαννόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια τους καθώς και όλους τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο και τους φίλους μου από τον τομέα της Οργανικής Χημείας για τις συμβουλές τους στις δυσκολίες που συνάντησα.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τον άντρα μου για την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξη τους σε κάθε μου προσπάθεια.

Βιογραφικό

Ονοματεπώνυμο: Διονυσοπούλου Χρυσούλα

Ημ. Γέννησης: 15 Φεβρουαρίου 1989

Τόπος Γέννησης: Καλαμάτα, Μεσσηνία

Email: xrisoula89@hotmail.com, chrisdiony@outlook.com

Εκπαίδευση

2012-σήμερα: Δίπλωμα ειδίκευσης στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Σπουδών « Εφαρμογή της Βιοκατάλυσης προς την χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών του κανθάρου των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp.*» Οργανική Χημεία, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ι. Σμόνου

2006-2011: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμπειρία

2015-2016: Αργοτική Ένωση Ηρακλείου (Ε.Α.Σ)

2007-2009: Διπλωματική εργασία «Οργανοχλωριομένα και Αφλατοξίνη Μ1 στα γάλατα εμπορίου».
Εργαστήριο Τοξικολογίας,
Επιβλ. Καθηγητής: Τσατσάκης Αριστείδης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Συνέδρια

2016: Παρακολούθηση 18^{ου} Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο, Κρήτη.

2015: Παρακολούθηση 12ου Συνεδρίου Ελλάδας Κύπρου, Θεσσαλονίκη.

2012: Παρακολούθηση 63ου Πανελλήνιου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη.

2010: 1st Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School – BIONANOTOX 2010, Ηράκλειο, Ελλάδα

2010: Επιτυχής εξέταση των Βασικών Μαθημάτων Τοξικολογίας από τη Eurotox, Ηράκλειο, Κρήτη.

2009: Παρακολούθηση 6ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Καλαμάτα, Μεσσηνίας.

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

- Χρυσούλα Διονυσοπούλου, Μαρία Καλλέργη, Άννα Μπαριωτάκη, Ιουλία Σμόνου **«** Εφαρμογή της βιοκατάλυσης προς την χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών συνάθροισης του κανθάρου των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp.*» 12ο Συνέδριο Χημείας Ελλάδας - Κύπρου, Θεσσαλονίκη, 2015.
- Προφορική εργασία στο 18ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο, 2016.

Μέλος Επιστημονικών Ενώσεων

Μέλος της «Ένωσης Ελλήνων Χημικών», από το 2011.

Curriculum Vitae

Full name: Dionysopoulou Chrysoula

Date of Birth: 15 February 1989

Place of Birth: Kalamata, Messinia

Email: xrisoula89@hotmail.com, chrisdiony@outlook.com

Education

2012-present: Graduate student performing research for MSc. Degree at University of Crete, Department of Chemistry, « Application of Biocatalysis for chemoenzymatic synthesis of natural pheromones from red palm weevil *Rhynchophorus spp.*» Organic Chemistry, Supervisor Prof.: I. Smonou

2006-2011: BS in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete

Experience

2015-2016: Industrial Training Placement at the Company "Union of agricultural cooperatives of Iraklion Crete"

2007-2009: Undergraduate thesis «Organochlorides and Aflatoxin M1 in commercial milk».
Supervisor Prof. A. Tsatsakis, Medical School, University of Crete

Conferences

2016: 18° Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion, Crete.

2015: 12° Greece – Cyprus Symposium, Thessaloniki.

2012: 63° Symposium on Biochemistry and Molecular Biology, Heraklion, Crete.

2010: 1st Russian-Hellenic with International Participation and Young Scientist's School – BIONANOTOX 2010, Heraklion, Crete.

2009: 6° Symposium on Forensic and Toxicology, Kalamata, Messinia.

Presentations at Conferences

- Chrysoula Dionysopoulou, Maria Kallergi, Anna Bariotaki, Ioulia Smonou **«**Application of Biocatalysis in chemoenzymatic synthesis of natural pheromones from red palm weevil *Rhynchophorus spp.*» 12° Greece – Cyprus Symposium, Thessaloniki, 2015.
- Oral presentation in 18° Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion, Crete, 2016.

Member in Professional Associations

Greek Chemical Society since 2011.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η πρώτη χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών συνάθροισης του κανθάρου των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp.* Το στάδιο κλειδί για τις συνθέσεις των φερομονών είναι η αναγωγή του επιθυμητού κετο-εστέρα προς τον αντίστοιχο υδροξυ-εστέρα με την κατάλληλη στερεοδομή.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή των υποστρωμάτων για τη ρακεμική σύνθεση των προϊόντων αναγωγής με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για τον προσδιορισμό των προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών.

Για την εύρεση του κατάλληλου ενζύμου για την σύνθεση των επιθυμητών ενδιαμέσων πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αναγωγές με ποικιλία εμπορικά διαθέσιμων NADPH εξαρτώμενων κετορεδουκτασών. Αφού προσδιορίστηκε η κατάλληλη κετορεδουκτάση για κάθε προϊόν πραγματοποιηθήκε η χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών συνάθροισης. Για τον έλεγχο των ενζυμικών αναγωγών χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα. Σε όλα τα προϊόντα ενζυμικής αναγωγής προσδιορίστηκε η απόλυτη στερεοδομή με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Λέξεις κλειδιά: Χημειοενζυμική σύνθεση, φερομόνες συνάθροισης του κανθάρου των φοινικοειδών, NADPH εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες

ABSTRACT

In the present thesis the first chemoenzymatic synthesis of the natural pheromones of red palm weevil *Rhynchophorus spp* has been accomplished. The key step of these syntheses is the reduction of keto-esters to hydroxyl-esters with the desirable stereoselectivity.

Firstly, racemic products from chemical reduction were synthesized in order to use them as standards and help us to indentify the products of the enzymatic reductions.

The next study was to determine which commercial ketoreductase is proper for each synthesis. In order to succeed this we use a variety of commercially available ketoreductases. For the control of enzymatic reductions we used GC with chiral column and the suitable program for our substrates. All ketoreductases that were used for our synthesis, are NADPH-dependent ketoreductases. The absolute configuration of all products derived from enzymatic reductions was determined by NMR spectroscopy.

Keywords: Chemeoenzymatic synthesis, pheromones of red palm weevil, NADPH – dependent ketoreductase.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες 5

Βιογραφικό 6

Περίληψη 11

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενζυμα στην οργανική σύνθεση 14

Κετορεδουκτάσες 18

Νικοτιναμιδικοι συμπαράγοντες 20

Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής 22

Κετορεδουκτάσες στην ασύμμετρη σύνθεση 27

Βιοκαταλυτικές αναγωγές από την ερευνητική μας ομάδα 33

Κάνθαρος των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp* 38

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών συνάθροισης 45

Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων 53

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια 56

Οργανα 56

Γενικές συνθετικές μεθόδοι 56

Σύνθεση Υποστρωμάτων 59

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΑΣΜΑΤΑ 1H NMR 68

Βιβλιογραφία 90

Εισαγωγή στα ένζυμα

Ο τομέας της κατάλυσης αποτελεί ένα πολύτιμο εργάλειο για τη συνθετική χημεία. Ήδη από τις αρχές του 19ου αιώνα άρχισαν να αναπτύσσονται με αυξανόμενο ρυθμό διάφορες αντιδράσεις κατάλυσης, οι οποίες άνοιξαν τον δρόμο και για αντιδράσεις που στην αρχή ήταν αδύνατον να πραγματοποιηθούν.[1] Ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκεται ο καταλύτης και το υπόστωμα, διακρίνεται σε ετερογενή και ομογενή κατάλυση. Η χρήση καταλυτών, όπως οξέα Lewis, πολυλειτουργιακοί καταλύτες και καταλύτες μετάλλων, είναι ευρέως διαδεδομένη στη σύνθεση βιοενεργών μορίων.[2] Κατά τις προηγούμενες δεκαετίες για την κατάλυση των οργανικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν μεταξύ άλλων ως καταλύτες σύμπλοκα μετάπτωσεως και νανοσωματίδια μετάλλων, όπως για παράδειγμα ο καταλύτης Grubbs[3] και νανοσωματίδια χρυσού πάνω σε διοξείδιο του τιτανίου.[4] Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση τους έχει επιβαρυντικά αποτελέσματα για το περιβάλλον και για τον άνθρωπο. Έτσι, η ανάγκη κάλυψης των βιομηχανικών απαιτήσεων της σύγχρονης εποχής σε συνδιασμό με τις απαιτήσεις της πράσινης χημείας[4] ολοένα και αυξάνεται, με αποτέλεσμα η βιοκατάλυση και η χρήση «πράσινων καταλυτών» να αναπτύσσεται διαρκώς.

Ένας παράγοντας που κάνει τη χρήση των βιοκαταλυτών ακόμα πιο αναγκαία, είναι το γεγονός ότι στην οργανική σύνθεση είναι πλέον αναγκαία η ανακάλυψη νέων συνθετικών μεθόδων για τη στερεοελεγχόμενη δημιουργία οπτικά ενεργών ενώσεων. Για παράδειγμα, η δημιουργία χειρόμορφων ενώσεων με υψηλή βιολογική δραστικότητα είναι εξαιρετικά σημαντική στη βιομηχανία φαρμάκων.[5] Έτσι, οι βιοκαταλύτες[6], που είναι τα ένζυμα, χρησιμοποιούνται εκτενώς στην οργανική σύνθεση. Ωστόσο, η χρήση τους ήταν γνωστή για περίπου έναν αιώνα με μορφή είτε ολόκληρων κυττάρων είτε απομονωμένων ενζύμων.[7]

Παλαιότερα, υπήρχε η αντίληψη ότι τα ένζυμα είναι εν δυνάμει καλοί καταλύτες, αλλά παρουσίαζουν ορισμένα μειονεκτήματα, καθώς είναι ακριβά, η δραστικότητά τους, είναι σχεδόν μηδαμινή στους οργανικούς διαλύτες και καταλύουν σχεδόν εξολοκλήρου φυσικά υποστρώματα ρυθμίζοντας

μεταβολικές διεργασίες στους ζώντες οργανισμούς. Ωστόσο, αυτή η αντίληψη γρήγορα καταρίφθηκε αφού η χρήση των ενζύμων σαν καταλύτες έχει εξαπλωθεί ευρέως τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα όσο και σε βιομηχανική κλίμακα.[8,9]

Σε σύγκριση με τους χημικούς ομογενείς ή ετερογενείς καταλύτες, οι βιοκαταλύτες έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν εξαιρετικούς καταλύτες. Ορισμένα από αυτά τα χαρακτηριστικά αναφέρονται παρακάτω:[10]

i. Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Τα ένζυμα καταλύουν χημικές αντιδράσεις με ταχύτητες αντιδράσεων μεγαλύτερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του 10^8 – 10^{10}. Σε κάποιες περιπτώσεις η ταχύτητα μπορεί να υπερβεί την τάξη του 10^{12}, μία τιμή που οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να την επιτύχουν.[11]
ii. Τα ένζυμα μπορούν να χαρακτηριστούν σαν πράσινοι καταλύτες. Γενικά είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες έναντι των χημικών καταλυτών βαρέων μεταβατικών μετάλλων, αφού είναι αποικοδομήσιμα στο περιβάλλον και δρούν σε υδατικά διαλύματα.
iii. Διατηρούν τη δραστικότητά τους κάτω από ήπιες συνθήκες. Για τη δράση τους απαιτούνται τιμές pH από 5 μέχρι 8 και θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 40 ^{o}C. Έτσι, ελαχιστοποιούνται οι παράπλευρες μη επιθυμητές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα οι αποικοδομήσεις, οι ισομεριώσεις, ρακεμοποιήσεις, κ.α.
iv. Δυνατότητα χρήσης πολλών ενζύμων ταυτόχρονα. Το ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες, μας επιτρέπει να χρησιμοποιούμε έναν αριθμό ενζύμων ταυτόχρονα μέσα στο σκεύος της αντίδρασης και έτσι να πραγματοποιούνται πολλά στάδια αντίδρασης ταυτόχρονα. Γεγονός αρκετά πρακτικό όταν ένα ενδιάμεσο προϊόν είναι αρκετά ασταθές και η απομόνωσή του είναι δύσκολη έως αδύνατη ή στην περίπτωση όπου μια ανεπιθύμητη ισορροπία μπορεί να οδηγηθεί προς το

επιθυμητό προϊόν συνδυάζοντας δυο συνεχόμενα ενζυμικά στάδια μεταξύ τους.[12]

v. Δρούν καταλυτικά με μία μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων. Τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να καταλύουν αντιδράσεις είτε φυσικών είτε τεχνητών μη φυσικών υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση.

vi. Υπάρχει μεγάλος αριθμός ενζύμων που είναι εμπορικά διαθέσιμα και η χρήση τους είναι εύκολη όπως και αυτή των χημικών καταλυτών.

vii. Νέα βελτιωμένα ένζυμα. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων στη γενετική μηχανική τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει στην τροποποίηση των ενζύμων και στον σχηματισμό πολλών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών με διαφορετικές ιδιότητες.[13] Η τροποποίηση των ενζύμων έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό καινούργιων και πιο βελτιωμένων καταλυτών με καλύτερες ιδιότητες, για παράδειγμα στερεοεκλεκτικότητα, δραστικότητα, σταθερότητα.[14]

viii. Μεγάλη ποικιλία ενζύμων που καταλύουν πολλά διαφορετικά είδη οργανικών αντιδράσεων. Έτσι, τα ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη χημική αντίδραση που καταλύουν. Η ταξινόμησή τους σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Βιοχημείας (International Union of Biochemistry) γίνεται σε έξη κύριες ομάδες:

- **Οξειδορεδουκτάσες**, οι οποίες καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καθώς και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.
- **Τρανσφεράσες**, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων (φωσφορικές ομάδες ή σάκχαρα, κ.α) από ένα μόριο σε ένα άλλο.
- **Υδρολάσες**, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και πεπτιδίων.
- **Λυάσες**, οι οποίες καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.
- **Ισομεράσες**, οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού, για παράδειγμα τη μετακίνηση διπλών δεσμών, Z/E ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.

- **Λιγκάσες,** οι οποίες καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.

Χαρακτηριστικά και εκλεκτικότητα των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια και αποτελούν ειδική κατηγορία των πρωτεϊνών καθώς χρησιμοποιούνται για να καταλύουν αντιδράσεις τόσο in vivo όσο και in vitro. Είναι μακριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες έχουν ως δομικές τους μονάδες τα αμινοξέα. Κάθε ένζυμο, άρα και κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα, έχει συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων συνδεδεμένων με πεπτιδικούς δεσμούς. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεϊνης είναι αυτή που καθορίζει και την τρισδιάστατη δομή της και κατά συνέπεια και τις ιδιότητες του ενζύμου. Μέσω της τριτοταγούς δομής τους τα ένζυμα αποκτούν διαμόρφωση τέτοια ώστε οι υδρόφιλες πολικές ομάδες των αμινοξέων τους να βρίσκονται στο εξωτερική επιφάνεια του ενζύμου και οι υδρόφοβες στην εσωτερική επιφάνεια του. Έτσι, δημιουργείται ένα υδατικό στρώμα που περιβάλει το ένζυμο και συνδέεται με αυτό με δεσμούς υδρογόνου, ενώ συμμετέχει και στη τελική στερεοδομή του ενζύμου και την πλέον λειτουργική. Η λειτουργική διαμόρφωση του ενζύμου σταθεροποιείται και από δυνάμεις Van Der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ των αλειφατικών αλυσίδων των αμινοξέων και από δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων S. Αυτοί οι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί αφού ανάλογα με τον αριθμό των δισουλφιδικών δεσμών που έχει ένα ένζυμο τόσο πιο ανθεκτικό είναι στη θερμοκρασία.

Τα ένζυμα, όπως είναι γνωστό, παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα στις αντιδράσεις που καταλύουν. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημά τους είναι το είδος της εκλεκτικότητας που εμφανίζουν ανάλογα με την αντίδραση. Έτσι εμφανίζουν:

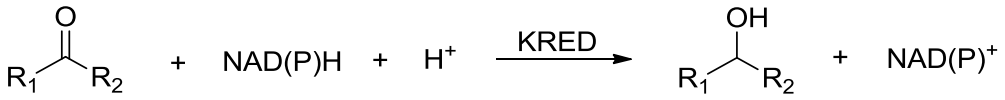
- **Χημειοεκλεκτικότητα.** Μια από τις ικανότητες των ενζύμων είναι να δρουν εκλεκτικά ως προς μια λειτουργική ομάδα του υποστρώματος χωρίς να αλληλεπιδρούν με τις υπόλοιπες λειτουργικές ομάδες του μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται καθαρές ενώσεις χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων.

- **Τοποεκλεκτικότητα.** Στην πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή των ενζύμων οφείλεται η ικανότητά τους να διακρίνουν ίδιες λειτουργικές ομάδες, που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του υποστρώματος.
- **Εναντιοεκλεκτικότητα.** Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.
- **Διαστερεοεκλεκτικότητα.** Με τη χρήση των ενζύμων είναι δυνατή η διάκριση ενός από τα διαστερεομερή που έχει ένα μίγμα ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

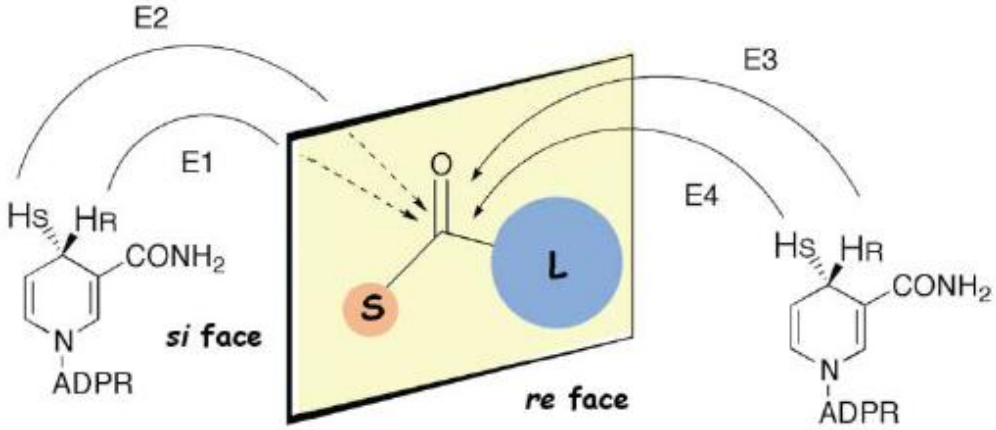
Οι κετορεδουκτάσες καταλύουν την αναγωγή καρβόνυλο ενώσεων αλλά και μη φυσικών υποστρωμάτων. Ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέλος της οικογένειας των αφυδρογονασών – ρεδουκτασών. Συναντώνται παντού στη φύση και έχουν απομονωθεί από φυτά και ψάρια, από βακτήρια και μαγιά, καθώς και από θηλαστικά, όπως τον άνθρωπο και τα κουνέλια. Είναι μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, μονομερή ένζυμα, αλλά σε μικρό ποσοστό συναντώνται και τετραμερείς κετορεδουκτάσες, οι οποίες έχουν απομονωθεί κυρίως από θηλαστικά.[15]

Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίου από ένα υπόστρωμα δότη ηλεκτρονίων σε ένα άλλο που είναι δέκτης ηλεκτονίων και για να είναι λειτουργικά απαιτείται η παρουσία ενός ή περισσοτέρων συμπαραγόντων, που μπορεί να είναι κάποιο μέταλλο ή συνένζυμο ή προσθετική ομάδα, οι οποίοι δρουν ως ενδιάμεσοι δέκτες ηλεκτρονίων. Ως συνένζυμα χρησιμοποιούνται NADH ή NAD(P)H. Κατά την ενζυμική αντίδραση αναγωγής γίνεται μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 :



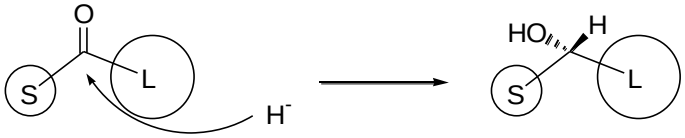
Σχήμα 1: Γενική αντίδραση αναγωγής κετονών με κετορεδουκτάση.

Η μεταφορά του υδριδίου του πυριδινικού δακτυλίου του συνενζύμου γίνεται είτε από την *si* – επιφάνεια είτε από την *re* – επιφάνεια της κετόνης που πρόκειται να αναχθεί σχηματίζοντας αντίστοιχα τις *(R)* – ή *(S)* – αλκοόλες (Σχήμα 2). Οι κατηγορίες των ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα είναι τέσσερις (E1, E2, E3 και E4).[16] Τα ένζυμα των κατηγοριών E1 και E2 καταλύουν την προσβολή του υδριδίου προς την *si* – επιφάνεια της καρβονυλομάδας, ενώ τα ένζυμα των κατηγοριών E3 και E4 καταλύουν την προσβολή του υδριδίου προς την *re* – επιφάνεια, ώστε να σχηματιστούν οι *R* και οι *S* αλκοόλες αντίστοιχα (Σχήμα 2). Από μηχανιστική σκοπιά, τα ένζυμα των κατηγοριών E1 και E3 μεταφέρουν το pro *(R)* – υδρίδιο και τα E2 και E4 το pro *(S)* – υδρίδιο.



Σχήμα 2: NAD(P)H – εξαρτώμενες αλκοολικές αφυδρογονάσες - κετορεδουκτάσες.

Στις περισσότερες περιπτώσεις το στερεοχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης αναγωγής μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο, γνωστό ως «κανόνας του Prelog», (Σχήμα 3).

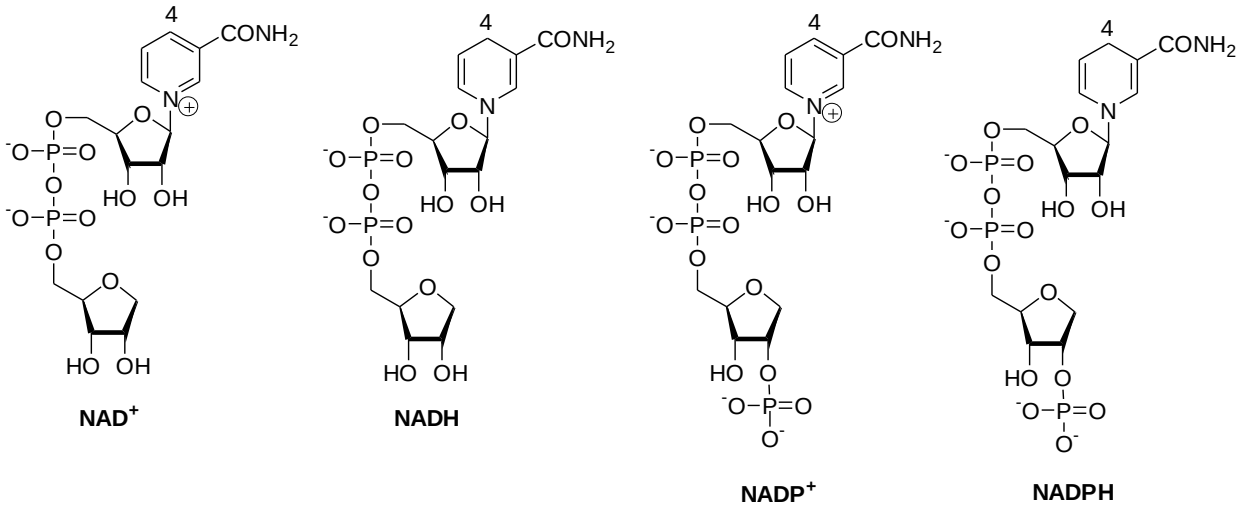


Σχήμα 3: Κανόνας του Prelog.

Γενικά, η πλειοψηφία των αφυδρογονασών ακολουθεί τον κανόνα του Prelog και στις αναγωγές που καταλύουν οδηγούν στον σχηματισμό *S* - αλκοολών. Ωστόσο, υπάρχουν ελάχιστα ένζυμα που οδηγούν στην αντίθετη εκλεκτικότητα και ονομάζονται anti – Prelog ένζυμα. Οι περισσότερες κετορεδουκτάσες ανήκουν στη κατηγορία Ε3 (Σχήμα 2) δηλαδή κατά την αναγωγή μεταφέρουν το pro *(R)* υδρογόνο στην *re* – επιφάνεια του καρβονυλίου.

Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες και αναγέννηση συνενζύμου

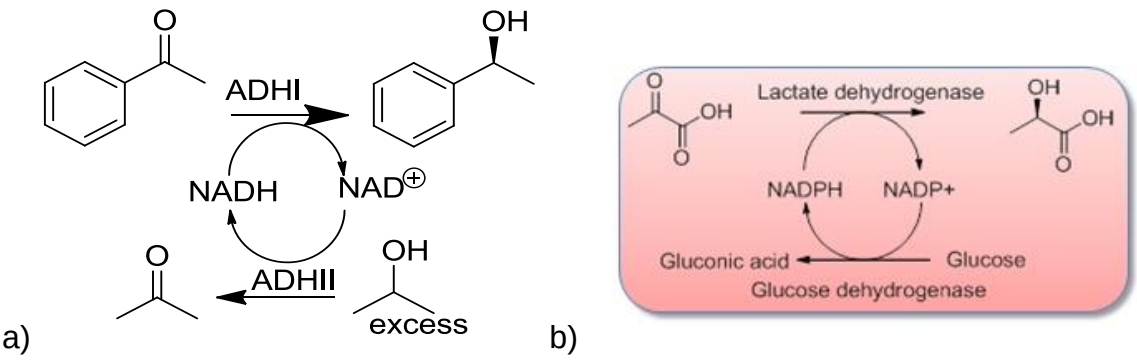
Για να είναι ένα ένζυμο λειτουργικό θα πρέπει να συνυπάρχει και ο συμπαράγοντας. Το νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD^+) και το 2 – φωσφορυλιωμένο άλας ($NADP^+$) είναι ο συνηθέστερος συμπαράγοντας στις καταλυόμενες από οξειδοαναγωγικά ένζυμα αντιδράσεις. Ο νικοτιναμιδικός τους δακτύλιος είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός. Έχει τη δυνατότητα να δεχτεί ένα υδρίδιο ώστε να σχηματιστούν οι ανηγμένες μορφές NADH και NAD(P)H αντίστοιχα (Σχήμα 4). Κάθε οξειδοαναγωγικό ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά το ένα από τα δύο διαστερεοτοπικά υδρογόνα του άνθρακα 4 του νικοτιναμιδικού δακτυλίου σε μία καρβονυλομάδα του υποστρώματος.[17]



Σχήμα 4: Οι νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες NAD^+, NADH, $NAD(P)^+$ και NAD(P)H.

Γενικά και οι δύο μορφές του συμπαράγοντα είναι αποικοδομίσιμες στα υδατικά διαλύματα, με την ανηγμένη μορφή να είναι πιο σταθερή στα βασικά διαλύματα και την οξειδωμένη στα όξινα. Έτσι, οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις γίνονται περίπου σε ουδέτερο pH, που είναι μία ενδιάμεση τιμή, ώστε να διατηρούνται σταθεροί οι συμπαράγοντες.

Ο συμπαράγοντας σε μία ενζυμική αντίδραση πρέπει να μπορεί να αναγεννάται προκειμένου να χρησιμοποιηθεί και πάλι στον επόμενο ενζυμικό κύκλο. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία αναγέννησης συχνά είναι ακριβότερη από το επιθυμητό προϊόν.[18] Όπως είναι γνωστό, υπάρχουν αρκετά ενζυμικά ανακυκλωτικά συστήματα του NADH και NAD(P)H. Το επικρατέστερο ανακυκλωτικό σύστημα είναι αυτό με τον συνδυασμό δύο ανεξάρτητων ενζύμων γνωστό σαν «Coupled – Enzyme Approach» [19] (Σχήμα 5). Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μέθοδος θα πρέπει τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται να παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες ως προς το υπόστρωμά τους, ώστε οι δύο ενζυμικές αντιδράσεις να γίνονται ανεξάρτητα και το βοηθητικό υπόστρωμα να μην ανταγωνίζεται το υπόστρωμα της αντίδρασης για τη θέση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου θα γίνει η μετατροπή του αντιδρώντος στο επιθυμητό προϊόν.[20]

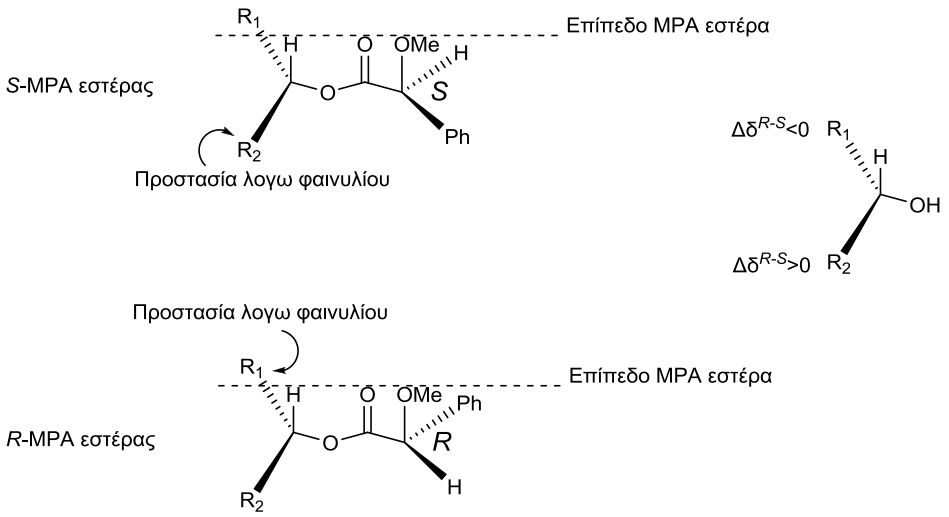


Σχήμα 5: a) Αναγέννηση του συμπαράγοντα NADH με χρήση δύο ενζύμων και βοηθητικό υπόστρωμα ισοπροπανόλη. b) Αναγέννηση του NADPH με χρήση δύο αφυδρογονασών και βοηθητικού υποστρώματος γλυκόζης.

Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων που απομονώνονται ή συνθέτονται στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται, όλο και πιο συχνά, απλές και αξιόπιστες μεθόδοι. Η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος είναι αυτή της κλασσικής ανισοτροπίας, την οποία πρώτοι πρότειναν και εφάρμοσαν οι Dale και Mosher[21] και αργότερα άλλοι σπουδαίοι ερευνητές στο πέρασμα του χρόνου.[22,23] Η μέθοδος αυτή αποτελεί ακόμα την απλούστερη και ταυτόχρονα πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων στο φάσμα ^{1}H NMR των δυο διαστερεομερών εστέρων, οι οποίοι προκύπτουν από την παραγοντοποιήση της επιθυμητής αλκοόλης με τα δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστηρίου ανισοτροπίας, όπως για παράδειγμα το α-μεθοξυ-τριφθορομεθυλο-φαινυλοξικό οξύ (MTPA) ή το α-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA).[21,23]

Στη βιβλιογραφία υπάρχει μία μεγάλη ποικίλια μοντέλων διαμόρφωσης για τα διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας, τα οποία εξηγούν τα φάσματα ^{1}H NMR και μας οδηγούν στο να προβλέψουμε την απόλυτη στερεοχημεία των ενώσεων. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της απόλυτης στεροδομής ήταν το μοντέλο διαμόρφωσης για το αντιδραστήριο MPA (Σχήμα 6).

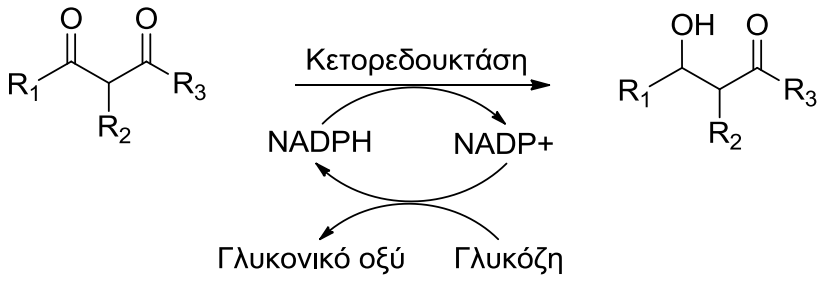


Σχήμα 6. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους *(R)*-MPA και *(S)*-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6 , στη διαμόρφωση των MPA-εστέρων (προέκυψαν από την εστεροποίηση της επιθυμητής αλκοόλης με τα δύο χειρόμορφα αντιδραστήρια MPA) το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και η μεθόξυ ομάδα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Έτσι, κάθε μία από τις δύο ομάδες R_1 και R_2 της αλκοόλης έχει απέναντί της ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη που είναι είτε υδρογόνο είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα, η ομάδα R_1 του (*R*)-MPA εστέρα έχει απέναντι της ένα φαινύλιο, ενώ η ομάδα R_2 έχει ένα υδρογόνο. Σε αντίθεση, η ομάδα R_1 του (*S*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η R_2 ένα φαινύλιο.

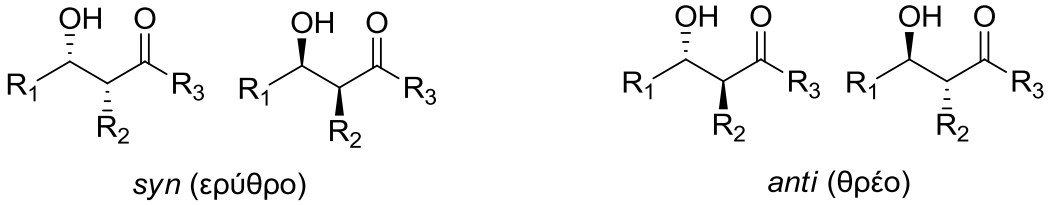
Γενικά η ομάδα R_1 που βρίσκεται προς την πλευρά του φαινυλίου στον *(R)*-MPA εστέρα, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλότερα ppm) στο φάσμα ^{1}H NMR, λόγω προστασίας, σε σχέση με την αντίστοιχη του *(S)*-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά που παρατηρείται στις μετατοπίσεις στο φάσμα ^{1}H NMR για την ομάδα R_1 μεταξύ του *(R)*-MPA και του *(S)*-MPA εστέρα να είναι αρνητική ($\Delta\delta^{R-S}<0$). Αντιστοίχως, η 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 που παρατηρείται για την ομάδα R_2 μεταξύ του *(R)*-MPA και του *(S)*-MPA εστέρα να είναι θετική ($\Delta\delta^{R-S}>0$). Λόγω αυτών των διαφοροποιήσεων στο φάσμα ^{1}H NMR μεταξύ του *(R)*-MPA και του *(S)*-MPA εστέρα είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των δευτεροταγών αλκοολών.

Ένα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορεί να προσδιοριστεί μόνο το ασύμμετρο κέντρο που φέρει την υδροξυλομάδα και όχι και τα γειτονικά ασύμμετρα κέντρα. Είναι όμως απαραίτητο να γνωρίζουμε την σχετική στερεοδομή και των δύο ασύμμετρων κέντρων για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής μίας οργανικής ένωσης που φέρει δύο στερεογονικά κέντρα.



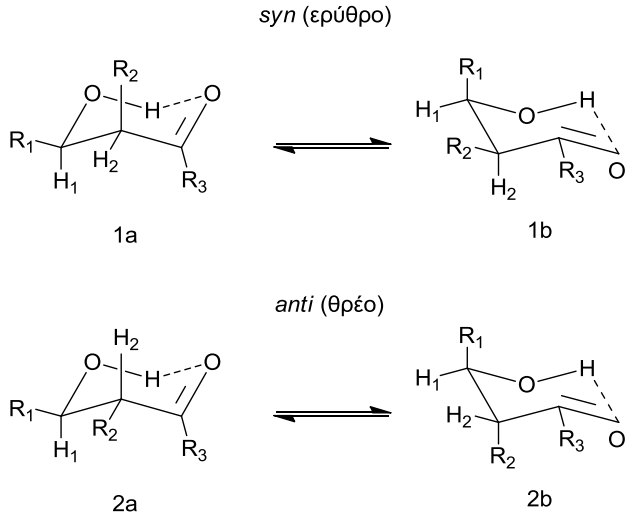
Σχήμα 7. Ενζυμική σύνθεση α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.

Οι α-αλκυλο-β-υδροξυ-καρβονυλο ενώσεις χρήζουν μεγάλης σημασίας στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση αφού αποτελούν ενδιάμεσα για τη σύνθεση πολλών φυσικών προϊόντων (Σχήμα 7). Απαντούν σε δύο διαστερεομερείς διαμορφώσεις την *syn* ή *ερύθρο* και την *anti* ή *θρέο* (Σχήμα 8).



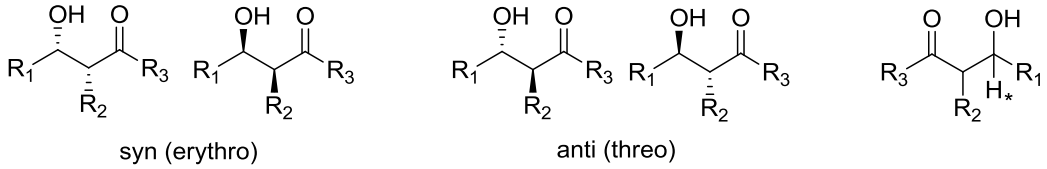
Σχήμα 8. Οι διαστερεομερείς διαμορφώσεις *syn* (ερύθρο) και *anti* (θρέο).

Η ιδιαιτερότητα αυτών των ενώσεων είναι ότι το υδροξύλιο που βρίσκεται σε β-θέση σε σχέση με το καρβονύλιο έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου και κυκλοποιήση των ενώσεων αυτών σε δύο διαμορφώσεις (Σχήμα 9). Σε συνδυασμό με την ύπαρξη ενός υδρογόνου στην α-θέση παρατηρείται διαφοροποίηση των τιμών σύζευξης των πρωτονίων H_1 και H_2 των *syn* και *anti* ισομερών αντίστοιχα στα φάσματα ^1H NMR τους.



Σχήμα 9: Κυκλικές μορφές των α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.

Σε αυτή την ιδιαιτερότητα των ενώσεων αυτών και στη διαφοροποίηση των τιμών σύζευξης των πρωτονίων H_1 και H_2 βασίστηκε η ερευνητική μας ομάδα και πραγματοποίησε τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής διαφόρων α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων μετρώντας τις τιμές της σταθεράς σύζευξης.[24] Όπως αποδείχθηκε, η φασματοσκοπία ^{1}H NMR αποτελεί μια ισχυρή τεχνική για τον απευθείας προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής τέτοιων ενώσεων. Μια ακόμα σημαντική διαπίστωση είναι ότι σε όλες τις περιπτώσεις μονοϋποκατεστημένων ενώσεων το καρβινολικό υδρογόνο του *anti* ισομερούς εμφανίζεται συστηματικά σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο υδρογόνο του *syn* ισομερούς (Πίνακας 1).



	Καρβινολικό πρωτόνιο (ppm)	Δδ $^{syn\ anti}$ (ppm)
syn (erythro)	3.800 – 4.246	0.049 – 0.236
anti (threo)	3.568 – 4.108	

Πίνακας 1: Διακύμανση απορρόφησης καρβινολικού πρωτονίου στις δυο διαστερεομερείς ενώσεις *syn* και *anti*.

Ο συνδυασμός των δύο αυτών παρατηρήσεων χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των τριών φερομονών συνάθροισης του κανθάρου των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp.* Η συγκεκριμένη σύνθεση έγινε με χημειοενζυμικό τρόπο, το στάδιο κλειδί πραγματοποιήθηκε με χρήση κετορεδουκτασών.

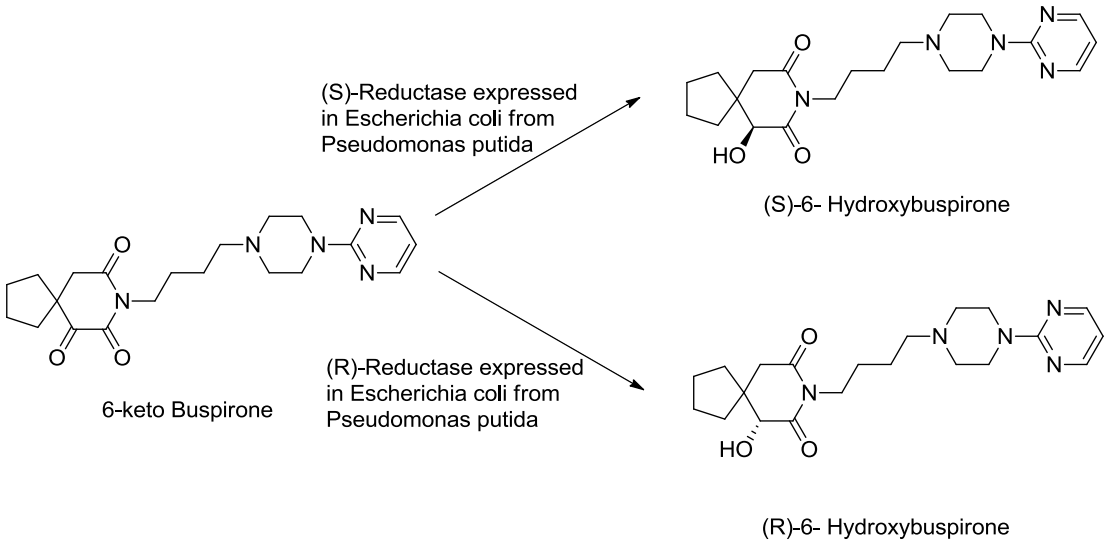
ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ ΣΤΗΝ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Η χειρομορφία στα μόρια είναι ο παράγοντας κλειδί για την βιολογική δραστικότητα πληθώρας φυσικών προϊόντων καθώς και φαρμάκων. Έτσι, οι φαρμακευτικές βιομηχανίες αναζητούν διαρκώς περισσότερους διαφορετικούς καταλύτες για τη σύνθεση οπτικώς ενεργών ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια σημαντικό ρόλο στην ασύμμετρη σύνθεση έχουν οι κετορεδουκτάσες, και η χρήση τους στην σύνθεση φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων ολοένα και ενισχύεται όπως φαίνεται και στα παραδείγματα που ακολουθούν.

Αγχολυτικά φάρμακα

Η Buspirone είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του άγχους και της κατάθλιψης. Ο ρόλος του είναι να προσδένεται στον υποδοχέα 5HT1A σεροτονίνης, ο οποίος δρα στο ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα) και επάγει την αναστολή μεταφοράς σημάτων στους νευρώνες που ελέγχουν το άγχος, τον ύπνο, τη διατροφή κ.α. Το Buspirone και οι μεταβολίτες του (προκύπτουν από αντιδράσεις υδροξυλίωσης) δρουν σαν αγωνιστές, αφού ενισχύουν τη δράση του νευροδιαβιβαστή. Ο κύριος μεταβολίτης του είναι η 6-υδροξυ βουσπιρόνη, η οποία αν και προσδένεται με τον υποδοχέα 5HT1A λιγότερο ισχυρά από την ίδια τη Buspirone στο ανθρώπινο αίμα βρίσκεται 30 – 40 φορές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτή της Buspirone μετά από μια δόση του φαρμάκου. Γι' αυτό τον λόγο θεωρείται ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης είναι υπεύθυνος για την αγχολυτική δράση του φαρμάκου. Για την ανάλυσή της, η παρασκευή και η δοκιμή των δύο εναντιομερών μορφών της, καθώς και του ρακεμικού μείγματος ήταν απαραίτητη και έδειξαν ότι και τα δύο εναντιομερή είναι αποτελεσματικά. Το *(R)* – εναντιομερές προσδένεται πιο ισχυρά και παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τον υποδοχέα, ενώ το *(S)* – εναντιομερές παραμένει περισσότερη ώρα στο αίμα. Η

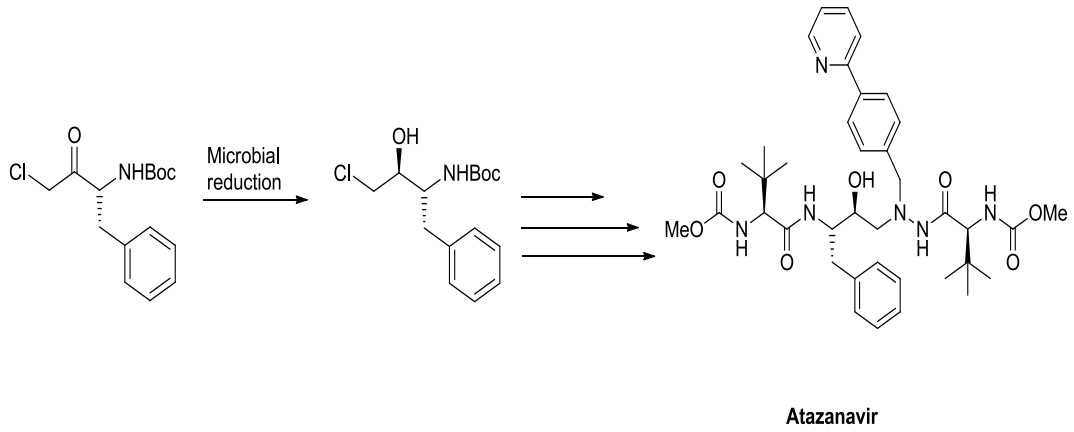
εναντιοεκλεκτική αναγωγή της 6-υδροξυ βουσπιρόνης πραγματοποιήθηκε από τον Patel και την ερευνητική του ομάδα του στην φαρμακευτική εταιρεία Bristol – Myers - Squibb. Για να το πετύχουν αυτό χρησιμοποίησαν μια πληθώρα μικροοργανισμών με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το καλύτερο ένζυμο εκφράστηκε σε κύτταρα E. Coli με την ταυτόχρονη ύπαρξη του συμπαράγοντα NADPH και ανακυκλωτικού συστήματος με απόδοση >98% και υψηλά ποσοστά εναντιομερικής περίσσειας (Σχήμα 10).[25]



Σχήμα 10: Εναντιοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή της 6-κετο βουσπιρόνης[25].

Αντι-ιικά φάρμακα

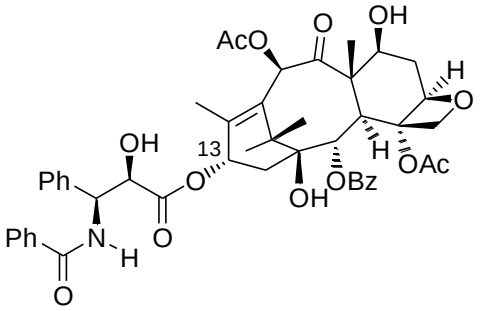
Το Atazanavir, γνωστό και σαν Reyataz, είναι ένα αντιρετροϊκό φάρμακο και ένας ισχυρός αναστολέας της πρωτεάσης του HIV, το οποίο εγκρίθηκε πρόσφατα από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ για τη θεραπεία του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Βασικό στάδιο του κύκλου ζωής της ασθένειας αυτής είναι η πρωτεολυτική διαδικασία των πρόδρομων πρωτεϊνών με το ένζυμο HIV-1 πρωτεάση. Έτσι, αναστολή του ενζύμου αυτού θα έχει σαν αποτέλεσμα να σταματά η αντιγραφή του ιού. Το στάδιο κλειδί στη σύνθεση του συγκεκριμένου HIV – αναστολέα είναι το χειρόμορφο ενδιάμεσο **α**. Για τη σύνθεση του χρησιμοποιήθηκαν τρεις μικροοργανισμοί με δράση κετορεδουκτάσης και η ενζυμική αντίδραση είχε απόδοση >90% και υψηλά ποσοστά διαστερομερικής και εναντιοεκλεκτικής περίσσειας (Σχημα 11).[26]



Σχήμα 11: Χημειοενζυμική σύνθεση του Atazanavir.

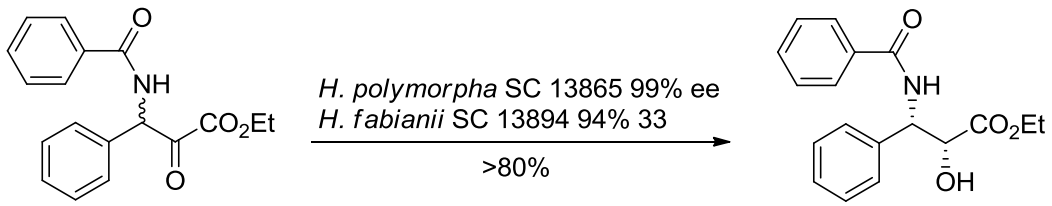
Αντικαρκινικά φάρμακα

Το paclitaxel ή Taxol, είναι ένα πολύπλοκο, πολυκυκλικό διτερπένιο που δρα στις πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων (Σχήμα 12). Οι συγκεκριμένες πρωτεϊνες είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό της ατράκτου κατά τη διαίρεση των κυττάρων.



Σχήμα 12: Paclitaxel ή Taxol

Το paclitaxel έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου, όπως τον καρκίνο των ωοθηκών και τον καρκίνο του μαστού. Είναι η μόνη γνωστή ένωση που παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους. Το στάδιο κλειδί στη σύνθεση αυτής της πολύπλοκης ένωσης είναι η χρήση δύο διαφορετικών μικροοργανισμών από τους ερευνητές της φαρμακευτικής εταιρείας Bristol – Meyers - Squibb προκειμένου να αναχθεί ενζυμικά ένας α-κετο εστέρας (Σχήμα 13). Η απόδοση ξεπέρασε το 80% και το επιθυμητό προϊόν προέκυψε με μεγάλη οπτική καθαρότητα.[27]

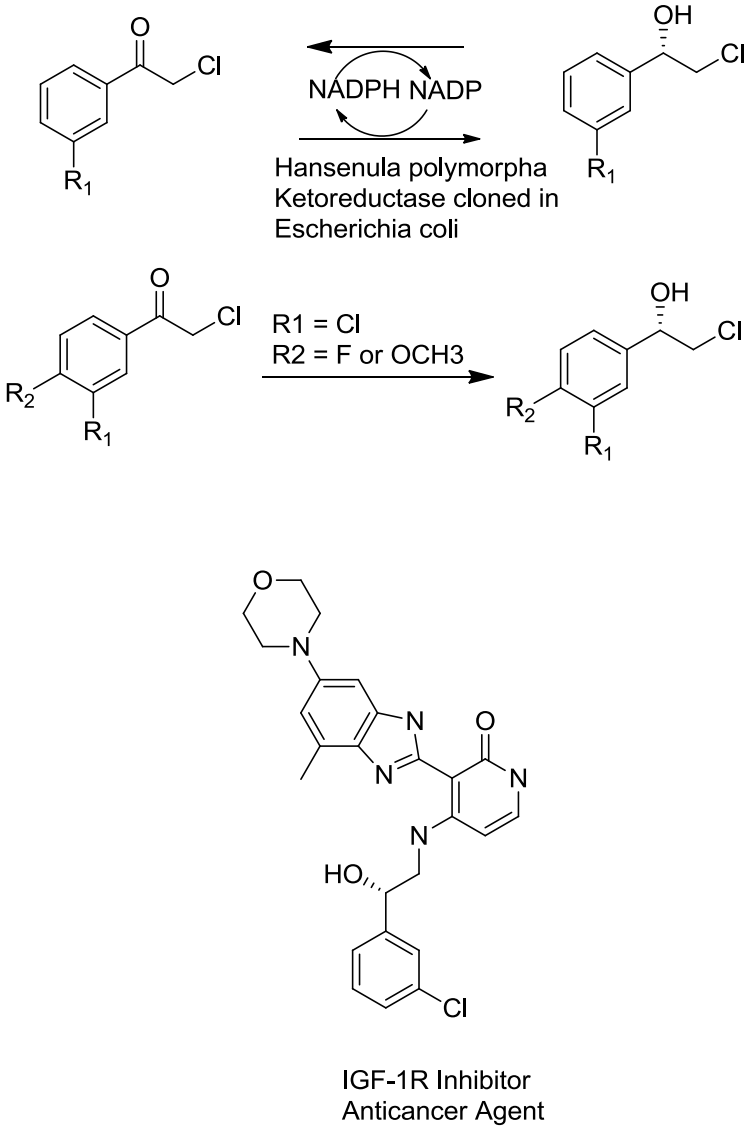


Σχήμα 13: Ενζυμική αναγωγή του α-κετο εστέρα.

Αναστολέας του IGF-1 υποδοχέα

Ο υποδοχέας ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των ανθρώπινων κυττάρων. Είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας, που ενεργοποιείται από μια ορμόνη που ονομάζεται ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1), καθώς και μία συγγενική ορμόνη, την IGF-2. Ανήκει στην μεγάλη κατηγορία των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης. Αυτός ο υποδοχέας διαμεσολαβεί στις επιδράσεις της IGF-1, η οποία είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη πρωτεϊνικής φύσεως και παρόμοια προς τη μοριακή δομή της ινσουλίνης. Η ορμόνη αυτή παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και συνεχίζει να έχει αναβολικές επιδράσεις στους ενήλικες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ότι μπορεί να διεγείρει την υπερτροφία του σκελετικού μυός καθώς και άλλων ιστών στόχων. Λόγω του μεγάλου φάσματος βιολογικών επηρροών τους και της θεραπευτικής δυνατότητας τους, οι IGF έχουν γίνει το επίκεντρο της έρευνας. Η στόχευση του μονοπατιού σηματοδότησης της IGF αντιπροσωπεύει μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη νέων θεραπειών ενάντια στον καρκίνο. Ως φάρμακο στόχος, το σύστημα IGF έχει μια σειρά από βασικά χαρακτηριστικά που την καθιστά ελκυστική. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι πολλές μορφές καρκίνου σχετίζονται με παρεκκλίνουσα σηματοδότηση του IGF, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του προστάτη, του καρκίνου του παγκρέατος, του μελανώματος, του οστεοσαρκώματος, και κακοηθειών της παιδικής ηλικίας κ.α. Η σύνθεση του αντικαρκινικού IGF - 1R αναστολέα απαιτεί τη σύνθεση του χειρόμορφου ενδιαμέσου *(S)*-2-χλωρο-1-(3-χλωρο-φαινυλο) αιθανόλης (Σχήμα 14). Η ενζυμική αναγωγή πραγματοποιήθηκε με κλωνοποιημένη σε E. Coli

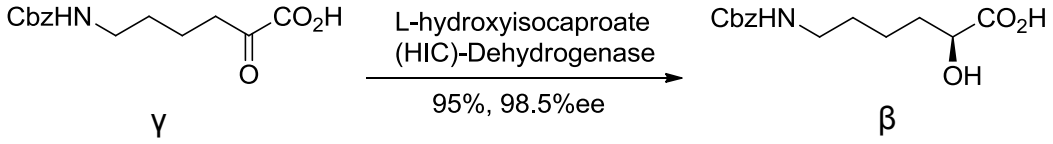
κετορεδουκτάση από μικροοργανισμό *Hansenula Polymorpha.* Το χειρόμορφο προϊόν συντέθηκε σε υψηλή απόδοση και εξαιρετική πτική καθαρότητα.[28]



Σχήμα 14: Εναντιοεκλεκτική σύνθεση του ενδιαμέσου *(S)* -2-χλωρο-1-(3-χλωρο-φαινυλο) αιθανόλη μέσω ενζυμικής αναγωγής με κετορεδουκτάση.[28]

Αντιυπερτασικά φάρμακα

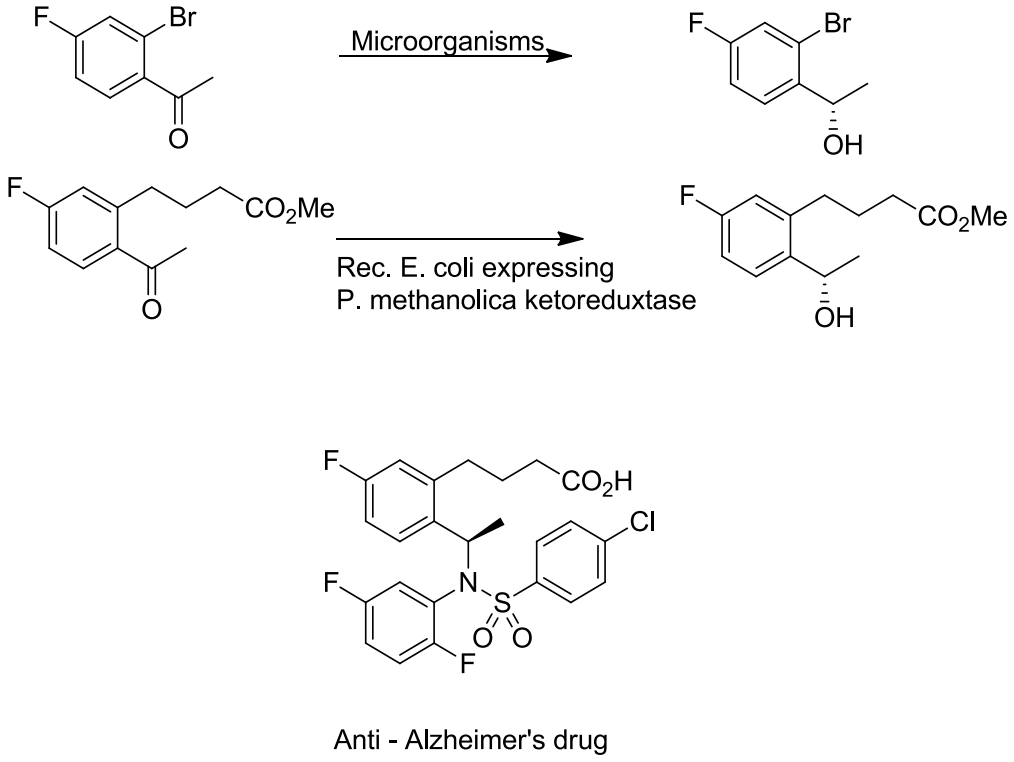
Η ceranopril είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται κατά της υπέρτασης[29]. Είναι αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η μετατροπή της από αγγειοτενσίνη τύπου I σε αγγειοτενσίνη II. Για τη σύνθεσή της χρειάζεται η ενώ[illegible]μεση ένωση **β** η οποία προκύπτει με ενζυμική αναγωγή του α-κετο οξέος **γ** (Σχήμα 15).[30]



Σχήμα 15: Ενζυμική αναγωγή του ενδιαμέσου της ceranopril.

Φάρμακα κατά του Alzheimer

Τα χειρόμορφα ενδιάμεσα *(S)*-2-βρωμο-4–φθορο-φαινυλο-1-αιθανόλη και *(S)*-μεθυλο-4-2-ακετυλο-5-φθορο-φαινυλο βουτανόλη (Σχήμα 16) είναι πιθανά χειρόμορφα ενδιάμεσα για τη σύνθεση του φαρμάκου κατά του Alzheimer.[31,32] Η σύνθεση τους πραγματοποιήθηκε με εναντιοεκλεκτική μικροβιακή αναγωγή με υψηλά ποσοστά εναντιοεκλεκτικότητας και απόδοσης.[33]



Σχήμα 16: Φάρμακο κατά του Alzheimer.

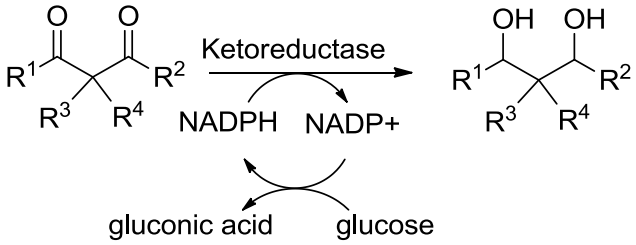
Όλα τα παραπάνω παραδείγματα αποτελούν απόδειξη της μεγάλης σημασίας της χρήσης των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση. Το μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης τους οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν την

ικανότητα να πραγματοποιούν στερεοεκλεκτική και τοποεκλεκτική αναγωγή με υψηλά ποσοστά μετατροπής έως και 100%. Έτσι είναι δυνατόν να σχηματιστούν ενδιάμεσες χειρόμορφες ενώσεις με εξαιρετικά υψηλή οπτική καθαρότητα (>99% ee), κάτι που είναι απαραίτητο για την σύνθεση χειρόμορφων φαρμακευτικών προϊόντων.

Βιοκαταλυτικές αναγωγές από την ερευνητική μας ομάδα

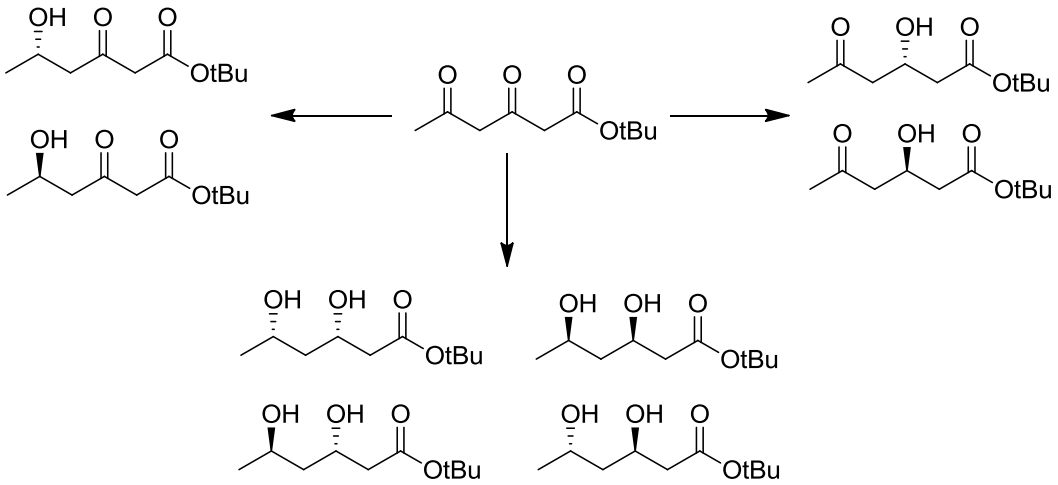
Η ερευνητική μας ομάδα δραστηριοποιείται στον τομέα της βιοκατάλυσης με ιδιαίτερη έμφαση στην ασύμμετρη σύνθεση βιοενεργών ενώσεων με χρήση βιοκαταλυτικών μεθόδων. Η ενασχόληση μας με ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις περιλαμβάνει μελέτες με χρήση διαφόρων ενζύμων, όπως αφυδρογονάσες[34], χλωρο-υπεροξειδάσες[35], εστεράσες[36], λιπάσες[37] και κετορεδουκτάσες είτε για τον σχηματισμό πρόδρομων οπτικά καθαρών ενώσεων είτε φυσικών προϊόντων. Την τελευταία δεκαετία έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μας εκτενείς μελέτες σε βιοκαταλυτικές αναγωγές ποικιλίας καρβόνυλο υποστρωμάτων (κορεσμένες δικετόνες, β-κετο-εστέρες, β,δ-δικετο-εστέρες) με τη χρήση κετορεδουκτασών.

Για πρώτη φόρα το 2005 παρουσιάστηκε από την ομάδα μας η διαστερεο- και εναντιοεκλεκτική αναγωγή α-αλκυλο-1,3 δικετονών καθώς και α-αλκυλο-β-κετοεστέρων. Για τις αναγωγικές αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 20 διαφορετικές και εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες, οι οποίες αποδείχθηκαν εξαιρετικοί βιοκαταλύτες, με υψηλή δραστικότητα και στερεοεκλεκτικότητα (>99% ee, >99% de). Τα προϊόντα αναγωγής σχηματίστηκαν με υψηλή οπτική καθαρότητα και σε μεγάλες αποδόσεις (Σχήμα 17).[38]



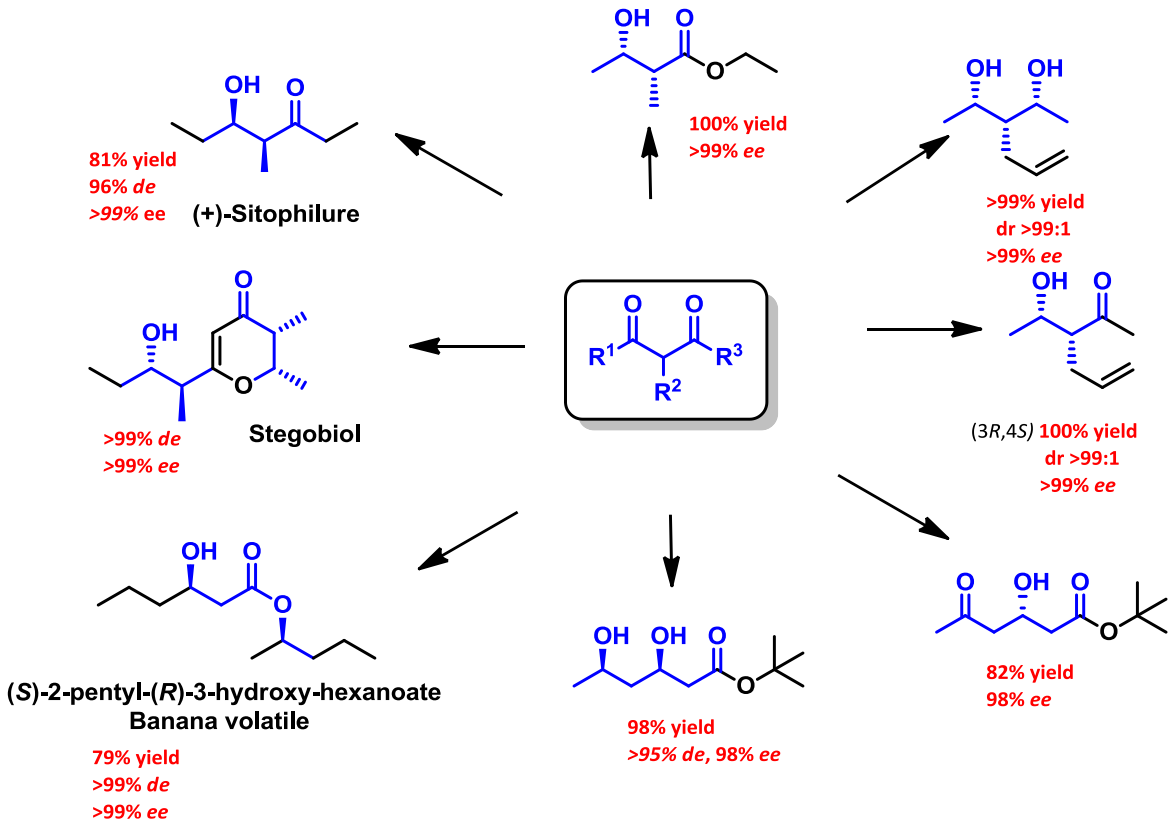
Σχήμα 17: Ενζυμική αναγωγή α-αλκυλο-1,3 δικετονών και α-αλκυλο-β-κετο-εστέρων με κετορεδουκτάσες.

Στη συνέχεια ακολούθησαν εκτενείς μελέτες για τις ενζυμικά καταλυόμενες αναγωγές σε πιο περίπλοκα υποστρώματα, όπως οι β,δ-δικετο-εστέρες. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα ο 3,5-διοξοεξανοϊκός *τριτ*-βουτυλεστέρας και δοκιμάστηκαν 23 εμπορικά διαθέσιμες απομονωμένες κετορεδουκτάσες (Σχήμα 18). Έτσι, σχηματίστηκαν τα 7 από τα 8 δυνατά στερεοϊσομερή προϊόντα αναγωγής με υψηλή οπτική καθαρότητα. Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η στερεοεκλεκτική σύνθεση των τεσσάρων στερεοϊσομερών διυδροξυ-εστέρων σε μία φιάλη (one pot reaction) με τον συνδυασμό των κατάλληλων αναγωγικών ενζύμων και χωρίς την απομόνωση του ενδιάμεσου προϊόντος διπλής αναγωγής.[39]



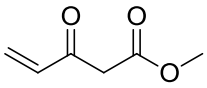
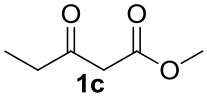
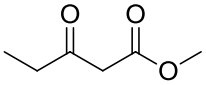
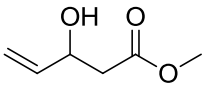
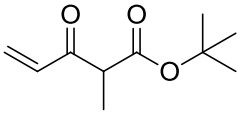
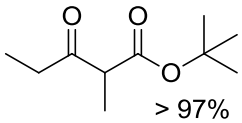
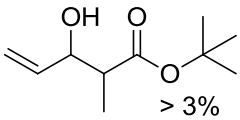
Σχήμα 18: Τα 8 πιθανά προϊόντα αναγωγής του 3,5-διοξοεξανοϊκού *τριτ*-βουτυλ-εστέρα[39].

Οι βιοκαταλυτικές αυτές μέθοδοι εφαρμοστεί από την ερευνητική μας ομάδα για τη χημειοενζυμική σύνθεση πολλών φυσικών προϊόντων ή χειρόμορφων ενδιαμέσων, όπου το στάδιο κλειδί των συνθέσεων αυτών είναι η΄χρήση των κατάλληλων ενζύμων για τον σχηματισμό των επιθυμητών χειρόμορφων ενώσεων με υψηλά ποσοστά μετατροπής και εξαιρετική χημική καθαρότητα. Στο σχήμα 19 παρουσιάζονται συνοπτικά τα φυσικά προϊόντα[37,40,41] και τα χειρόμορφα ένδιαμεσα,[39,42,43,44] που έχουν συντεθεί στο εργαστήριο μας με αυτή τη μεθοδολογία.



Σχήμα 19: Σύνθεση χρήσιμων χειρόμορφων ενδιαμέσων και φυσικών προϊόντων με NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.

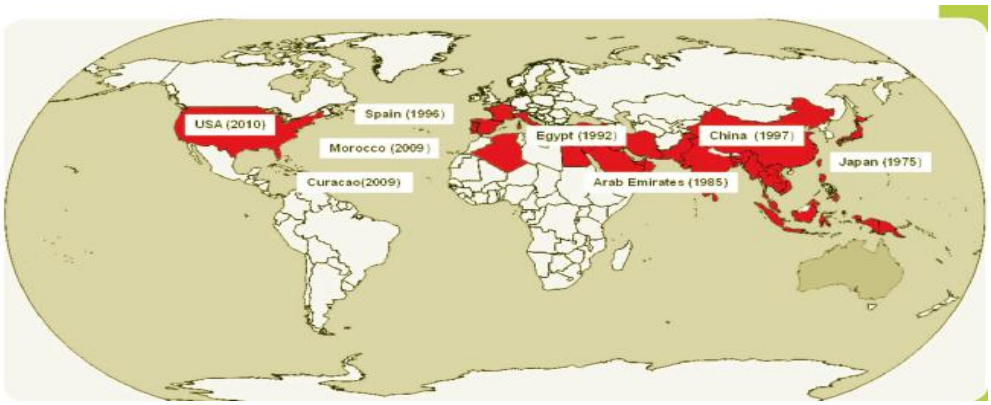
Πρόσφατα έχουν μελετηθεί σαν υποστρώματα α,β-ακόρεστες καρβόνυλο ενώσεις, οι οποίες με ενζυμική αναγωγή σχηματίζουν αλλυλικές αλκοόλες και υδροξυ-εστέρες (σημαντικά ενδιάμεσα σε πληθώρα φυσικών προϊόντων).[46] Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 20, οι ενζυμικές αναγωγές είχαν υψηλά ποσοστά μετατροπής και σχηματίστηκαν υψηλής οπτικής καθαρότητας αλκοόλες σε μικρούς χρόνους αντίδρασης. Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση από τη μελέτη αυτή είναι ότι σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε διπλή αναγωγή από μερικά ένζυμα. Ανάχθηκε τόσο το καρβονύλιο όσο και ο διπλός δεσμός άνθρακα-άνθρακα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία της διπλής αναγωγής έγινε διαδοχικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με ένα αργό και ένα γρήγορο στάδιο. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανότητα οφείλονταν σε ανεπιθύμητες προσμίξεις ενζύμων με άλλες πρωτεϊνες που δρούν σαν ene-ρεδουκτάσες.

Υπόστρωμα	α/α	Kred	Ποσοστό Μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν/τα[b]
		105	**100% (3h)**	 **1c**
		108	**100% (3h)**	
		118	**100% (3h)**	
		107	**100% (3h)**	 >97%
		A_1B	**100% (3h)**	 < 3%
		B_1F	**100% (3h)**	
		104	**100% (12h)**	 > 97%  > 3%
		105	**100% (12h)**	
		116	**100% (12h)**	
		A_1B	**100% (12h)**	
		106	30% (12h)	
		126	20% (12h)	
		126	**100% (12h)**	
		126	35% (12h)	

Σχήμα 20: Διπλή αναγωγή με κετορεδουκτάσες.

Κόκκινος ρυγχωτός κάνθαρος των φοινικοειδών

Ο κόκκινος ρυγχωτός κάνθαρος των φοινικοειδών, *Rhynchophorus ferrugineus,* αποτελεί το πιο επικίνδυνο και θανατηφόρο παράσιτο των φοινικοειδών όπως οι χουρμαδιές, οι κοκκοφοίνικες, του φοινικέλαιου, του φοίνικα σάγου και άλλων ειδών φοινικοειδών.[46] Οι πρώτες πληροφορίες για τον κόκκινο ρυγχωτό κάνθαρο των φοινικοειδών δημοσιεύτηκαν το 1981 στην Ινδία. Αρχικά είχε περιγραφεί ως ένα σοβαρό παράσιτο του κοκκοφοίνικα το 1906, ενώ το 1917 περιγραφόταν ως ένα σοβαρό παράσιτο της χουρμαδιάς στο Punjab της Ινδίας. Το 1918, ο κόκκινος ρυγχωτός κάνθαρος των φοινικοειδών πιθανόν προκάλεσε σοβαρές ζημιές στις χουρμαδιές της Μεσοποταμίας (Ιράκ) αλλά η έλλειψη συλλογής εντόμων δεν επιτρέπει την επιβεβαίωση της εξάπλωσης. Εμφανίστηκε για πρώτη φορά στον Περσικό κόλπο στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έχει γίνει το πιο καταστροφικό παράσιτο των χουρμαδιών στη Μέση Ανατολή. Το 1992 επισημάνθηκε στην Αίγυπτο και το 1994 στην Ισπανία και από εκεί σε όλη την Ευρώπη και την Ελλάδα το 2005. Το 1999 εμφανίστηκε στο Ισραήλ, την Ιορδανία και τη Παλαιστίνη. Η εξάπλωσή του οφείλεται τόσο στην ευρεία εισαγωγή φοινικοειδών από χώρες της ανατολής και την Αίγυπτο, όσο και στο γεγονός ότι οι αρμόδιες υπηρεσίες της Ευρώπης άργησαν να πάρουν κατάλληλα μέτρα αντιμετώπισής του. Σήμερα έχει καταγραφεί σε πολλές χώρες σε διάφορα σημεία του πλανήτη, όπως η Ωκεανία, Ανατολική Ασία, Ινδία, Αμερική, Αφρική και η λεκάνη της Μεσογείου (Εικόνα 1,2). [47]



Εικόνα 1: Περιοχές εξάπλωσης του KPK παγκοσμίως.

Εικόνα 2: Περιοχές εξάπλωσης του ΚΡΚ στη λεκάνη της Μεσογείου.

Ο κόκκινος ρυγχωτός κάνθαρος των φοινικοειδών εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα το 2005 και συγκεκριμένα στη Κρήτη, με την προσβολή φοινικοειδών του γένους *Washingtonia,* οι οποίοι είχαν εισαχθεί από την Αίγυπτο, καθώς και σε φοινικοειδή του γένους *Phoenix canariensis.* Η εμφάνιση του κανθάρου στη χώρα μας επιβεβαιώθηκε από το γεωπόνο – Δρ. Βιοτεχνολογίας Δημήτρη Οικονόμου, ο οποίος προσκόμισε τα δείγματα του κανθάρου στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και εν συνεχεία στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας του Λονδίνου, όπου και επιβεβαιώθηκε η ταυτότητα του κανθάρου των φοινικοειδών. Το πρόβλημα πλέον έχει πάρει πανελλαδικές διαστάσεις, αφού έχει επεκταθεί στη Ρόδο, σε Αττική (Ωρωπό, Κάλαμο, Γλυφάδα, Ελληνικό) και στην Πελοπόννησο, ιδιαίτερα στο νομό Ηλείας. Το συγκεκριμένο έντομο αποτελεί απειλή τόσο για τα φοινικοειδή των κήπων, όσο και γι' αυτά που παράγονται στις φυτωριακές μονάδες της χώρας μας. Το πιο ανησυχητικό απ' όλα είναι ότι έχει βρεθεί το συγκεκριμένο έντομο στο φοινικόδασος στο Βάι του νομού Λασιθίου, όπου και βρίσκεται ο τελευταίος σημαντικός πληθυσμός του ενδημικού κρητικού φοίνικα ή φοίνικα του Θεόφραστου του γένους *Phoenix theoprastii.*[48]

Το *Rhynchophorus ferrugineus* είναι ένα είδος ρυγχωτού κανθάρου γνωστό ως Asian palm weevil και ανήκει στη τάξη των Κολεόπτερων της οικογένειας *Curculionidae. Είναι* πολυφάγο έντομο και προσβάλει κυρίως είδη φοινικοειδών της οικογένειας *Arecaceae* όπως το *Areca catechu*, *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, *Caryota maxima*, *C. cumingii, Cocos nucifera, Corypha gebanga, C. elata, Elaeis guineensis, Livistona decipiens,*

Metroxylon sagu, Oreodoxa regia, Phoenix canariensis, Ph. dactylifera, Ph. sylvestris, Sabal umbraculifera, Trachycarpus fortunei, Washingtonia filifera κ.α., καθώς και τον αθάνατο (*Agave americana*) της οικογένειας *Agavaceae* και το ζαχαροκάλαμο (*Saccharum officinarum)* της οικογένειας *Poaceae*.

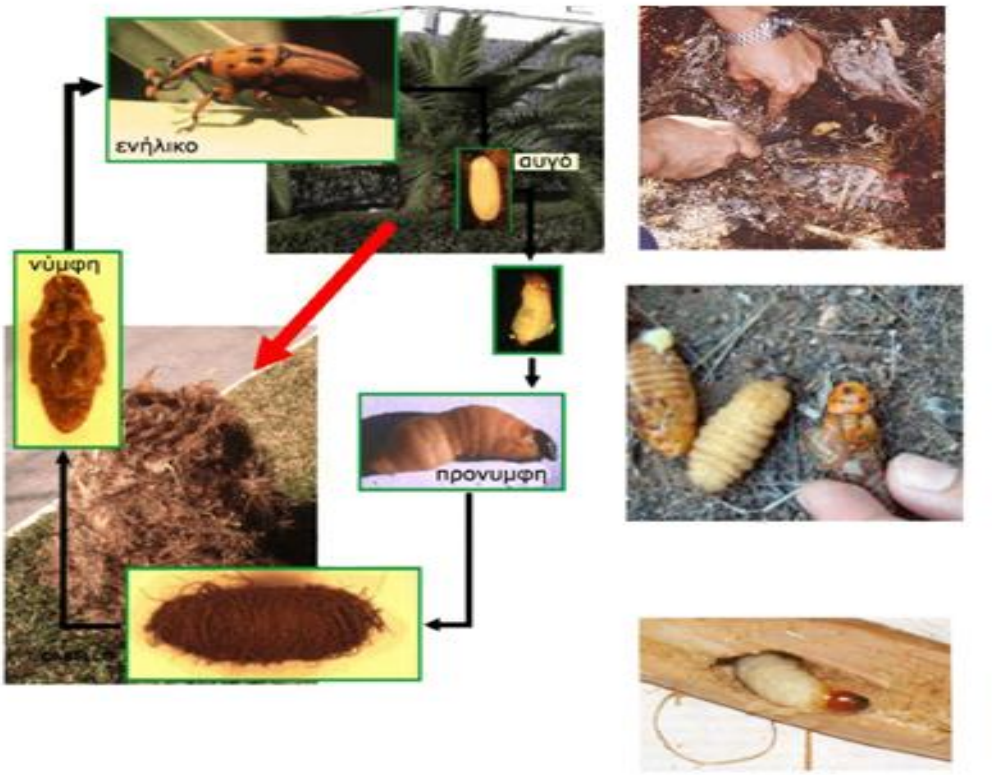
Τα ενήλικα σκαθάρια είναι πολύ μεγάλα σε μέγεθος και με μεγάλα μήκη σώματος. Το μήκος τους κυμαίνεται από 35 έως 45 mm και διαθέτουν ένα μακρύ και λεπτό ράμφος προκειμένου το θυληκό να το χρησιμοποιήσει για να διεισδύσει στον ιστό του φοίνικα και να δημιουργήσει εσόχες όπου και θα τοποθετήσει τα αυγά του. Οι διάφοροι χρωματισμοί με τους οποίους μπορείς να τα εντοπίσεις οδήγησε αρχικά στην εσφαλμένη κατάταξή τους ως διαφορετικά είδη. Γενικά, υπάρχουν δύο χρωματικές μορφές του κανθάρου, η κοκκινωπή- καφέ που συναντάται στα ενήλικα σκαθάρια και τα υπόλοιπα που έχουν πιο σκούρο χρώμα με μία κόκκινη λωρίδα (Εικόνα 3).[49]

α) b) c)

Εικόνα 3: α) *R. Ferrugineus* Κόκκινος Ρυγχωτός Κάνθαρος, b) *R.Cruentatus* Γίγας ρυγχωτός κάνθαρος, c) *R. Phoenix* Αφρικανικός ρυγχωτός κάνθαρος.

Ο κόκκινος ρυγχωτός κάνθαρος των φοινικοειδών, όπως και τα υπόλοιπα σκαθάρια, αναπτύσσεται μέσα από την πλήρη μεταμόρφωση (ωό, προνύμφη, νύμφη, άκμαιο) με όλες τις δυνατές μορφές τους να εξελίσσονται ταυτόχρονα στο εσωτερικό του φοίνικα. Τα θηλυκά μπορούν να γεννήσουν 58 – 531 αυγά σε κάθε βιολογικό κύκλο, τα οποία εκκολάπτονται σε περίπου 1-6 μέρες. Οι προνύφμες που εκκολάπτονται από τα ωά είναι χωρίς πόδια με ένα ομοιόμορφο και ελαρφύ κίτρινο χρώμα στον κορμό και καφέ κεφαλή. Μπορούν να φτάσουν σε μεγέθος περισσοτέρο απο 50 mm και τρέφονται από τους γειτονικούς μαλακούς χυμώδεις ιστούς του φοινικόδεντρου, προχωρώντας προς το κέντρο του. Οι σήραγγες που δημιουργούνται στο

πέρασμά τους είναι γεμάτες με περιττώματα και μασημένες ίνες και χυμούς του δέντρου που έχουν μια χαρακτηριστική οσμή. Οι προνύμφες μπορούν να περάσουν μέσα από 3 – 7 στάδια ωρίμανσης με διάρκεια ζωής εως και δύο μήνες, πριν μεταμορφωθούν σε νύμφες. Η ανάπτυξή τους γίνεται μέσα σε κουκούλια στις οπές και τις κοιλότητες των δέντρων και στους νέους βλαστούς ή ακόμα και στη βάση του κορμού τους. Το στάδιο της χρυσαλλίδας μπορεί να διαρκέσει 11 – 45 ημέρες. Συνολικά ο κύκλος ζωής του κανθάρου μπορεί να διαρκέσει από 45 έως 139 μέρες. Τα ενήλικα κανθάρια εκκολάπτονται από τα κουκούλια και τα θηλυκά μπορούν να γεννούν ωά για 8 – 10 εβδομάδες. Ως ενήλικες ζούν για 2 με 3 μήνες τρεφόμενοι από το φοινικοειδές, με αποτέλεσμα να περάσουν αρκετούς κύκλους ζευγαρώματος και ωοτοκίας. Ως προς το φύλο των νέων εντόμων παρατηρείται μία ελαφριά προτίμηση ως προς το θηλυκό έντομο (1,2:1) (Εικόνα 4)[50]



Εικόνα 4: Στάδια βιολογικού κύκλου *R.ferrugineus*.

Η προσβολή ενός φοινικόδεντρου από τον κόκκινο ρυγχωτό κάνθαρο δεν είναι εύκολο να ανιχνευτεί στα αρχικά στάδια της προσβολής παρά μόνο

αφού ο φοίνικας έχει υποστεί σοβαρή και μη αναστρέψιμη ζημιά. Τα συμπτώματα που μπορούν να εντοπιστούν στα αρχικά στάδια της προσβολής είναι τόσο η καταστροφή των νέων βλαστών στο δέντρο καθώς και το λύγισμα των παλιών φύλλων. Το δέντρο αρχίζει να μοιάζει με ανοιχτή ομπρέλα. Με μία πιο προσεκτική ματιά θα δούμε οπές στην κορώνα ή τον κορμό του δέντρου από τις οποίες αναδύεται μία χαρακτηριστική οσμή και πιθανόν θα παρατηρείται και έκκριση ενός καφέ παχύρρευστου υγρού. Αν κάποιος ακουμπήσει το αυτί του στον κορμό ενός προσβεβλημένου δέντρου θα ακούγεται από το εσωτερικό του δέντρου ο θόρυβος από το ροκάνισμα των τρεφόμενων κάμπιων. Τα έντομα που υπάρχουν σε ένα προσβεβλημένο δέντρο δεν ματακινούνται σε άλλο δέντρο παρά μόνο όταν δεν βρίσκουν πλέον τροφή (Εικόνα 5).

Εικόνα 5: Χαρακτηριστικό παράδειγμα φοίνικα που έχει προσβληθεί από τον KPK.

Για την πρόληψη των φοινικοειδών από τον κάνθαρο των φοινικοειδών υπάρχουν διάφοροι τρόποι αντιμετώπισης.[51] Ο κυριοτέρος είναι με τη χρήση εντομοκτόνων είτε σε μορφή σκόνης ή υγρού ψεκάσματος είτε με ενέσεις στον κορμό του δέντρου. Ένας εναλλακτικός τρόπος αντιμετώπισης είναι η άμεση απομάκρυνση του προσβεβλημένου δέντρου, κάψιμο και θάψιμο του ή άλλων εγκεκριμένων μεθόδων στα γειτονικά φοινικοειδή. Η αντιμετώπιση με φερομονικές παγίδες σε ένα κατάλληλα τοποθετημένο δίκτυο παγίδευσης χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Εικόνα 6).[52] Σύμφωνα, με πρόσφατη οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης προτάθηκαν τα εξής μέτρα αντιμετώπισης:

1. Κατηγοριοποίηση του κόκκινου ρυγχωτού κανθάρου των φοινικοειδών
2. Καταγραφή των πιο ευπαθών ξενιστών
3. Ειδικές απαιτήσεις στην εισαγωγή φοινικοειδών στην ΕΕ
4. Ειδικές απαιτήσεις για τις μετακινήσεις φοινικοειδών εντός της ΕΕ
5. Ελέγχους για να διαπιστωθεί η παρουσία ή η συνεχιζόμενη απουσία του κόκκινου ρυγχωτού κανθάρου των φοινικοειδών
6. Οριοθέτηση και σχέδιο δράσης για τις περιοχές στις οποίες εντοπίζεται ο Κ.Ρ.Κ

Εικόνα 6: Τρόπος αντιμετώπισης των προσβεβλημένων φοινικοειδών από τον ΚΡΚ.

Στην Ελλάδα παρατηρείται προσβολή στους φοίνικες του γένους *Phoenix canariensis* με κυριότερα μέρη προσβολής τη στεφάνη του δέντρου. Μεγάλη σημάσια έχει και η τήρηση των κανόνων εισαγωγής των φοινικοειδών, που πρέπει να έχουν αναπτυχθεί εξ ολοκλήρου σε χώρα απαλλαγμένη από τον κάνθαρο των φοινικοειδών ή κατά τη διάρκεια της

ανάπτυξής τους βρίσκονταν σε περιοχή απαλλαγμένη από επιβλαβείς οργανισμούς και κατάλληλα εγγεγραμένους και εποπτευμενους από την εθνική υπηρεσία προστασίας φυτών της χώρας προέλευσης. Οι ίδιοι κανονισμοί ισχύουν και για τις μετακινήσεις των φοινικοειδών εντός της ΕΕ. Η οριοθέτηση των περιοχών που πάσχουν και το σχέδιο δράσης γίνεται από το κάθε κράτος μέλος και συνίστανται στα εξής μέρη:

- Τη περιοχή προσβολής όπου και έχει διαπιστωθεί η παρουσία του κόκκινου ρυγχωτού κανθάρου και συμπεριλαμβάνονται όλα τα προσβεβλημένα φυτά
- Τη ζώνη απομόνωσης σε απόσταση το λιγότερο 10 χιλιομέτρων από την προσβληθείσα ζώνη

Ωστόσο, στην Ελλάδα δεν επιτρέπεται η χρήση τοξικών εντομοκτόνων εντός του αστικού πρασίνου γεγονός που οδηγεί στην αναγκαιότητα να βρεθούν βιολογικοί τρόποι αντιμετώπισης. Έτσι, η ανάπτυξη αποτελεσματικών βιολογικών παγίδων με τη χρήση φερομονών τόσο για τη παγίδευση όσο και για την απομάκρυνση του Κ.Ρ.Κ από τις ευπαθείς περιοχές παραμένει μεγάλης σημασίας.

Η πρώτη φόρα που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η φερομόνη συνάθροισης του κόκκινου ρυγχωτού κανθάρου των φοινικοειδών του γένους *R. Ferrugineus spp.* έγινε από την ομάδα του Rochat το 1993 και προσδιορίστηκε σαν τη 4-μέθυλο-5-εννεανόλη. Με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων προσδιορίστηκε η απόλυτη στερεοδομή της στο 4*S*,5*S* στερεοϊσομερές και ονομάστηκε *Ferrugineol*. Ακολούθησαν αρκετές μελέτες για την σύνθεση της φερομόνης αυτής, χωρίς ωστόσο να έχει επιτευχθεί υψηλή διαστεροεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα μέσω των περίπλοκων συνθετικών μεθόδων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

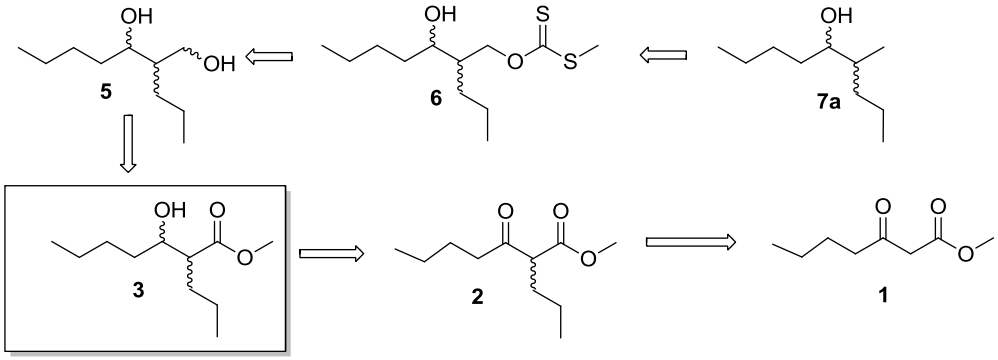
Στόχος του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης είναι η χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών συνάθροισης του κανθάρου των φοινικοειδών του γένους *Rhynchophorus spp.*

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αλκυλιωμένοι σε α θέση β κετοεστέρες για την παραγωγή των αντίστοιχων υδροξυ-εστέρων στο στάδιο κλειδί της χημειοενζυμικής σύνθεσης των φερομονών συνάθροισης. Τα προϊόντα των ενζυμικών αναγωγών έδωσαν την επιθυμητή στερεοδομή για τη σύνθεση των τριών φερομονών.

Οι βιοκαταλύτες που επιλέχθηκαν για τον σκοπό αυτό, είναι τα εμπορικά διαθέσιμα αναγωγικά ένζυμα, NAD(P)H εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες (KRED). Η επιλογή τους βασίστηκε στα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνουν, όπως υψηλή καταλυτική ικανότητα, στερεοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα, χημειοεκλεκτικότητα, αλλά και η ικανότητά τους να δέχονται ως υποστρώματα έναν μεγάλο αριθμό μορίων με διαφορετικά στερεοχημικά χαρακτηριστικά, όπως β-κετοεστέρες, δικετόνες και υδροξυ κετόνες.

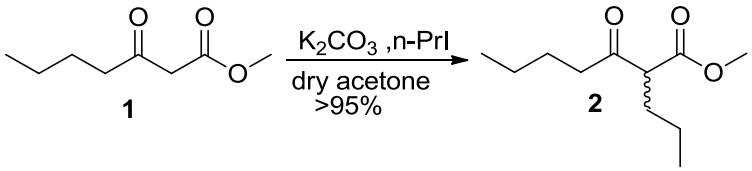
Χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών συνάθροισης

Λόγω του ότι το φυσικό προϊόν ***Ferrugineol*** **(7a)** είναι μία οπτικώς ενεργή δευτεροταγής αλκοόλη και συγκεκριμένα η (*S*)-4-μεθυλο-(*S*)-5-εννεανόλη[53], θα μπορούσε να συντεθεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξο-επτανοϊκό μεθυλεστέρα χρησιμοποιώντας την ασύμμετρη αναγωγή ως στάδιο κλειδί. Παρακάτω παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική προσέγγιση για τη σύνθεση της φερομόνης ***Ferrugineol*** (Σχήμα 21).



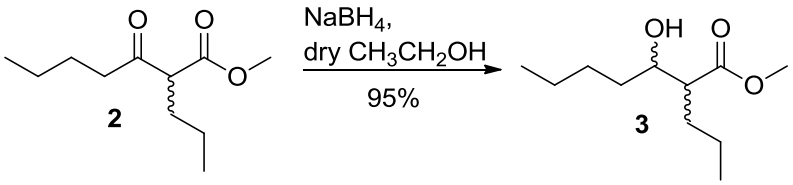
Σχήμα 21: Ρετροσύνθεση της ***Ferrugineol*** **(7)**[53].

Με μία αντίδραση αλκυλίωσης του εμπορικά διαθέσιμου 3-οξο-επτανοϊκού μεθυλεστέρα **1** παραλάβαμε τον κετοεστέρα **2** με υψηλή απόδοση (Σχήμα 22).



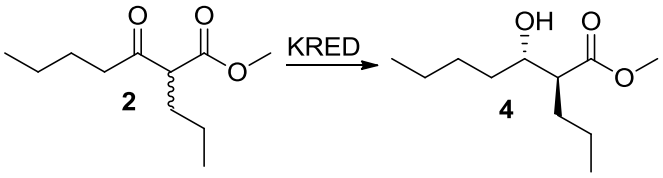
Σχήμα 22: Παρασκευή της ένωσης **2** με αντίδραση αλκυλίωσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή του κετοεστέρα **2** προς τον αντίστοιχο ρακεμικό υδροξυ-εστέρα **3** για τη χρήση του ως πρότυπο για τις ενζυμικές αναγωγές (Σχήμα 23).



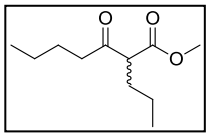
Σχήμα 23: Χημική αναγωγή για τον σχηματισμό του ρακεμικού υδροξυ-εστέρα **3**.

Αφού παραλάβαμε το πρότυπο ενδιάμεσο δοκιμάσαμε μία σειρά από αντιδράσεις αναγωγής με τις εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες για τον σχηματισμό του επιθυμητού ενδιαμέσου **4**. Επισημαίνεται ότι το στάδιο αυτό είναι το στάδιο κλειδί της προτεινόμενης σύνθεσης αφού το ενδιάμεσο που θα σχηματιστεί είναι επιθυμητό να έχει ***anti*** στερεοδομή του τελικού φυσικού προϊόντος (Σχήμα 24).



Σχήμα 24: Ενζυμική αναγωγή για τον σχηματισμό του επιθυμητού ενδιαμέσου **4**.

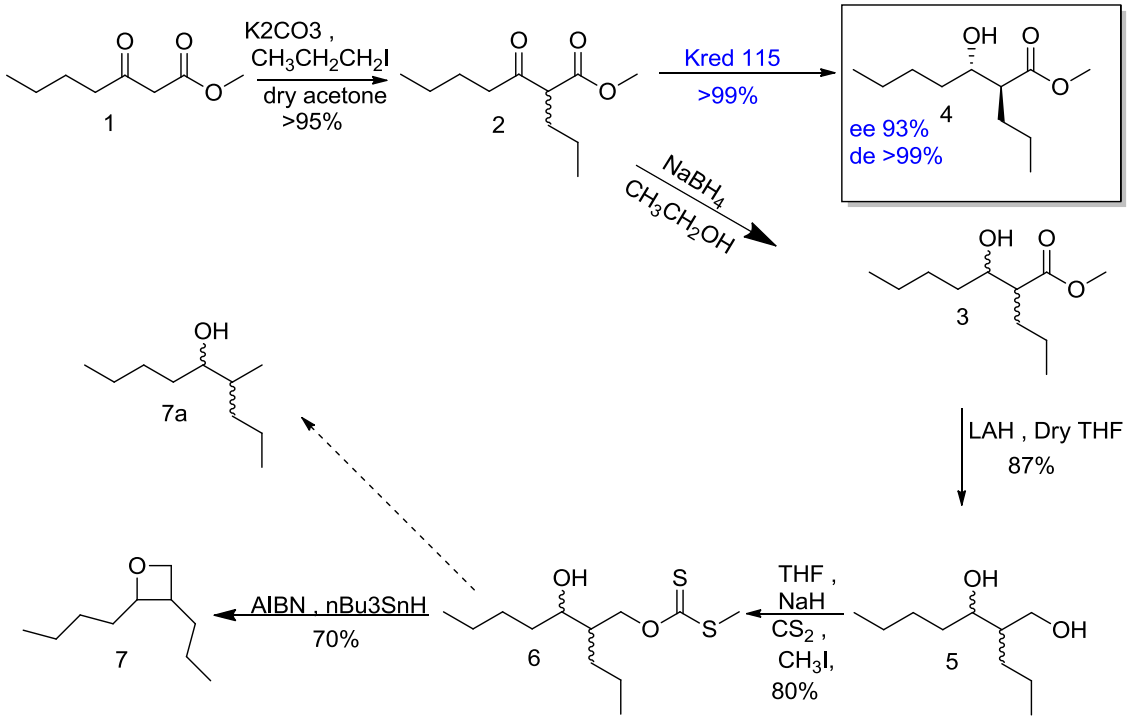
Τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών όσον αφορά τη μετατροπή, την εναντιοεκλεκτικότητα και τη διαστερεοϊσομερική περίσσεια παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	Kred	Conv. % (GC)	ee %	de %	Diastereomeric ratio %				Relative Configuration
					a	b	c	d	
	101	94	84	87	11	–	16	73	*anti*
	114	>99	98	80	17	–	70	13	*anti*
	115	>99	93	>99	7	–	93	–	*anti*
	118	51	>99	93	1	–	88	11	*anti*
	119	90	90	>99	1	–	94	5	*anti*

Πίνακας 3. Ενζυμικές αναγωγές για το ενδιάμεσο στάδιο της ferrugineol.

Από τον πίνακα φαίνεται ότι αρκετά εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα έδωσαν εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής και υψηλά ποσοστά εναντιοεκλεκτικής και διαστερεοεκλεκτικής περίσσειας. Επίσης παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις το κύριο προϊόν που παραλάβαμε είναι αυτό με την *anti* διαμόρφωση κάτι που αποδείχθηκε με φασματοσκοπία ^{1}H NMR. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κετορεδουκτάση 115 που σχημάτισε το σχεδόν αποκλειστικά το ένα διαστερομερές, το *anti* σε υψηλό ποσοστό.

Στη συνέχεια ακολουθήσαμε τη συνολική συνθετική πορεία όπως φαίνεται στο σχήμα 25 για τη σύνθεση του ρακεμικού προϊόντος.



Σχήμα 25: Χημειοενζυμική συνθετική προσέγγιση της φερομόνης ***ferrugineol***.

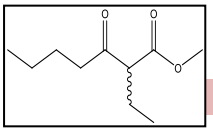
Ξεκινήσαμε από τον εμπορικά διαθέσιμο κετοεστέρα **1** και με μία αντίδραση αλκυλίωσης μετατράπηκε ποσοτικά στον κετοεστέρα **2**. Ο υδροξυ-εστέρας **4** προέκυψε με ενζυμική αναγωγή με τη KRED 115 με υψηλή οπτική καθαρότητα και απόδοση (ee 93%, de>99%). Στη συνέχεια με $LiAlH_4$ ανάχθηκε ο υδροξυ-εστέρας **4** στη διόλη **5** και μέσω της αντίδρασης Barton – Mc.Combie σχηματίστηκε αντί για την επιθυμητή ένωση **7a** το οξετάνιο **7**, σε

δύο στάδια. Αρχικά η πρωτοταγής υδροξυλομάδα μετατράπηκε στον θειεστέρα **6** και στη συνέχεια μέσω μίας αντίδρασης ριζών με χρήση AIBN σχηματίστηκε το προϊόν **7** σε απόδοση 70%.

Στο σημείο αυτό θα περιγραφεί η διαδικασία ταυτοποίησης της δομής του προϊόντος **7**. Χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μάζας (GS-MS) και πειράματα NMR (COSY, DEPT – 90, DEPT – 135, HSQC) τα οποία οδήγησαν στη συγκεκριμένη δομή για το **7**. Τα συγκεκριμένα φάσματα βρίσκονται στο παράρτημα.

Για τη σύνθεση της φερομόνης ***phoenicol* (13a),** που έχει ταυτοποιηθεί ως την (*S*)-3-μεθυλο-(*S*)-4-οκτανόλη χρησιμοποιήθηκε η ίδια ρετροσυνθετική και συνθετική πορεία με αυτή που περιγράφτηκε για τη φερομόνη ***ferrugineol* (7)**.

Και σε αυτήν τη περίπτωση δοκιμάστηκε μια σείρα από εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες και τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 4.

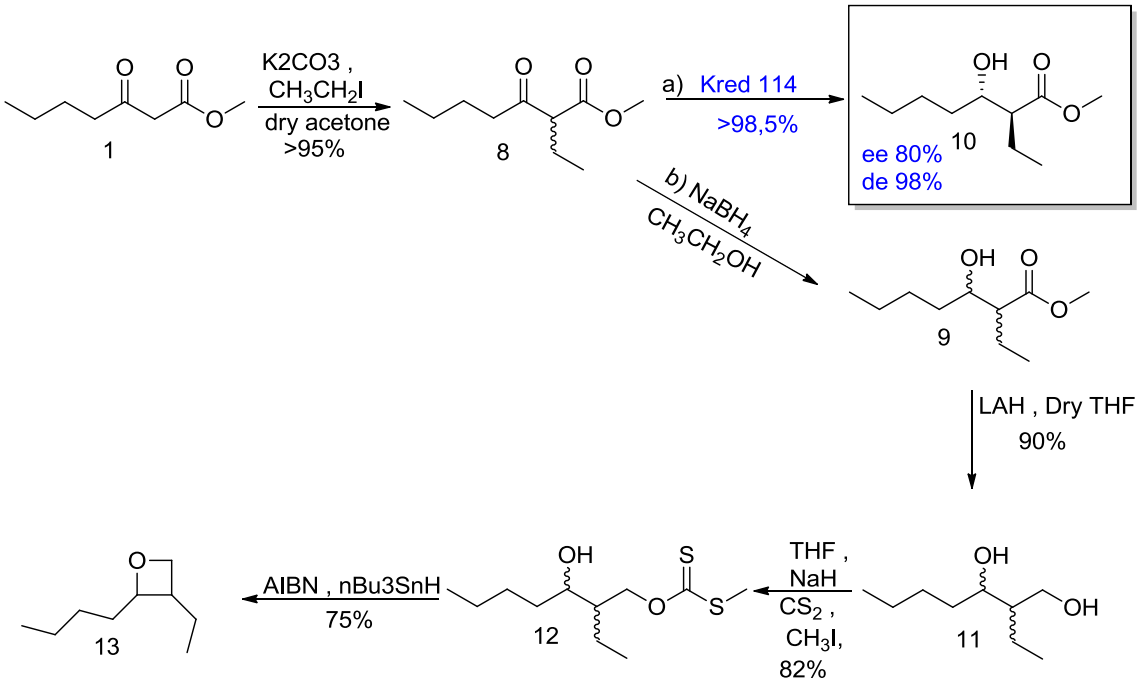
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	Kred	CONVERSION % (GC)	ee %	de %	Diastereomeric ratio %				Relative Con.
					a	b	c	d	
	101	98	40	96	4	–	70	30	*anti*
	108	98	–	94	3	–	97		*anti*
	111	92	84	96	2	–	91	7	*anti*
	113	82	78	84	7	–	85	8	*anti*
	114	98.5	80	98	1	–	89	10	*anti*
	115	87	84	94	2	–	91	7	*anti*
	118	93	96	96	2	–	97	1	*anti*
	128	91	94	94	2	–	96	2	*anti*

Πίνακας4: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών.

Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις σαν κύριο προϊόν που παραλάβαμε αυτό με την *anti* διαμόρφωση κάτι που αποδείχθηκε με φασματοσκοπία ^{1}H NMR με υψηλά ποσοστά εναντιομερικής και διαστερεομερικής περίσσειας. Το καταλληλότερο ένζυμο γι' αυτήν την αναγωγή είναι η KRED 114, όπου σχημάτισε σχεδόν μόνο το ένα

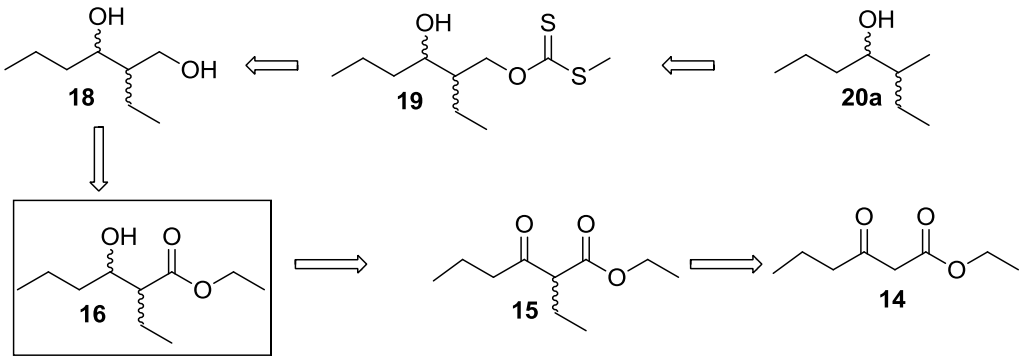
διαστερομερές, με στερεοαπεικόνιση *anti* (ee 80%, de 98%).

Στη συνέχεια ακολούθησε η συνολική συνθετική πορεία για το τελικό προϊόν, που είναι το 2-βουτυλ-3-μεθυλοξετανιο (**13**), όπως φαίνεται στο σχήμα 26.



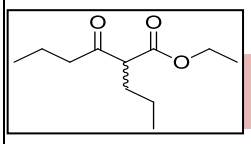
Σχήμα 26: Χημειοενζυμική συνθετική προσέγγιση της φερομόνης ***phoenicol***.

Για τη σύνθεση της φερομόνης ***cruentol*** **(20a)** ή κατα IUPAC (*S*)-4-μεθυλο-(*S*)-5-οκτανόλη[54] χρησιμοποιήθηκε η ίδια ρετροσυνθετική πορεία με αυτές για τις φερομόνες ***ferrugineol*** **(7a)** και ***phoenicol*** **(13a),** με τη μόνη διαφορά ότι η σύνθεση μπορεί να ξεκινήσει από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξο-εξανοϊκό αιθυλεστέρα και χρησιμοποιώντας πάλι μία ενζυμική ασύμμετρη αναγωγή ως στάδιο κλειδί. Η ρετροσυνθετική πορεία για τη φερομόνη **cruento*l*** παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: Ρετροσύνθεση της ***cruentol*** **(20)**.

Και σε αυτή τη συνθετική προσέγγιση το στάδιο κλειδί είναι η ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα στον υδροξυ-εστέρα με την επιθυμητή στερεοδομή. Ακολούθησαν οι δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις αναγωγής με τις εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες για τον σχηματισμό του επιθυμητού χειρόμορφου ενδιαμέσου υδροξυ-εστέρα **17** αυτή τη φορά. Στο στάδιο αυτό σχηματίζεται η επιθυμητή στερεοδομή που υπάρχει στο τελικό φυσικό προϊόν που είναι η ***anti*** διαμόρφωση. Δοκιμάστηκαν αρκετές εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες και τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	Kred	CONV. % (GC)	ee %	de %	Diastereomeric ratio %				Relative Configuration
					a	b	c	d	
	114	>99	>99	80	20	–	80	–	*anti*
	118	>99	>99	81	17	2	81	–	*anti*
	121	>99	98	>99	–	–	98	2	*anti*
	123	95	>99	90	4	5	90	–	*anti*
	BIE	30	>99	80	80	–	20	–	*syn*

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών.

Όπως συμπεραίνεται και από τον πίνακα, καταλληλότερο ένζυμο για τη

συγκεκριμένη σύνθεση είναι η KRED 121 που σχημάτισε σχεδόν μόνο το ένα διαστερομερές, με την *anti* διαμόρφωση. Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι η KRED B1E, ενώ το ποσοστό μετατροπής της ήταν χαμηλό οδήγησε στη διαμόρφωση *syn* στο τελικό προϊόν, που δεν είναι η επιθυμητή σχετική στερεοδομή σε αντίθεση με τις υπόλοιπές κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν.

Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων

Οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικά διαθέσιμες απομονωμένες κετορεδουκτάσες από την εταιρία Codexis (Inc.,Pasadena CA, USA), με καθαρότητες που αγγίζουν το 70%. Τα ένζυμα αυτά είναι εξαιρετικά σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από την αποθήκευσή τους στους -20 ^{o}C.

Το συνένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπορικά διαθέσιμο NADPH. Για την αναγέννηση του συνενζύμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανακύκλωσης γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης,[19] υλικά επίσης εμπορικά διαθέσιμα. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο ανακυκλωτικό σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνει τη D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ ανάγοντας ταυτόχρονα το $NADP^+$ σε NADPH (Σχήμα 11). Είναι γνωστό ότι το συγκεκριμένο ένζυμο (GDH) είναι καθαρά εξειδικευμένο για τη D-γλυκόζη, οπότε δεν οξειδώνει το προϊόν της αντίδρασης (αλκοόλη). Έτσι με τη χρήση του συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται η χρήση καταλυτικής ποσότητας του συνενζύμου ελαττώντας το κόστος των ενζυμικών αντιδράσεων.

Λόγω της παραγωγής γλυκονικού οξέος κατά την αντίδραση και για τη διατήρηση του pH, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 6.9, τιμή στην οποία τα ένζυμα εμφανίζουν αρκετά καλή δραστικότητα και σταθερότητα, καθώς και το συνένζυμο είναι σταθερό για περίπου 18 με 24 ώρες. Συνεπώς όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις διάρκεσαν έως 24 ώρες. Η θερμοκρασία των αντιδράσεων διατηρήθηκε στους 37 ^{o}C, μία τιμή στην οποία τα ένζυμα και τα συνένζυμα διατηρούν τη σταθερότητά τους, αλλά και για την αποφυγή παράπλευρων χημικών αντιδράσεων και παραπροϊόντων.

Σε κάθε περίπτωση για τη δοκιμή της κατάλληλης ενζυμικής αναγωγής

πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων. Πριν από τις ενζυμικές αντιδράσεις, παρασκευάστηκε όλη η σειρά των πιθανών προϊόντων σε ρακεμική μορφή με χημική μέθοδο για χρήση ως πρότυπα. Για την εύρεση των πιο δραστικών και εκλεκτικών ενζύμων, το κάθε υπόστρωμα εξετάστηκε με μία σειρά κετορεδουκτασών.

Προσδιορίστηκε το καταλληλότερο πρόγραμμα αέριας χρωματογραφίας τόσο για τον έλεγχο της πορείας των ενζυμικών αντιδράσεων, όσο και της εναντιοεκλεκτικότητας και της διαστερεοεκλεκτικότητας. Ο αέριος χρωματογράφος είναι εφοδιασμένος με χειρόμορφη τριχοειδή κολώνα και τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία ^{1}H και ^{13}CNMR.

Τέλος, μετά από την δοκιμή του υποστρώματος με τις κετορεδουκτάσες και την εύρεση του καταλληλότερου ενζύμου, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σχετικής και απόλυτης στερεοδομής του οπτικά ενεργού προϊόντος.

Συνοψίζοντας, πραγματοποιήθηκε η χημειοενζυμική προσέγγιση για τη σύνθεση των τριων φερομονών συνάθροισης του κανθάρου των φοινικοειδών *Rhynchophorus spp.* Η επιθυμητή στερεοδομή επιτεύχθηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων κετορεδουκτασών στο στάδιο κλειδί της αναγωγής του κατάλληλου κετο-εστέρα στον αντίστοιχο υδροξυ-εστέρα και προσδιορίστηκε ότι είναι η *anti* διαμόρφωση. Όλες οι ενζυμικές αναγωγές έδωσαν εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής και με υψηλή οπτική καθαρότητα. Κάθε στάδιο ενζυμικής αναγωγής μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα σε μεγαλύτερη κλίμακα. Η συγκεκριμένη προσεγγιστική συνθετική πορεία βασίστηκε σε απλά και εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα, με αρκετά καλές αποδόσεις και χωρίς τη χρήση σταδίων προστασίας και αποπροστασίας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. Αντιδραστήρια:

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν των εταιριών Sigma- Aldrich, Merck και Fluka. Οι διαλύτες αυτοί ήταν αρκετά υψηλής καθαρότητας και δε χρειάστηκε περαιτέρω επεξεργασία ή καθαρισμό. Στις αντιδράσεις που ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε χρειαζόταν να είναι ξηρός πήραμε διαλύτες που προήλθαν από απόσταξη. Στη περίπτωση του ξηρού τετραϋδροφουρανίου (THF), η ξήρανση έγινε ,με απόσταξη τρετραϋδροφουρανίου με παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικό και βενζοφαινόνης ως δείκτη. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στις ενζυμικές αντιδράσεις παρασκευάστηκε με τη γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο. Οι κετορεδουκτάσες, το συνένζυμο NADPH και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) ήταν της εταιρίας Codexis και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περεταίτω καθαρισμό.

Β. Όργανα:

Τα προϊόντα των χημικών αντιδράσεων ταυτοποιήθηκαν με τη λήψη φασμάτων ^{1}H και ^{13}C με το φασματόμετρο 300MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τερταμέθυλοσιλάνιο (TMS) σε διαλύτη $CDCl_3$. Οι εκλεκτικότητες των ενζυμικών αντιδράσεων μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο της Shimadzu με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (30m × 0.25mm × 0.25μm, 20% permethylated Cyclodextrin-B Part No 112-2532).

Γ. Γενικές συνθετικές μεθόδοι:

Αλκυλίωση β-κετοεστέρων

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε 10 ml άνυδρης ακετόνης προστίθενται 9.48 mmol προξηραμένου ανθρακικού καλίου (K_2CO_3). Στο μείγμα προστέθηκαν στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση 9.48 mmol του εμπορικά διαθέσιμου κετοεστέρα. Μετά το πέρας 5 λεπτών προστέθηκαν στάγδην 11.66 mmol κατάλληλου αλκυλοϊωδιδίου και το μείγμα αφείνεται σε reflux για 24 ώρες. Με το τέλος της αντίδρασης που παρακολουθηθήκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας προστέθηκαν 20 ml αιθέρα και το μείγμα διηθήθηκε υπό

κενό για την απομάκρυνση των αλάτων και το διήθημα συμπηκνώθηκε ώστε να απομακρυνθεί ο οργανικός διαλύτης. Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με NMR φασματομετρία. Απόδοση >95%.

Χημική αναγωγή με $NaBH_4$

Σε 10 ml αιθανόλης προστίθενται 2.15 mmol $NaBH_4$. Στους 0 ^oC προστίθενται στάγδην 5.37 mmol κετοεστέρα διαλυμένα σε 5 ml αιθανόλης. Το μείγμα αναδεύεται για 2-4 ώρες στους 0 ^oC και η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται αργά στους 0 ^oC περίπου 1 ml κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl και το διάλυμα συμπυκνώται. Κατόπιν προστίθενται 20 ml Brine και το μείγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2×20 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνεται με συμπύκνωση υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 6/1). Απόδοση 85-95%.

Ενζυμική αναγωγή κετοστέρα

Σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 200 mM και pH= 6.9 προστίθενται 25 mM κετοεστέρα, 2 mg/ml κετορεδουκτάση, 2.5 mM (2 mg) NADPH, 100 mM (18 mg) γλυκόζη και 2 mg/ml αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στους 37 ^0C για 24 ώρες. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το συγκεκριμένο πρωτόκολο.

Εστεροποίηση υδρόξυ-εστέρων με οξικό ανυδρίτη

Σε 25 mM υποστρώματος διαλυμένο σε 1 ml ξηρού CH_2Cl_2 στους 0 ^oC, προστίθενται 30 μl οξικού ανυδρίτη και καταλυτική ποσότητα DMAP (1 μl). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι το πέρας της, που διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά από εκχυλίση και ξήρανση παραλαμβάνεται το προϊόν σε απόδοση 90%.

Αναγωγή υδρόξυ- εστέρων με $LiAlH_4$ (LAH)

Σε 10 ml άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (THF) προστίθενται 3.19 mmol $LiAlH_4$ στους 0 ^oC. Εν συνεχεία προστίθενται στάγδην 2.66 mmol

υποστρώματος διαλυμένο σε 5 ml ξηρού THF. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 2 ml NaOH 10% και πραγματοποιούνται 4 εκχυλίσεις με EtOAc. Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται με συμπύκνωση. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 10:1). Απόδοση 85 - 90%.

Σχηματισμός υδρόξυ- θειεστέρα

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 5 mmol της αντίστοιχης διόλης σε 5 ml ξηρού THF. Στη συνέχεια προστίθενται 6 mmol NAH 60% διαλυμένα σε 5 ml ξηρού THF. Μετά από 30 λεπτά προστίθενται στάγδην 10 mmol CS_2 και το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα από το πέρας 30 λεπτών προστίθενται 9 mmol MeI και το μείγμα θερμαίνεται στους 50 ^oC για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διάλυμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται ύστερα από χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 10:1). Απόδοση 80-90%.

Απομάκρυνση θειεστέρα προς σχηματισμό αλκοόλης

Σε 10 ml ξηρού τολουενίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται 5 mmol υποστρώματος, 0.5 mmol AIBN και 25 mmol nBu_3SnH και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Μετά το πέρας 30 λεπτών προστίθενται ελαιόλουτρο και το διάλυμα θερμαίνεται στους 110 ^oC (η θερμοκρασία επιτυγχάνεται μέσα σε 10 λεπτά) για 30 λεπτά. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και με την ολοκλήρωσή της το διάλυμα αφήνεται να επιστρέψει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνεται με συμπύκνωση. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 10:1). Απόδοση 60-75%.

Σύνθεση MPA εστέρων α-αλκυλο-β-υδροξυ εστέρων

Σε διάλυμα της αντίστοιχης δευτεροταγούς αλκοόλης (0.1 mmol), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 0.11 mmol (1.1eq, 23 mg) DCC, 0.11 mmol

(1.1eq, 18 mg) του αντίστοιχου (R) ή (S) MPA και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0^oC για 6 ώρες, το μείγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό.Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 5:1). Απόδοση 90%.

Δ. Σύνθεση υποστωμάτων:

Σύνθεση των α-υποκατεστημένων-β-κετοεστέρων

- **2-αιθυλο-3οξοεπτανοϊκό μεθυλεστέρα (8) .** Υπό ατμόσφαιρα αζώτου 1500 mg, (9.48 mmol) του εμπορικά διαθέσιμου 3-οξοεπτανοϊκού μεθυλεστέρα προστέθηκαν σε 10ml άνυδρης ακετόνης που περιείχαν διαλυμένα 1438 mg (9,48 mmol) ανθρακικού καλίου (K_2CO_3). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν στάγδην 943 μl (11.60 mmol) αιθυλοϊωδιδίου. Το μείγμα θερμαίνεται έως reflux για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Το πέρας της αντίδρασης διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στο μείγμα προστέθηκαν 20ml αιθέρα και το διάλυμα διηθήθηστηκε υπό κενό. Η απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη έγινε στον ρότορα. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε χωρίς περεταίρω καθαρισμό στις επόμενες αντιδράσεις. Απόδοδη >95%. ^1H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.71 (s, 3H), 3.34-.3.39 (t, 1H, J=7.3 Hz), 2.42-2.60 (m, 2H), 1.82-1.92 (m, 2H), 1.50-1.60 (m, 2H), 1.23-1.35 (m,2H) και 0.86-0.93 (q, 6H, J=7,0 Hz). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 12.0, 13.8, 21.7, 22.1, 25.5, 52.3, 60.5, 170.3 και 205.5.

- **2-προπυλο-3οξοεπτανοϊκό μεθυλεστέρα (2).** Υπό ατμόσφαιρα αζώτου 1500 mg, (9.48 mmol) του εμπορικά διαθέσιμου 3-οξοεπτανοϊκού μεθυλεστέρα προστέθηκαν σε 10ml άνυδρης ακετόνης που περιείχαν διαλυμένα 1311 mg (9.48 mmol) ανθρακικού καλίου (K_2CO_3). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν στάγδην 1137 μl (11.60 mmol) προπυλοϊωδιδίου. Το μείγμα θερμαίνεται έως reflux για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Το πέρας της αντίδρασης

διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στο μείγμα προστέθηκαν 20 ml αιθέρα και το διάλυμα διηθήθηστηκε υπό κενό. Η απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη έγινε στον ρότορα. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε χωρίς περεταίρω καθαρισμό στις επόμενες αντιδράσεις. Απόδοδη >95%. ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.70 (s, 3H), 3.43-3.47 (t, 1H, OH), 2.40-2.59 (m, 2H), 1.76-1.85 (dt, 2H, J=7.0 Hz), 1.49-1.59 (m, 2H), 1.25-1.32 (m,4H) και 0.86-0.93 (q, 6H, J=14.1 Hz). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 13.8 (2C), 20.7, 22.1, 25.5, 30.3, 41.5, 52.2, 58.7, 170.4 και 205.5.

- **2-προπυλο-3οξοεξανοϊκό αιθυλεστέρα (15).** Υπό ατμόσφαιρα αζώτου 1500 mg, (9.48 mmol) του εμπορικά διαθέσιμου 3-οξοεξανοϊκού αιθυλεστέρα προστέθηκαν σε 10ml άνυδρης ακετόνης που περιείχαν διαλυμένα 1311 mg (9,48 mmol) ανθρακικού καλίου (K_2CO_3). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν στάγδην 943 μl (11.60 mmol) αιθυλοϊωδιδίου. Το μείγμα θερμαίνεται έως reflux για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Το πέρας της αντίδρασης διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στο μείγμα προστέθηκαν 20 ml αιθέρα και το διάλυμα διηθήθηστηκε υπό κενό. Η απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη έγινε στον ρότορα. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στις επόμενες αντιδράσεις. Απόδοδη >95%. ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.13-4.20 (q, 2H, J=14 Hz), 3.39-3.44 (t, 1H, J=7 Hz), 2.44-2.52 (m, 2H), 1.77-1.82 (m, 2H), 1.56-1.63 (m, 2H), 1.22-1.27 (m,5H) και 0.87-0.93 (m, 6H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 13.5, 13.8, 14.0, 16.8, 20.6, 30.2, 43.6, 58.9, 61.1, 169.9 και 205.4.

Χημική αναγωγή των κετοεστέρων 2, 8 και 15 για τη σύνθεση των αντίστοιχων ρακεμικών αλκοολών 3, 9 και 16

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστέθηκαν 81,24 mg (2.14 mmol) $NaBH_4$ σε 10 ml άνυδρης αιθανόλης (EtOH) και το διάλυμα ψύχθηξε στους 0 ^{o}C. Στη θερμοκρασία αυτή προστέθηκαν στάγδην 1000 mg (5.36 mmol) του

αντίστοιχου κέτοεστέρα διαλυμένα σε 5ml άνυδρης αιθανόλης. Το μείγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους 0 ^{o}C και η αντίδραση ελεγχόταν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε στάγδην κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (1 ml) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε στον ρότορα. Κατόπιν προστέθηκαν 20 ml Brine και το μείγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2×20 ml). Η οργανική φάση που συλλέχθηκε ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό.

- **Ρακεμική αλκοόλη 3:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.77(s, 1H – *syn*), 3.70 (s, 3H), 3.65 (s, 1H – *anti*), 2.42-2.49 (m, 2H), 1.64-1.74 (m, 2H), 1.50-1.59 (m, 4H), 1.38-1.44 (m,4H), 1.27-1.34 (m, 10H) και 0.87-0.93 (m, 12H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 14.0, 14.1, 14.0, 14.3, 20.6, 21.0, 22.0, 27.9, 28.1, 29.1, 31.8, 34.0, 35.4, 50.7, 50.8, 51.5, 51.6, 72.1, 72.3, 176.1 και 176.3.

- **Ρακεμική αλκοόλη 9:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.77-3.78 (m, 1H - *syn*), 3.70-3.71 (m, 6H), 3.65-.3.67 (m, 1H – *anti*), 2.36-2.39 (m, 2H), 1.67-1.74 (m, 4H), 1.40-1.47 (m, 4H), 1.30-1.34 (m,6H) και 0.88-0.93 (m, 12H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 11.8, 12.2, 14.0, 14.1, 20.1, 22.5, 22.6, 22.7, 27.8, 28.0, 34.0, 35.2, 51.5, 51.5, 52.4, 52.6, 71.9, 73.9, 175.9 και 176.1.

- **Ρακεμική αλκοόλη 16:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.08-4.20 (m, 4H), 3.77-3.80 (m, 1H - *syn*), 3.63-3.71 (m, 1H – *anti*), 2.39-2.49 (m, 2H), 1.52-1.75 (m, 4H), 1.33-1.47 (m, 6H), 1.22-1.31 (m,12H) και 0.86-0.93 (m, 12H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 13.9, 14.0, 14.2, 14.3, 18.9, 19.1, 20.5, 20.9, 28.9, 31.7, 36.3, 37.8, 50.6, 50.7, 59.8, 59.9, 60.4, 60.4, 71.7, 72.0, 174.4 και 175.8.

Αναγωγή των ρακεμικών β-υδροξυ-εστέρων με $LiAlH_4$ για τη σύνθεση των ρακεμικών διολών 5, 11 και 18

Σε διάλυμα $LiAlH_4$ 10 ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστέθηκαν 122.26 mg (3.22 mmol) LAH στους 0 ^{o}C. Στο διάλυμα προστέθηκαν στάγδην

500 mg (2.68 mmol) υποστρώματος και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και με το πέρας της προστέθηκαν 2ml NaOH 10% και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με τη προσθήκη EtOAc (4×10ml). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε στον ρότορα. Το καθαρό προϊόν παραλήφθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 20:1). Απόδοση 75-85%.

- **Ρακεμική διόλη 5:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.89-3.94 (dd, 1H, J=2.5 Hz), 3.63-3.83 (m, 2H), 2.23 (s, 2H), 1.33-1.69 (m, 11H) και 0.89-0.93 (t, 6H, J=6.4 Hz). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 14.0 (2C), 14.3 (2C), 20.4, 20.8, 22.7 (2C), 27.3, 27.9, 28.5, 30.8, 32.9, 35.3, 43.9, 44.0, 64.1, 64.9, 75.6 και 76.0.

- **Ρακεμική διόλη 11:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.90-3.94 (dd, 1H, J=2.5 Hz), 3.65-3.84 (m, 2H), 2.80-2.83 (d, 2H, J=11 Hz), 1.52-1.58 (m, 2H), 1.40-1.48 (m, 2H), 1.29-1.38 (m,4H) και 0.88-0.96 (m, 6H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 6.3, 6.7, 11.7, 12.2, 14.0, 17.9, 21.4, 22.7, 27.9, 28.5, 32.9, 35.3, 45.8, 45.9,.63.7, 64.5, 75.5 και 75.7.

- **Ρακεμική διόλη 18:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) δ 3.81-3.94 (m, 2H), 3.61-3.79 (m, 2H), 2.90 (s, 2H), 1.17-1.66 (m, 9H) και 0.88-0.93 (m, 6H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si) 14.09, 14.10, 14.35, 18.93, 19.49, 20.39, 20.83, 27.38, 30.85, 35.29, 37.80,.43.91, 43.97, 64.16, 64.88, 75.29 και 75.70.

Σύνθεση των ρακεμικών θειεστέρων 6, 12 και 19 από τις αντίστοιχες ρακεμικές διόλες

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν 250mg (1.56 mmol) της αντίστοιχης διόλης σε 5 ml ξηρού THF. Στη συνέχεια προστέθηκαν 74,88 mg (1.87 mmol) NAH 60% διαλυμένα σε 5 ml ξηρού THF. Μετά από 30 λεπτά προστέθηκαν στάγδην 189 μl (3,12 mmol) CS_2 και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ύστερα από το

πέρας 30 λεπτών προστέθηκαν 175 μl (2,81 mmol) MeI και το μείγμα θερμάνθηκε στους 50 ^{o}C για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διάλυμα αφέθηκε να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε. Το προϊόν της αντίδρασης παρελήφθηκε ύστερα από χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 10:1). Απόδοση 85-90%.

- **Ρακεμικός θειεστέρας 6:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.70-4.75 (m, 1H), 4.58-4.63 (dd, 2H, J=4.4 Hz), 3.67-3.74 (d, 1H, J=20Hz), 2.56 (s, 3H), 1.92-1.93 (m, 1H), 1.33-1.57 (m, 12H) και 0.89-0.93 (m, 6H).

- **Ρακεμικός θειεστέρας 12:**^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.70-4.76 (m, 1H), 4.63-.4.64 (m, 1H), 3.66-3.74 (m, 1H), 2.56 (s, 3H), 1.76-1.85 (m, 1H), 1.33-1.56 (m, 8H) και 0.89-1.01 (m, 6H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 11.6, 12.2, 14.0, 18.9, 21.1, 22.6, 22.7, 28.1, 28.4, 33.7, 34.50, 44.6, 44.7, 71.6, 73.5, 74.1 και 172.2.

- **Ρακεμικός θειεστέρας 19:**^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.67-4.68 (m, 1H), 4.58-4.60 (m, 1H), 3.68-3.74 (m, 1H), 2.53-2.54 (m, 3H), 1.24-1.97 (m, 9H) και 0.91-0.92 (m, 6H).

Σύνθεση των ρακεμικών αλκοολών 7, 13 και 20:

Σε 10 ml ξηρού τολουενίου και με τη χρήση φυσαλίδων αζώτου προστέθηκαν 150 mg (0.60 mmol) υποστρώματος, 9.84 mg (0.06 mmol) AIBN και 434 μl (3 mmol) nBu_3SnH και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Μετά το πέρας 30 λεπτών προστέθηκε ελαιόλουτρο και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 110 ^{o}C (η θερμοκρασία επιτεύχθηκε μέσα σε 10 λεπτά) για 30 λεπτά. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και με την ολοκλήρωσή της το διάλυμα αφέθηκε να επιστρέψει σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με συμπύκνωση. Το επιθυμητό προϊόν παρελήφθει μετά από χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 10:1). Απόδοση 75-85%.

- **Οξετάνιο 7:**^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.48-4.55 (m, 1H), 4.39-4.36 (m, 1H), 1.53-1.72 (m, 4H), 1.24-1.42 (m, 7H) και 0.89-0.98 (m, 9H).

^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 13.9, 14.0, 20.0, 22.4, 25.8, 27.3, 30.4, 33.8, 70.1 και 82.0.

- **Οξετάνιο 13:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.45-4.51 (m, 1H), 4.33-4.51 (m, 2H), 1.91-1.97 (m, 1H), 1.67-1;76(m, 2H), 1.52-1.56 (m, 2H) 1.35-1.40 (m, 4H), 0.98-1.03 (t, 3H, J=7 Hz) και 0.89-0.94 (t, 3H, J=7 Hz). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 11.3, 13.8, 16.8, 22.3, 27.28, 30.4, 35.6, 69.6 και 81.9.

- **Οξετάνιο 20:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.02-4.51 (m, 2H), 1.60-1.76 (m, 3H), 1.20-1.41 (m, 8H) και 0.91-0.99 (m, 9H). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 13.6, 14.0, 17.5, 20.0, 20.0, 32.7, 33.8, 70.1 και 81.

Ενζυμική αναγωγή κετοεστέρων σε μικρή κλίμακα

Η ενζυμική αναγωγή των κετοεστέρων προς τον σχηματισμό των οπτικά ενεργών υδροξυ-εστέρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα, 5 mg υποστρώματος διαλύθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH=6.9) και προστέθηκαν 18 mg γλυκόζης, 2 mg ενζύμου KRED, 2 mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) και 2 mg NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37 ^{o}C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >90%.

- **Ενζυμική αναγωγή με KRED 115:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.71 (s, 3H), 3.66 (s, 1H - *anti*), 2.42-.2.49 (m, 1H), 1.64-1.72 (m, 2H), 1.39-1.50 (m, 4H) 1.25-1.35 (m, 4H) και 0.89-0.93 (m, 6H).

- **Ενζυμική αναγωγή με KRED 114:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 3.71 (s, 3H), 3.68 (s, 1H - *anti*), 2.36-2.39 (m, 1H), 1.66-1;75(m, 2H), 1.25-1.45 (m, 6H) και 0.87-0.94 (q, 6H, J=7 Hz). ^{13}C NMR (300MHz; $CDCl_3$;) 11.8, 14.0, 22.6, 22.7, 27.8, 35.3, 51.5, 52.5, 71.9 και 176.1.

- **Ενζυμική αναγωγή με KRED 121:** ^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$;) δ 4.15-4.22 (m, 2H), 3.66-3.74 (m, 1H), 2.30-2.37 (m, 1H), 1.36-1.94(m, 9H), 1.25-1.30 (m, 3H) και 0.90-0.95 (m, 6H).

Σύνθεση των MPA εστέρων

Σύνθεση του MPA εστέρα του (S)-2-μέθυλο-3-υδρόξυ-εστέρα

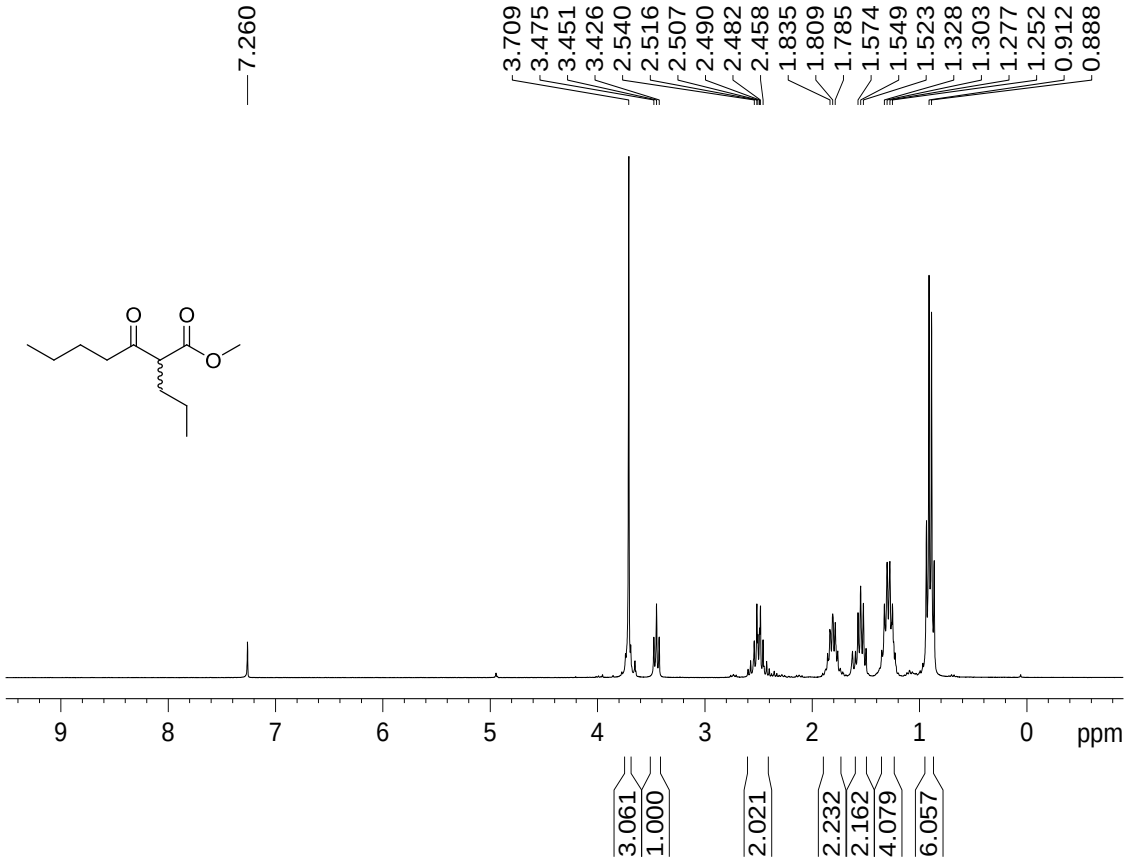
Σε διάλυμα της αντίστοιχης δευτεροταγούς αλκοόλης (0.1 mmol), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 0.11 mmol (1.1eq, 23 mg) DCC, 0.11 mmol (1.1eq, 18 mg) του (S) MPA και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 ^oC για 6 ώρες, το μείγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό.Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 5:1). Απόδοση 90%.

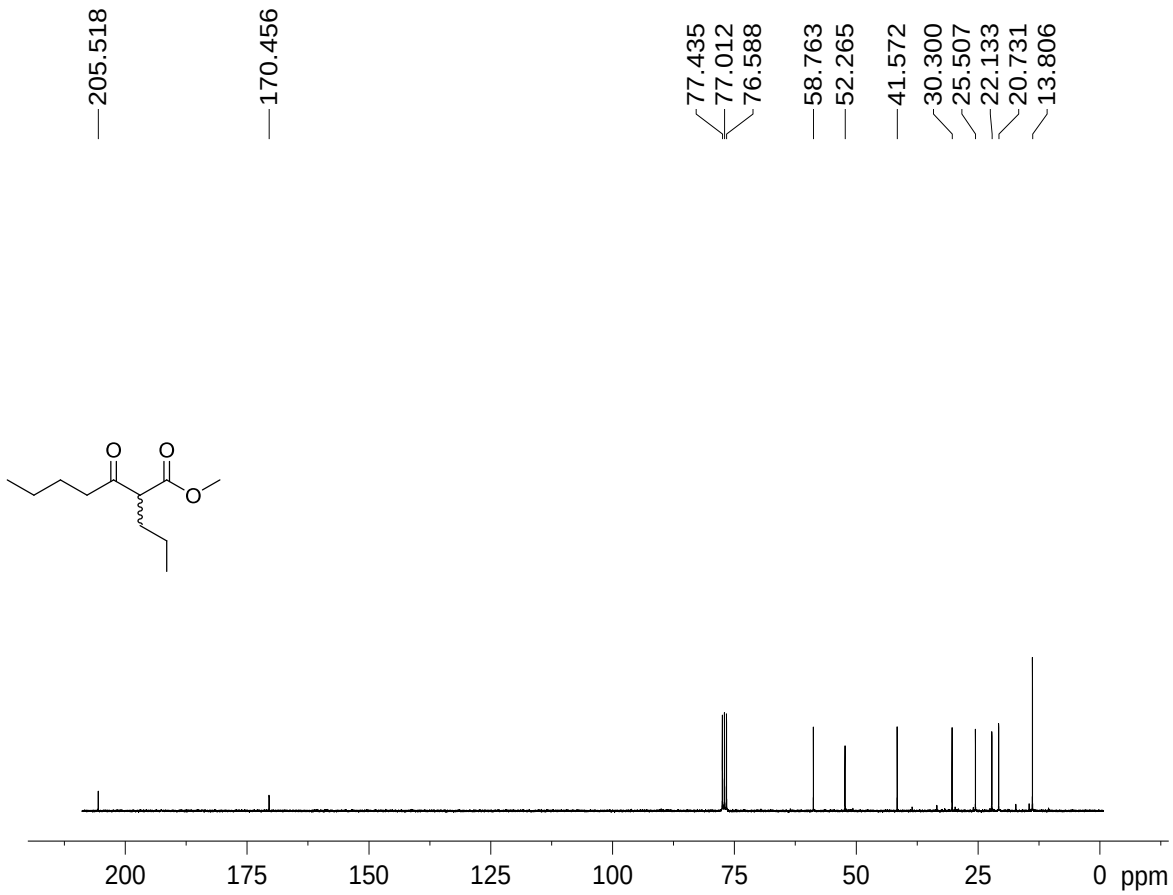
Σύνθεση του MPA εστέρα του (R)-2-μέθυλο-3-υδρόξυ-εστέρα

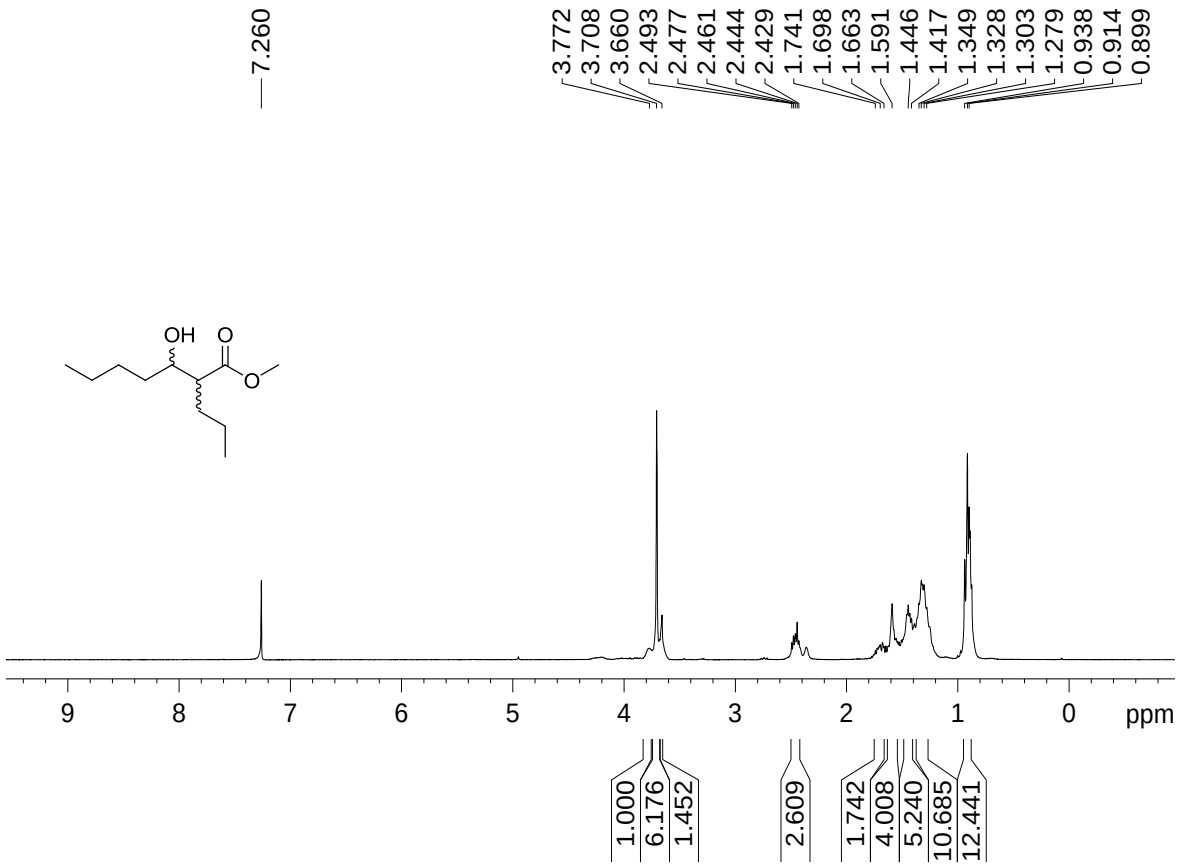
Σε διάλυμα της αντίστοιχης δευτεροταγούς αλκοόλης (0.1 mmol), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 0.11 mmol (1.1 eq, 23 mg) DCC, 0.11 mmol (1.1 eq, 18 mg) του (R) MPA και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 ^oC για 6 ώρες, το μείγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό.Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (hexane/EtOAc, v/v, 5:1). Απόδοση 90%.

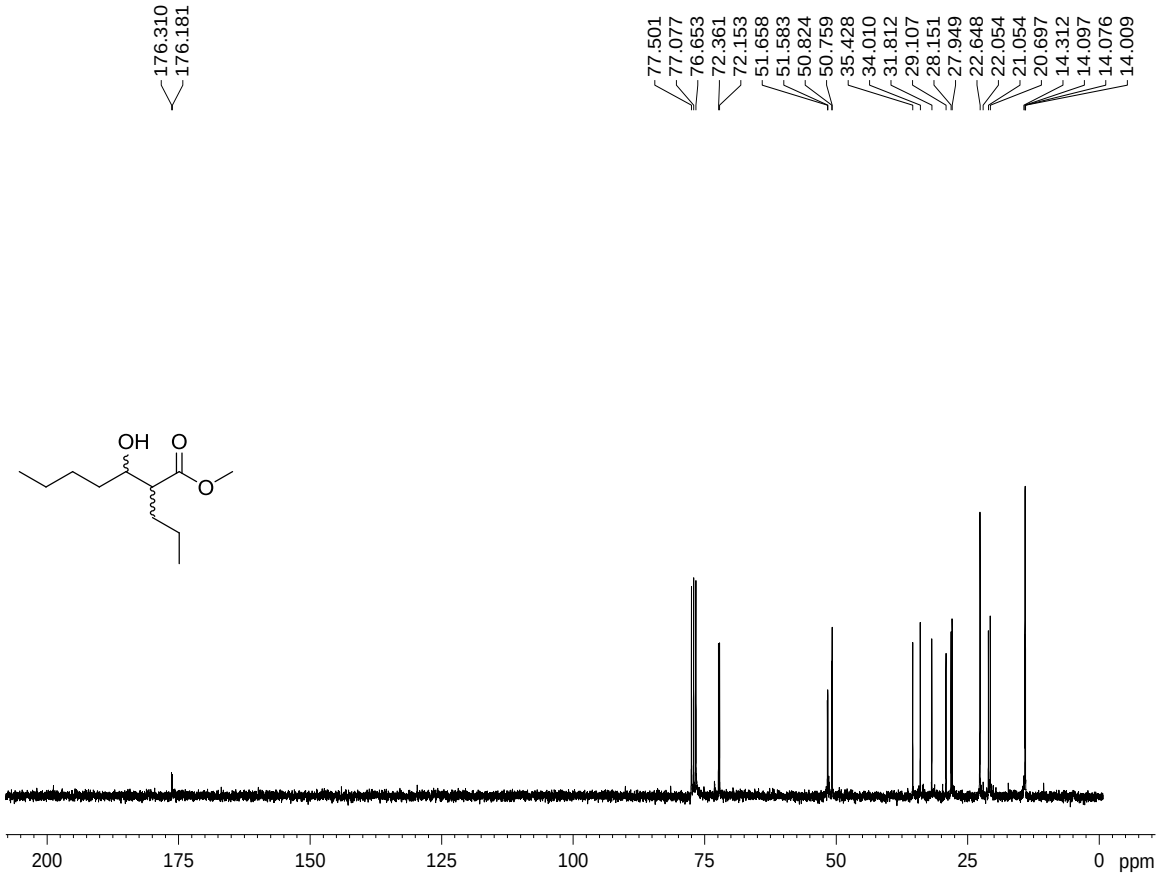
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

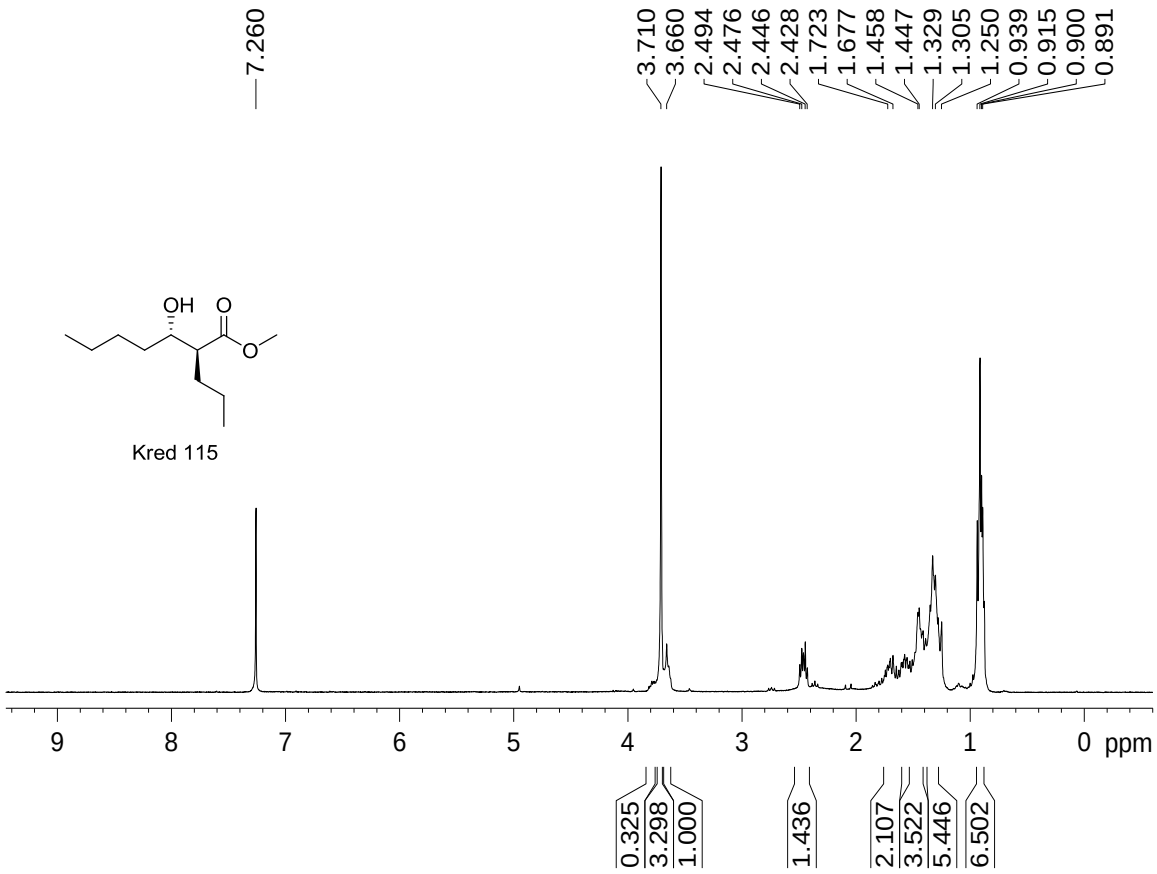
ΦΑΣΜΑΤΑ

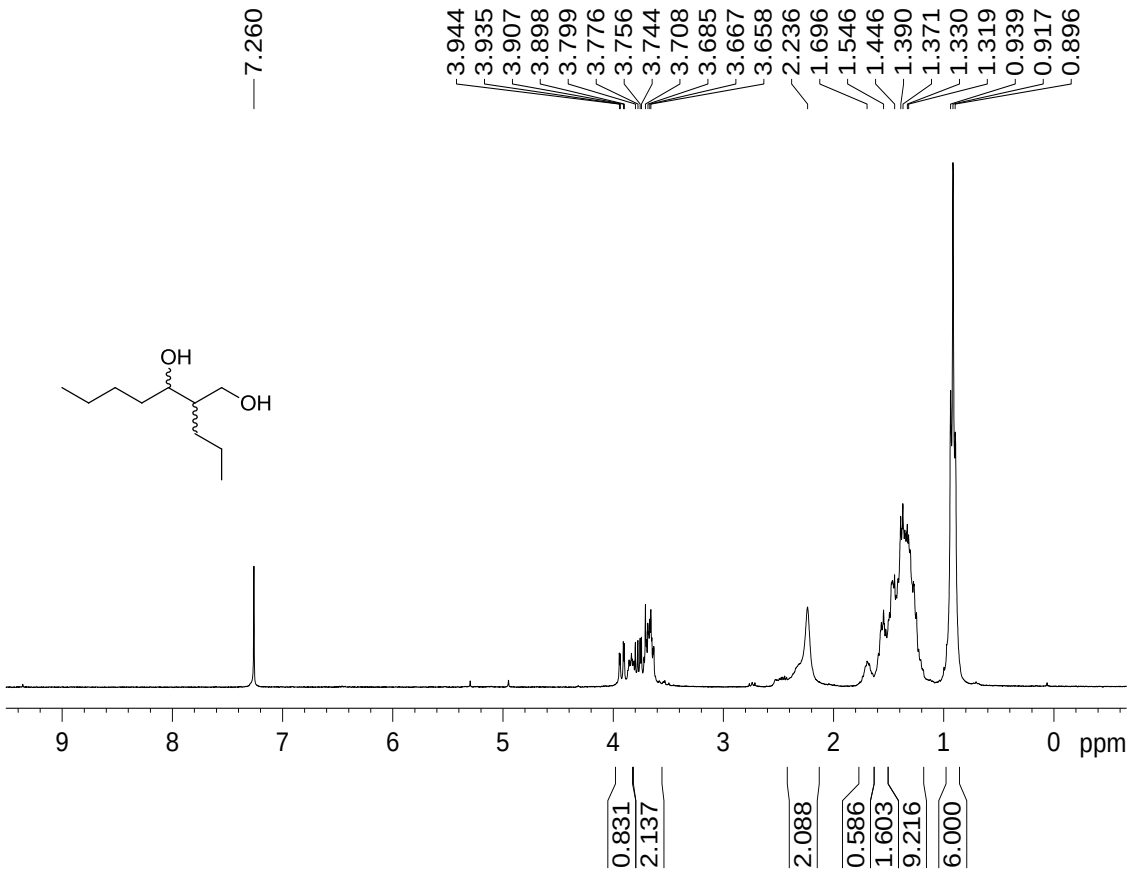

7.260
3.709
3.475
3.451
3.426
2.540
2.516
2.507
2.490
2.482
2.458
1.835
1.809
1.785
1.574
1.549
1.523
1.328
1.303
1.277
1.252
0.912
0.888
O
O
O
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
3.061
1.000
2.021
2.232
2.162
4.079
6.057

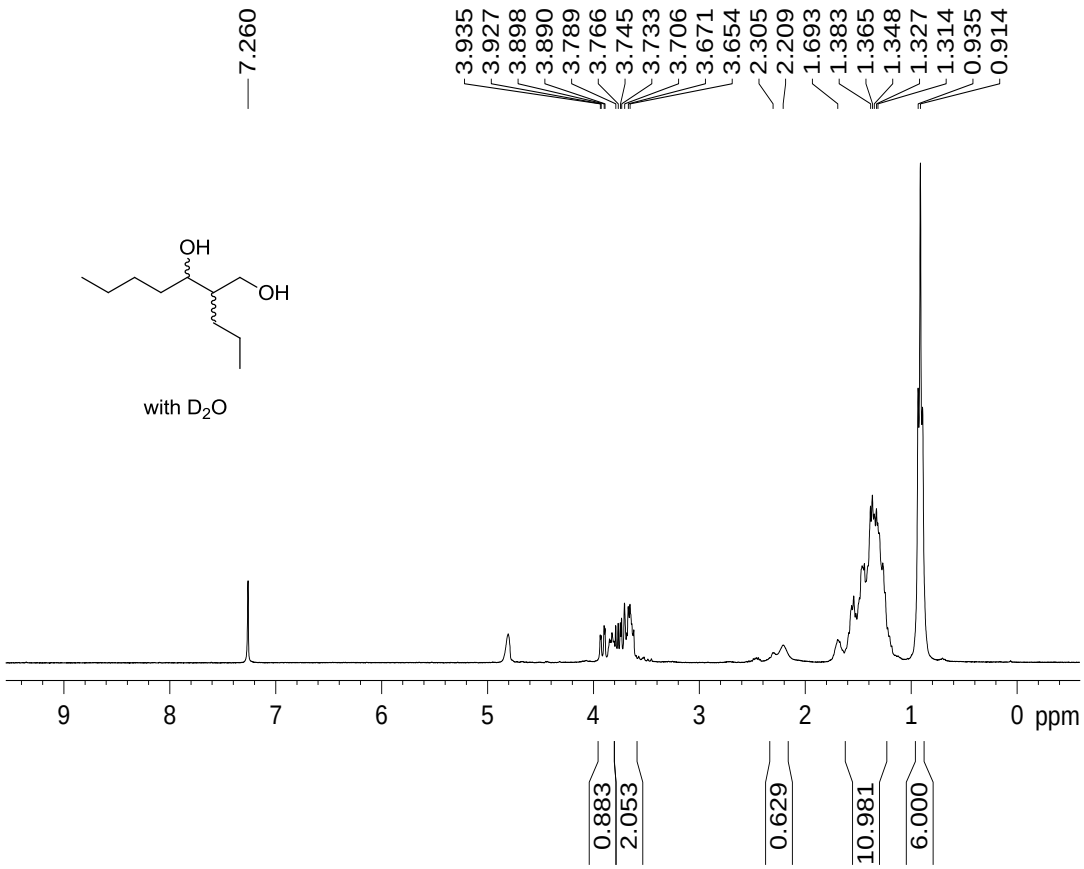

205.518
170.456
77.435
77.012
76.588
58.763
52.265
41.572
30.300
25.507
22.133
20.731
13.806
O
O
O
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm

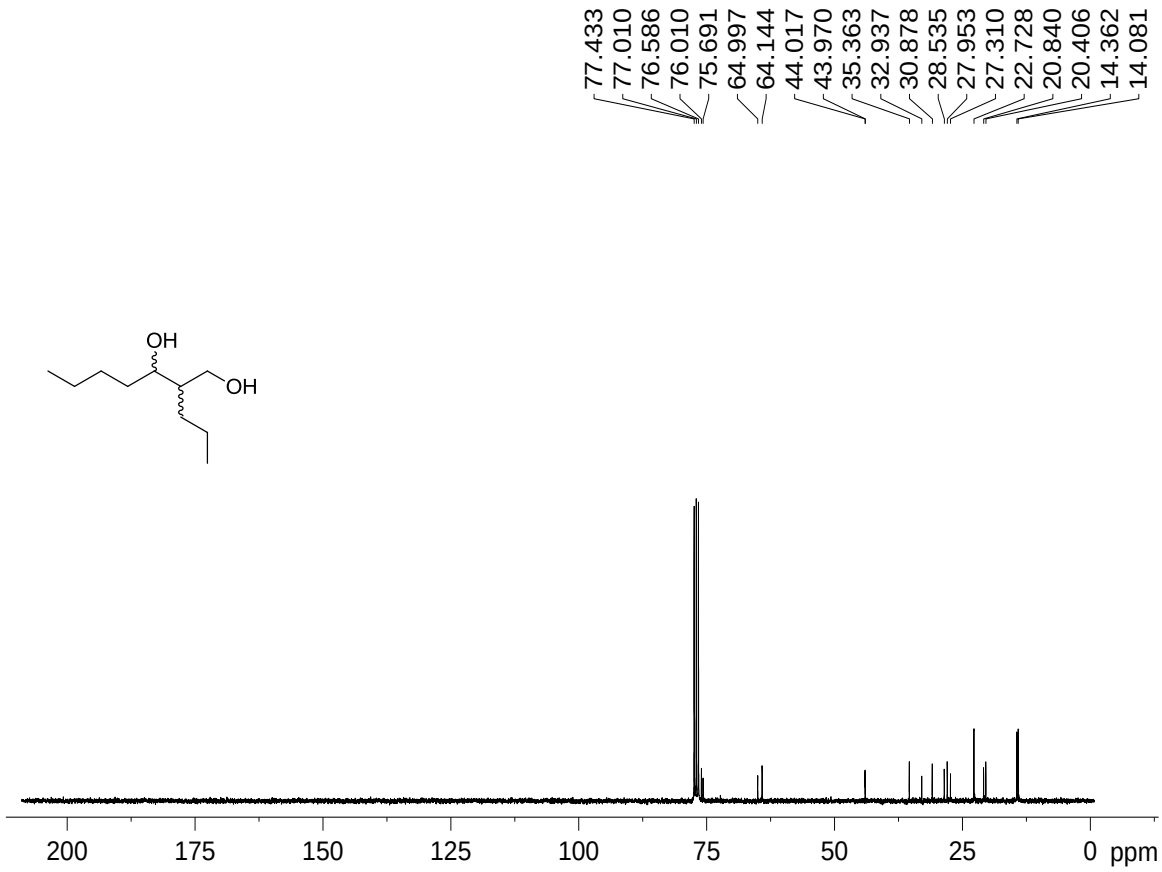

7.260
3.772
3.708
3.660
2.493
2.477
2.461
2.444
2.429
1.741
1.698
1.663
1.591
1.446
1.417
1.349
1.328
1.303
1.279
0.938
0.914
0.899
OH
O
O
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.000
6.176
1.452
2.609
1.742
4.008
5.240
10.685
12.441

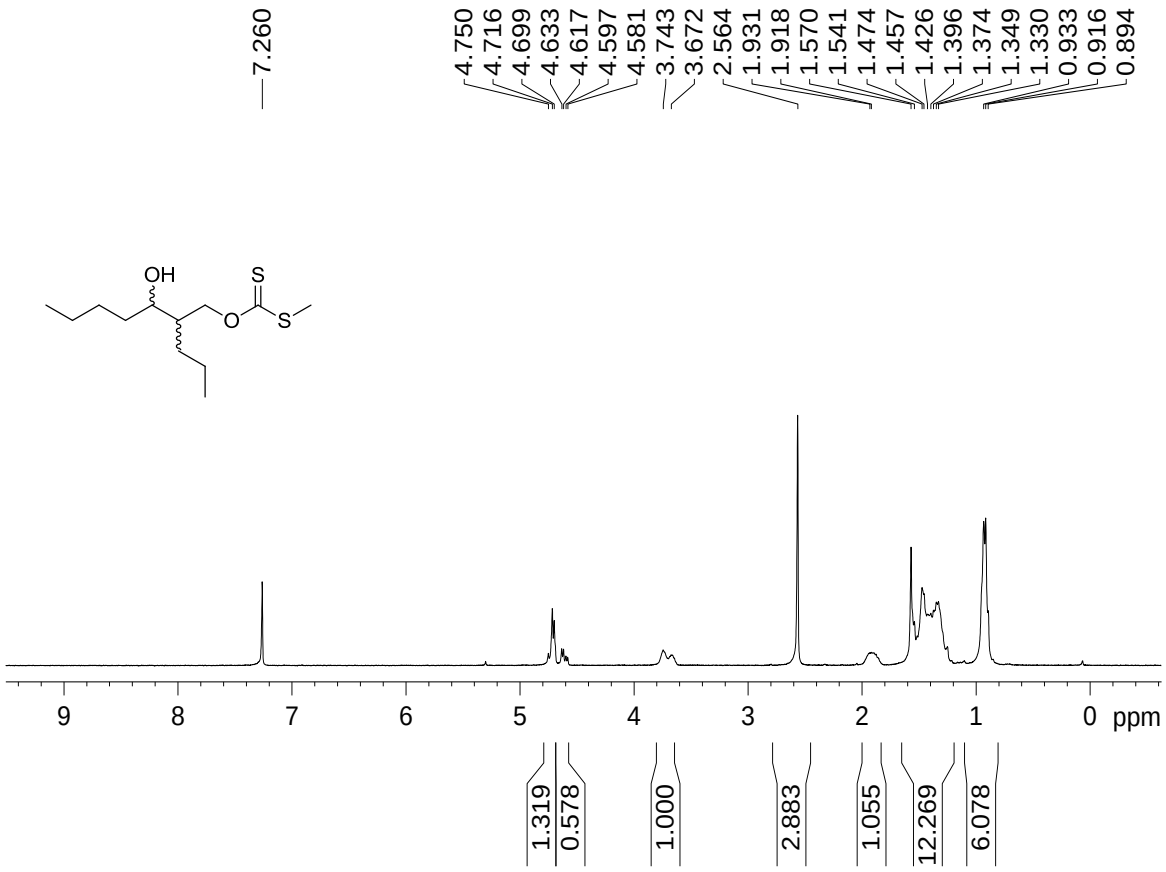

176.310
176.181
77.501
77.077
76.653
72.361
72.153
51.658
51.583
50.824
50.759
35.428
34.010
31.812
29.107
28.151
27.949
22.648
22.054
21.054
20.697
14.312
14.097
14.076
14.009
OH
O
O
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm

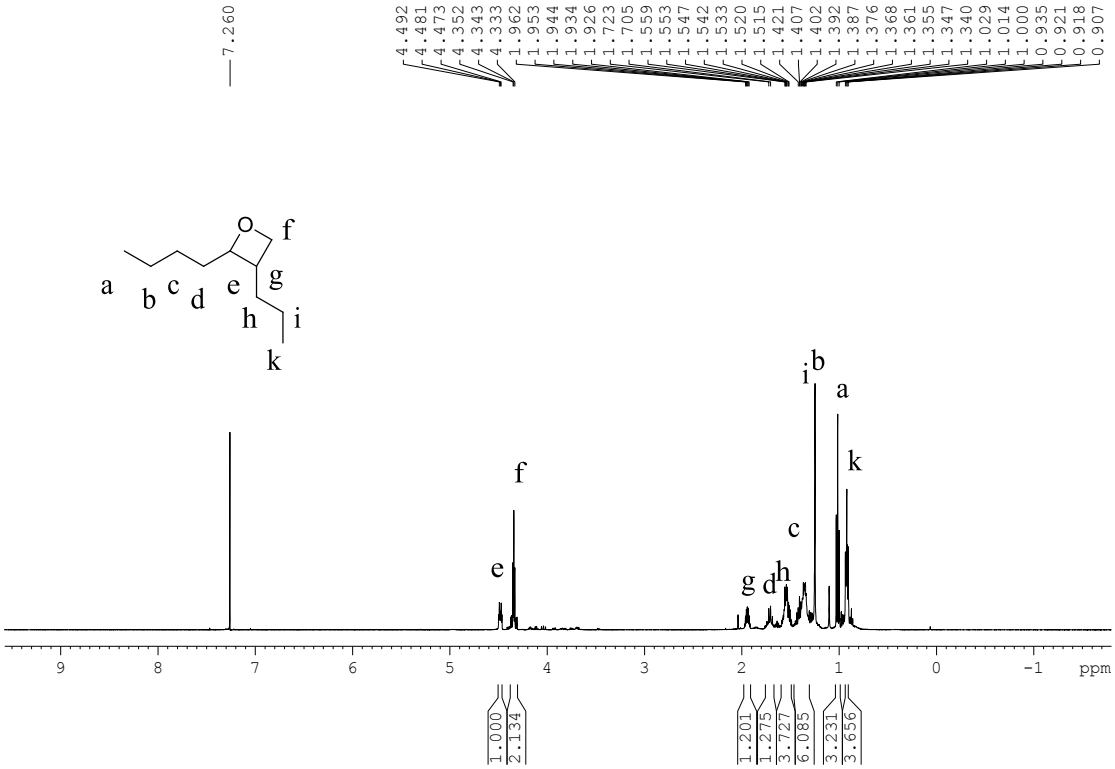

7.260
3.710
3.660
2.494
2.476
2.446
2.428
1.723
1.677
1.458
1.447
1.329
1.305
1.250
0.939
0.915
0.900
0.891
OH
O
O
Kred 115
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0 ppm
0.325
3.298
1.000
1.436
2.107
3.522
5.446
6.502

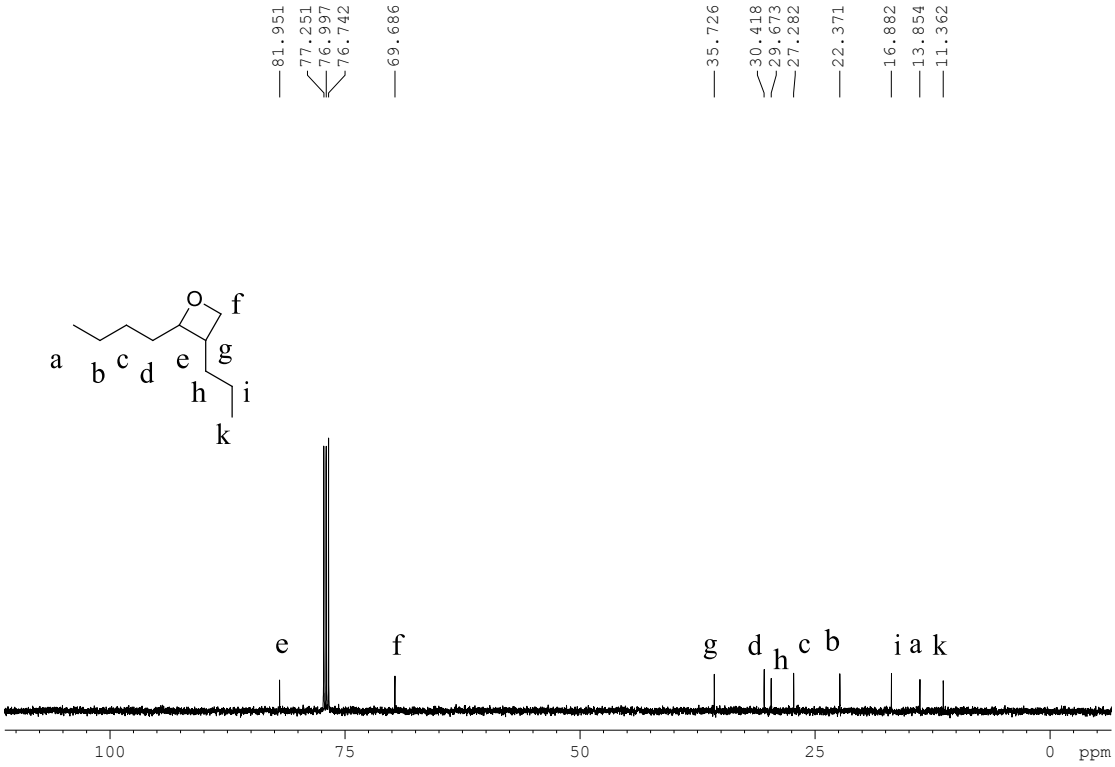

7.260
3.944
3.935
3.907
3.898
3.799
3.776
3.756
3.744
3.708
3.685
3.667
3.658
2.236
1.696
1.546
1.446
1.390
1.371
1.330
1.319
0.939
0.917
0.896
OH
OH
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.831
2.137
2.088
0.586
1.603
9.216
6.000


7.260
3.935
3.927
3.898
3.890
3.789
3.766
3.745
3.733
3.706
3.671
3.654
2.305
2.209
1.693
1.383
1.365
1.348
1.327
1.314
0.935
0.914
OH
OH
with D2O
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0 ppm
0.883
2.053
0.629
10.981
6.000

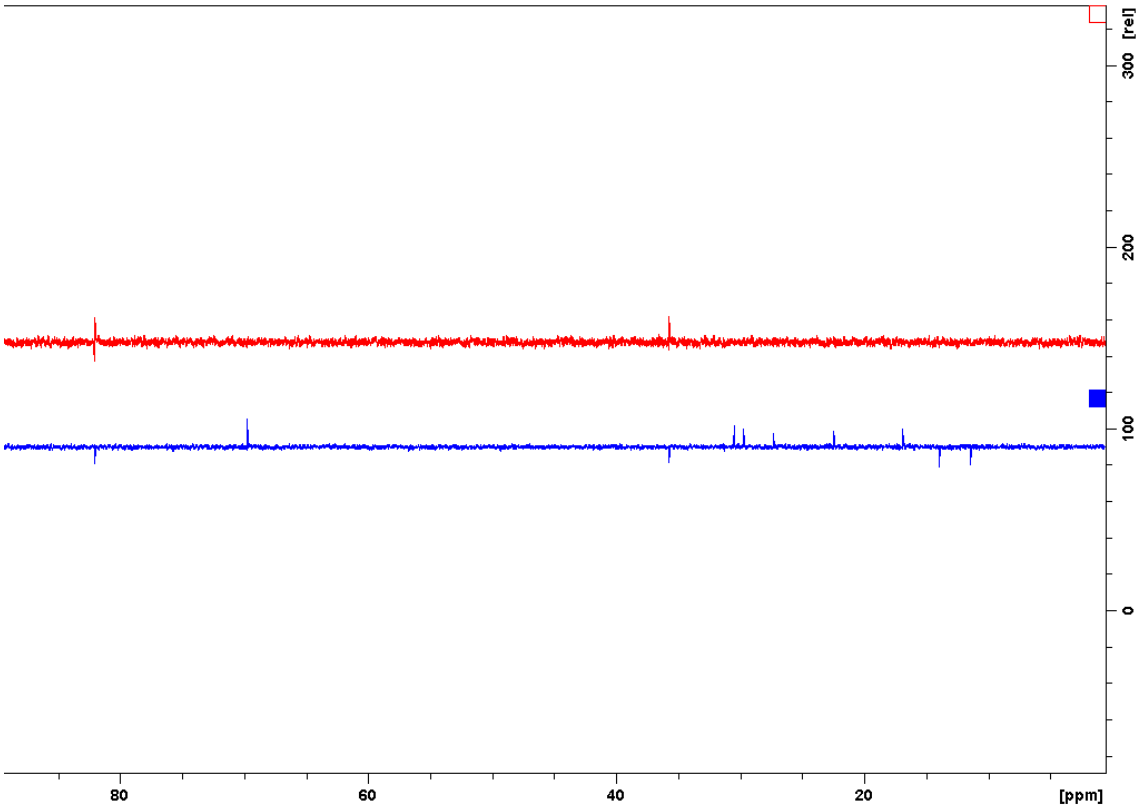

77.433
77.010
76.586
76.010
75.691
64.997
64.144
44.017
43.970
35.363
32.937
30.878
28.535
27.953
27.310
22.728
20.840
20.406
14.362
14.081
OH
OH
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm


7.260
4.750
4.716
4.699
4.633
4.617
4.597
4.581
3.743
3.672
2.564
1.931
1.918
1.570
1.541
1.474
1.457
1.426
1.396
1.374
1.349
1.330
0.933
0.916
0.894
OH
S
O
S
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.319
0.578
1.000
2.883
1.055
12.269
6.078

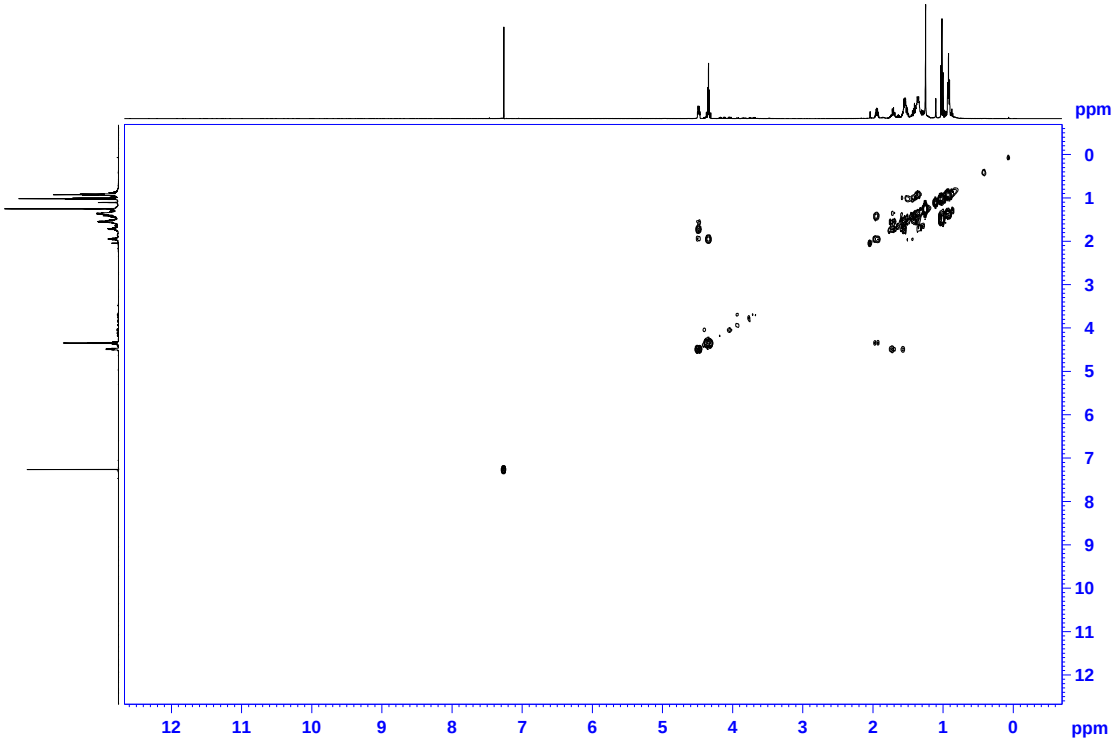

7.260
4.492
4.481
4.473
4.352
4.343
4.333
1.962
1.953
1.944
1.934
1.926
1.723
1.705
1.559
1.553
1.547
1.542
1.533
1.520
1.515
1.421
1.407
1.402
1.392
1.387
1.376
1.368
1.361
1.355
1.347
1.340
1.029
1.014
1.000
0.935
0.921
0.918
0.907
a
b
c
d
e
f
g
h
i
k
ppm
1.000
2.134
1.201
1.275
3.727
6.085
3.231
3.656


81.951
77.251
76.997
76.742
69.686
35.726
30.418
29.673
27.282
22.371
16.882
13.854
11.362
a
b
c
d
e
f
g
h
i
k
100
75
50
25
0
ppm

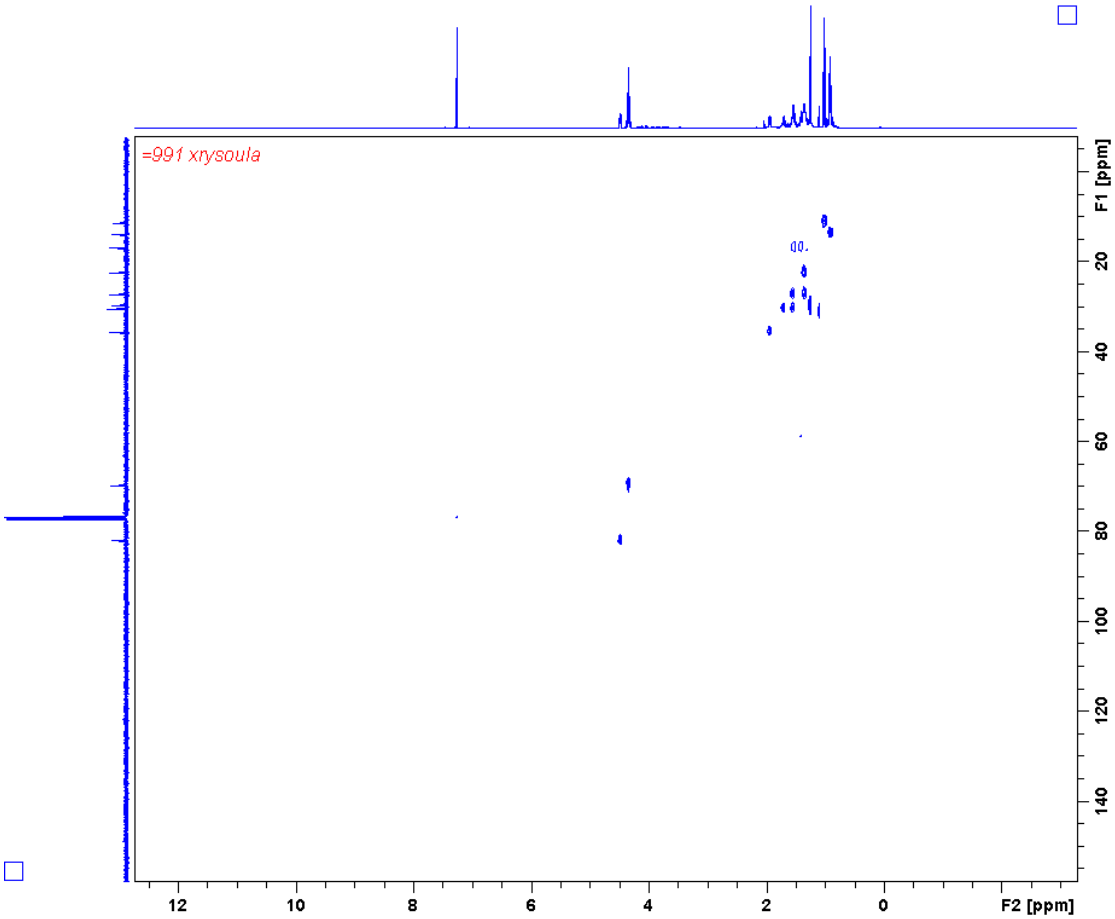
DEPT – 90 & DEPT – 135



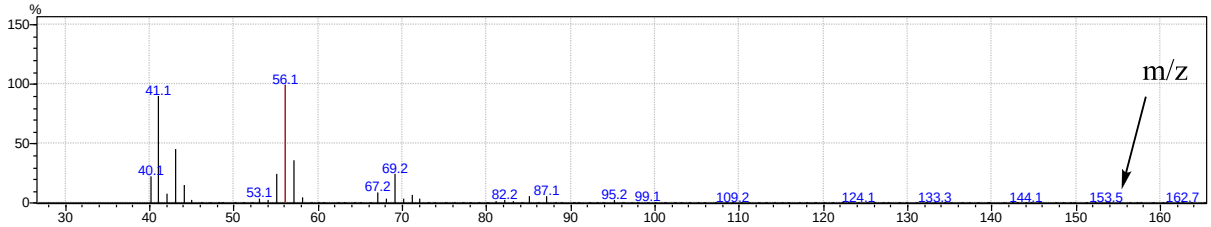
COSY NMR

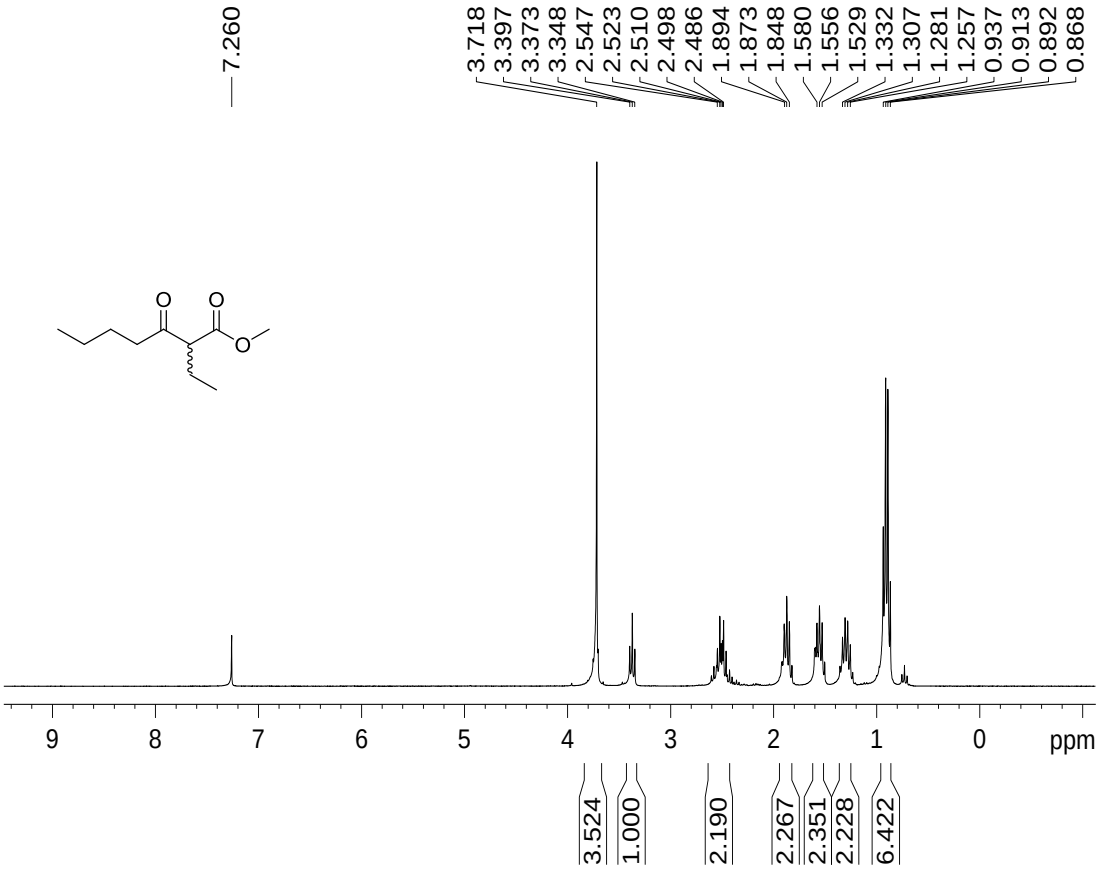


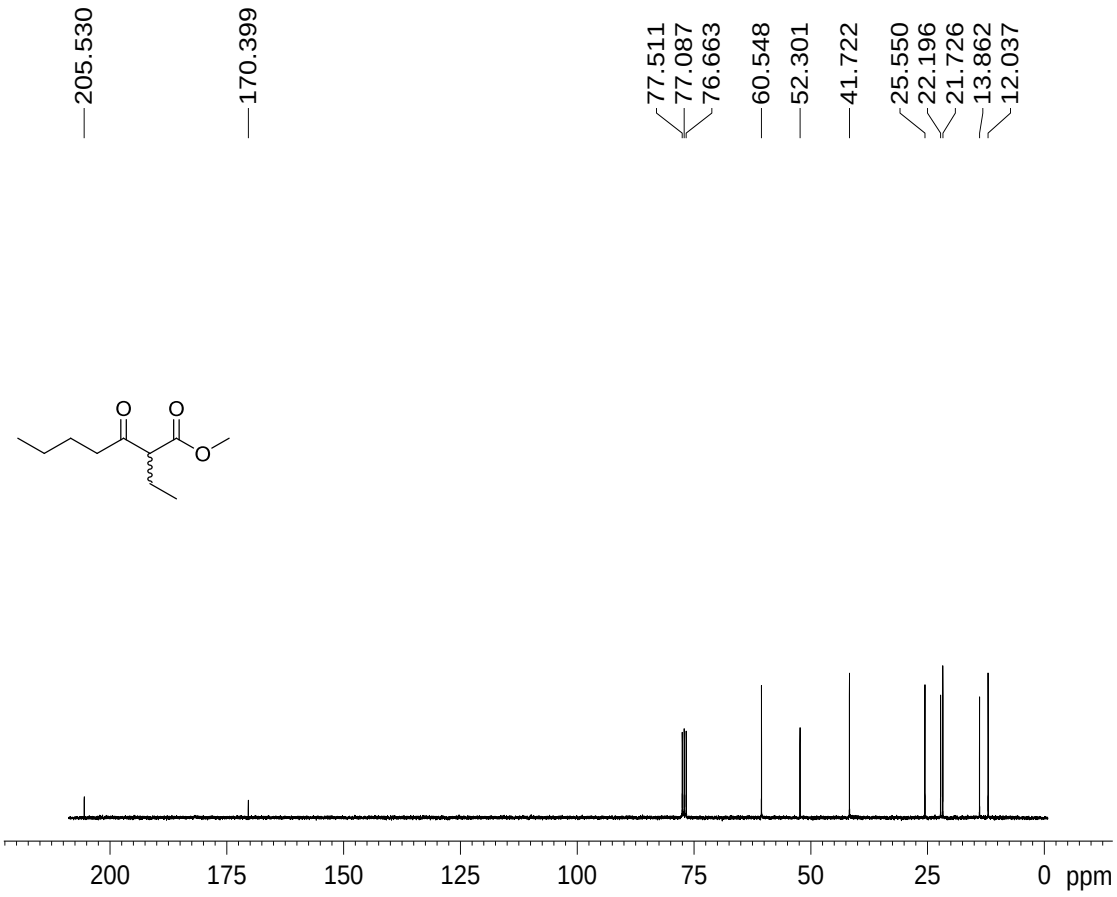
HSQC

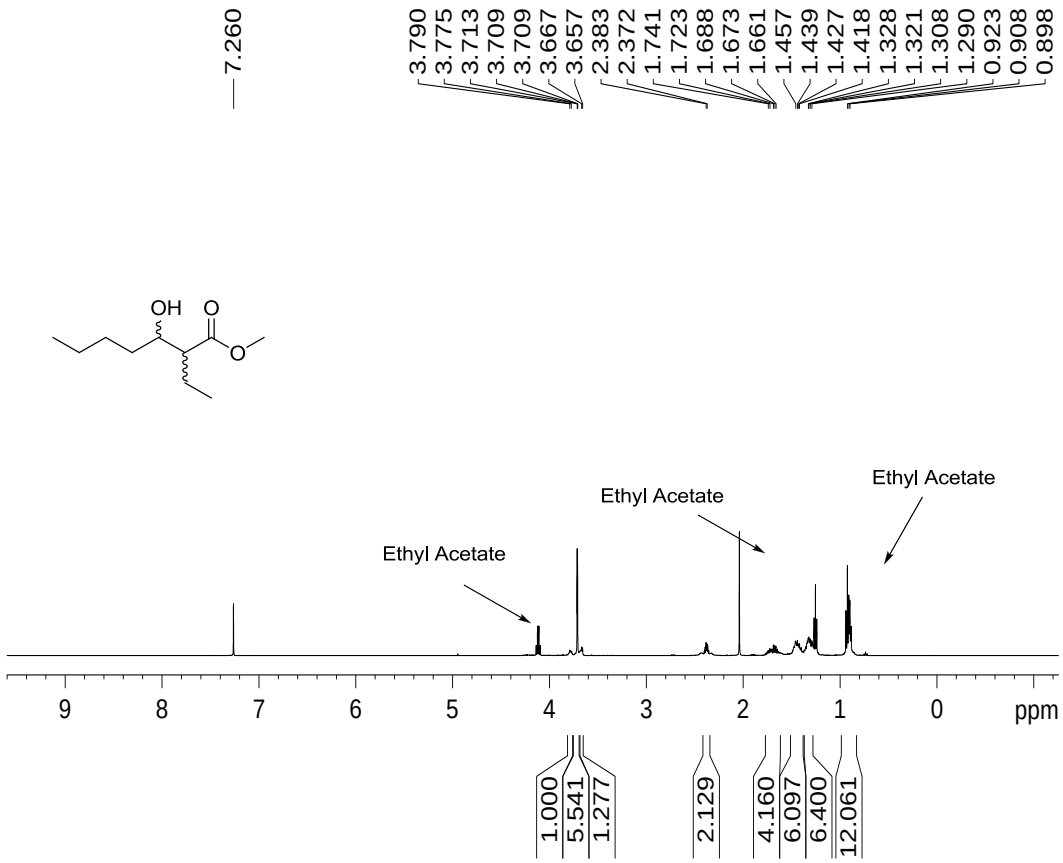


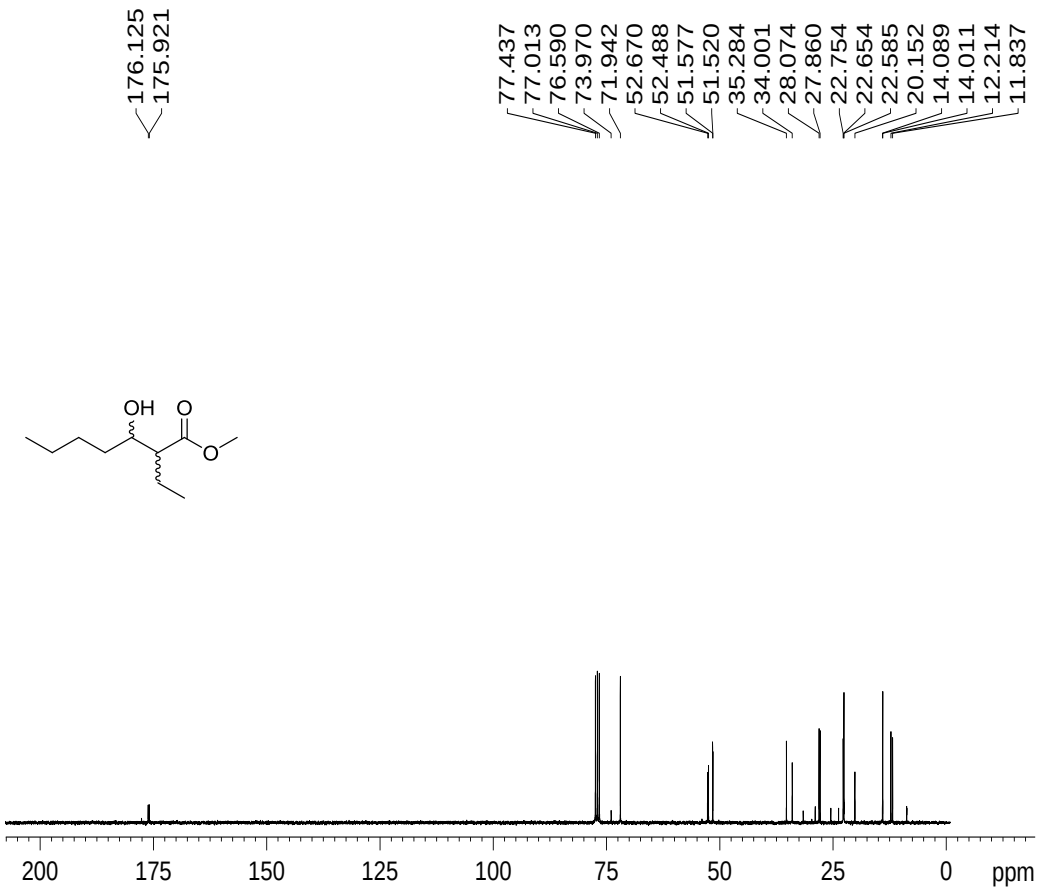
GC - MS

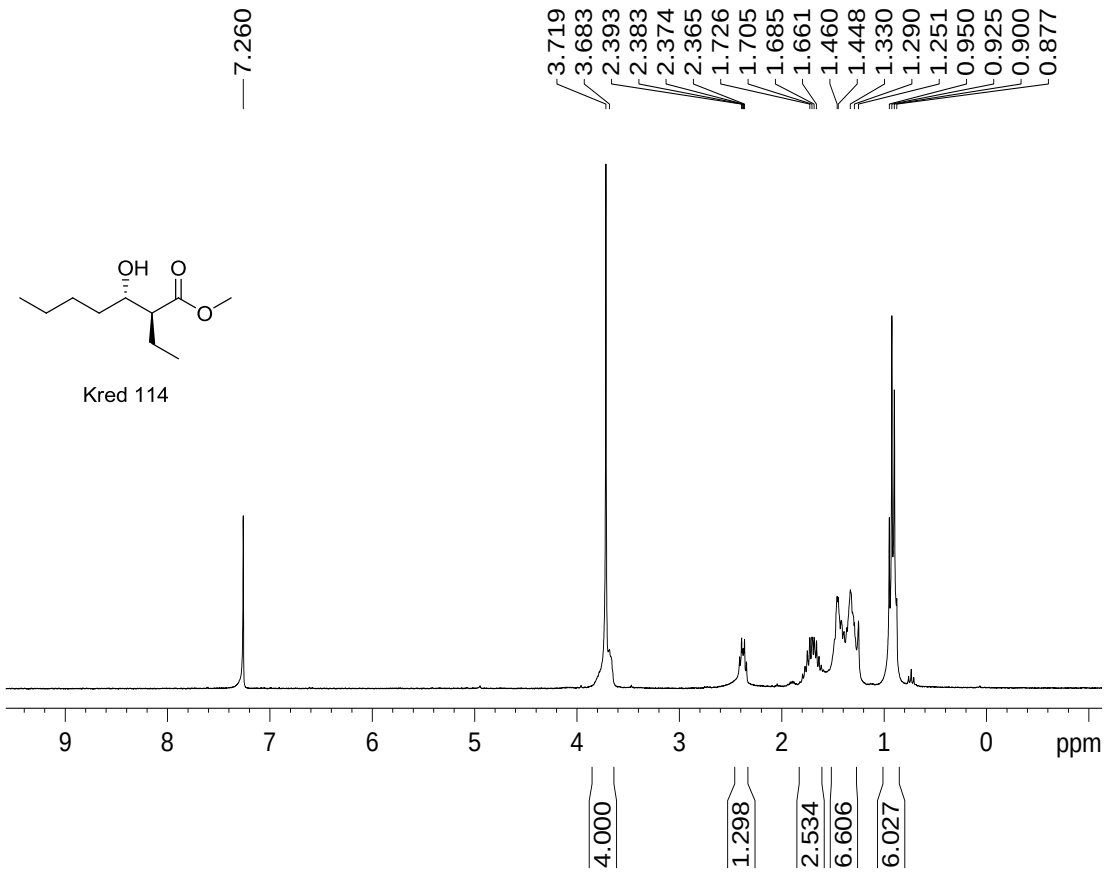

%
150
100
50
0
41.1
56.1
40.1
53.1
69.2
67.2
82.2
87.1
95.2
99.1
109.2
124.1
133.3
144.1
153.5
162.7
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
m/z

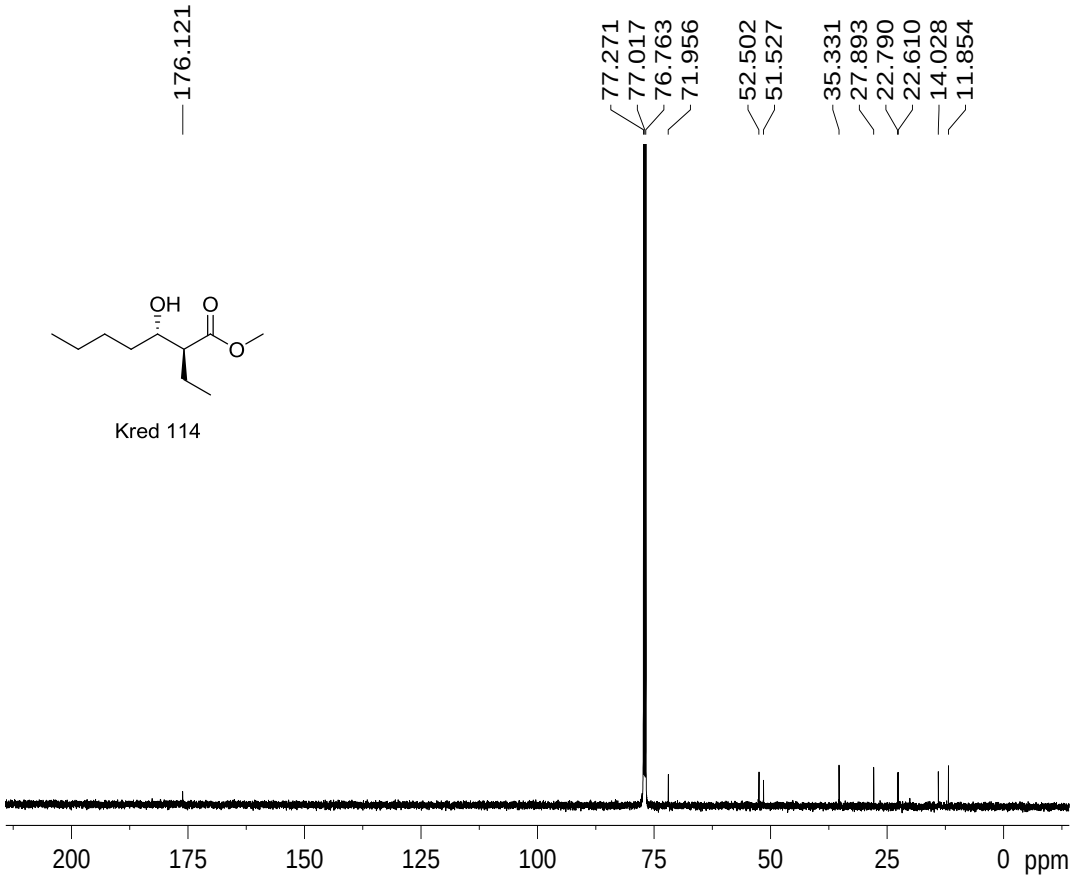

7.260
3.718
3.397
3.373
3.348
2.547
2.523
2.510
2.498
2.486
1.894
1.873
1.848
1.580
1.556
1.529
1.332
1.307
1.281
1.257
0.937
0.913
0.892
0.868
O
O
O
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
3.524
1.000
2.190
2.267
2.351
2.228
6.422

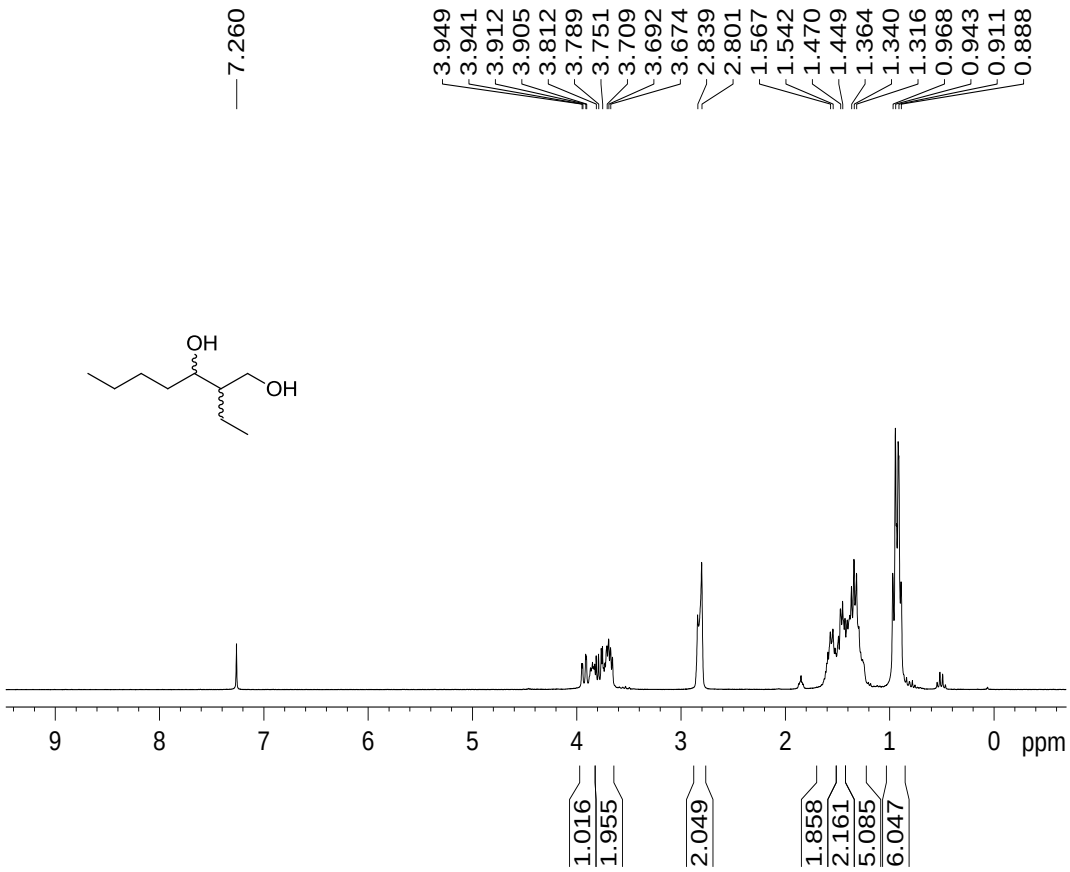

205.530
170.399
77.511
77.087
76.663
60.548
52.301
41.722
25.550
22.196
21.726
13.862
12.037
O
O
O
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm

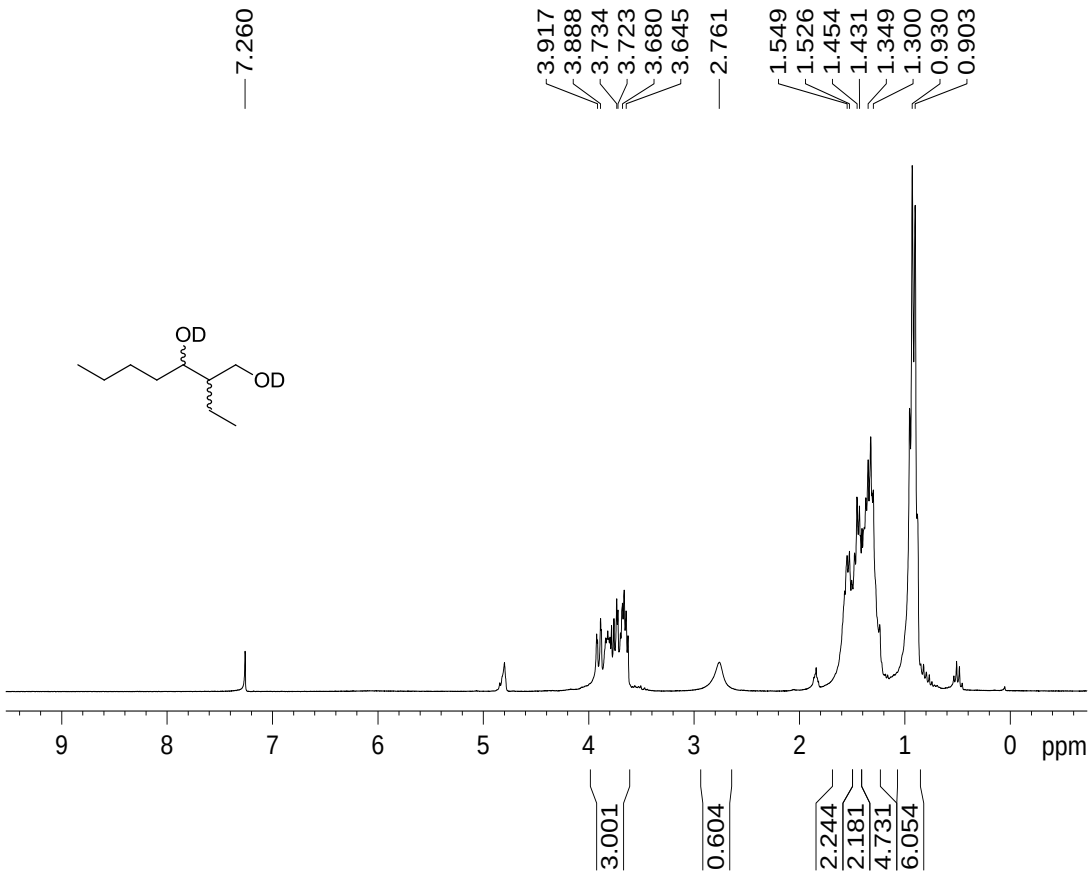

7.260
3.790
3.775
3.713
3.709
3.709
3.667
3.657
2.383
2.372
1.741
1.723
1.688
1.673
1.661
1.457
1.439
1.427
1.418
1.328
1.321
1.308
1.290
0.923
0.908
0.898
OH
O
O
Ethyl Acetate
Ethyl Acetate
Ethyl Acetate
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.000
5.541
1.277
2.129
4.160
6.097
6.400
12.061

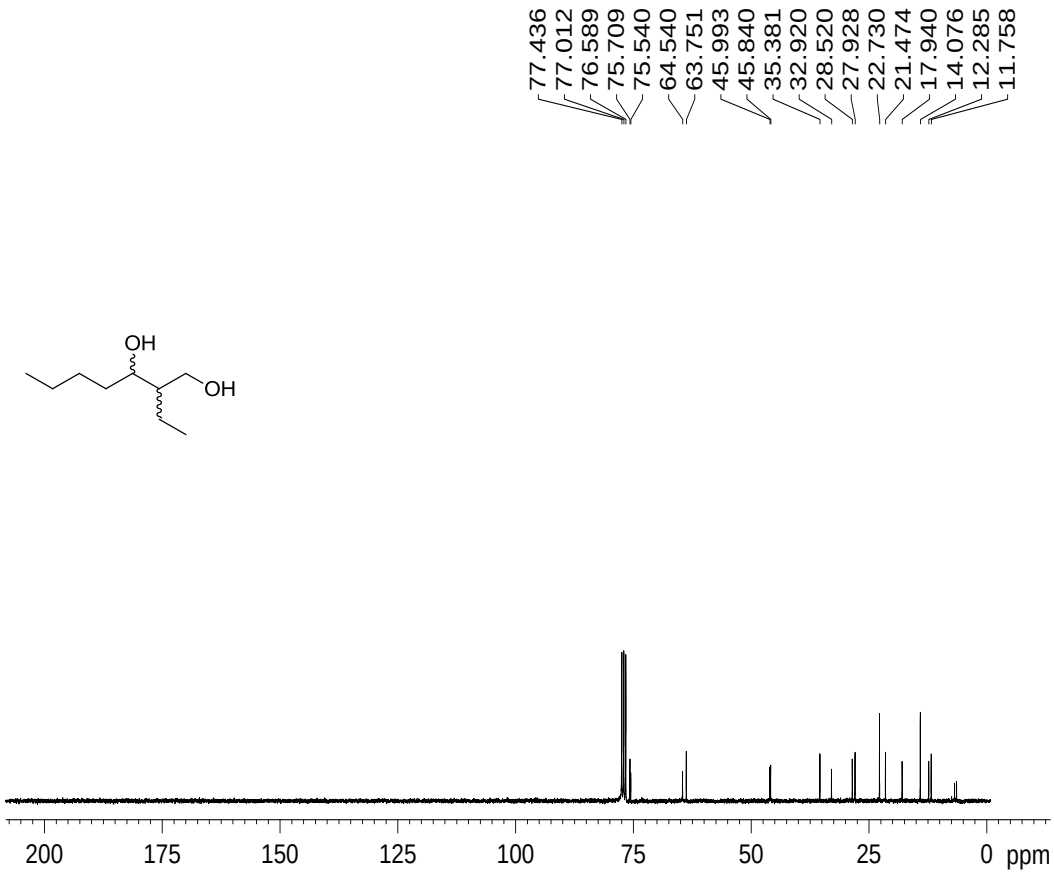

176.125
175.921
77.437
77.013
76.590
73.970
71.942
52.670
52.488
51.577
51.520
35.284
34.001
28.074
27.860
22.754
22.654
22.585
20.152
14.089
14.011
12.214
11.837
OH
O
O
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm

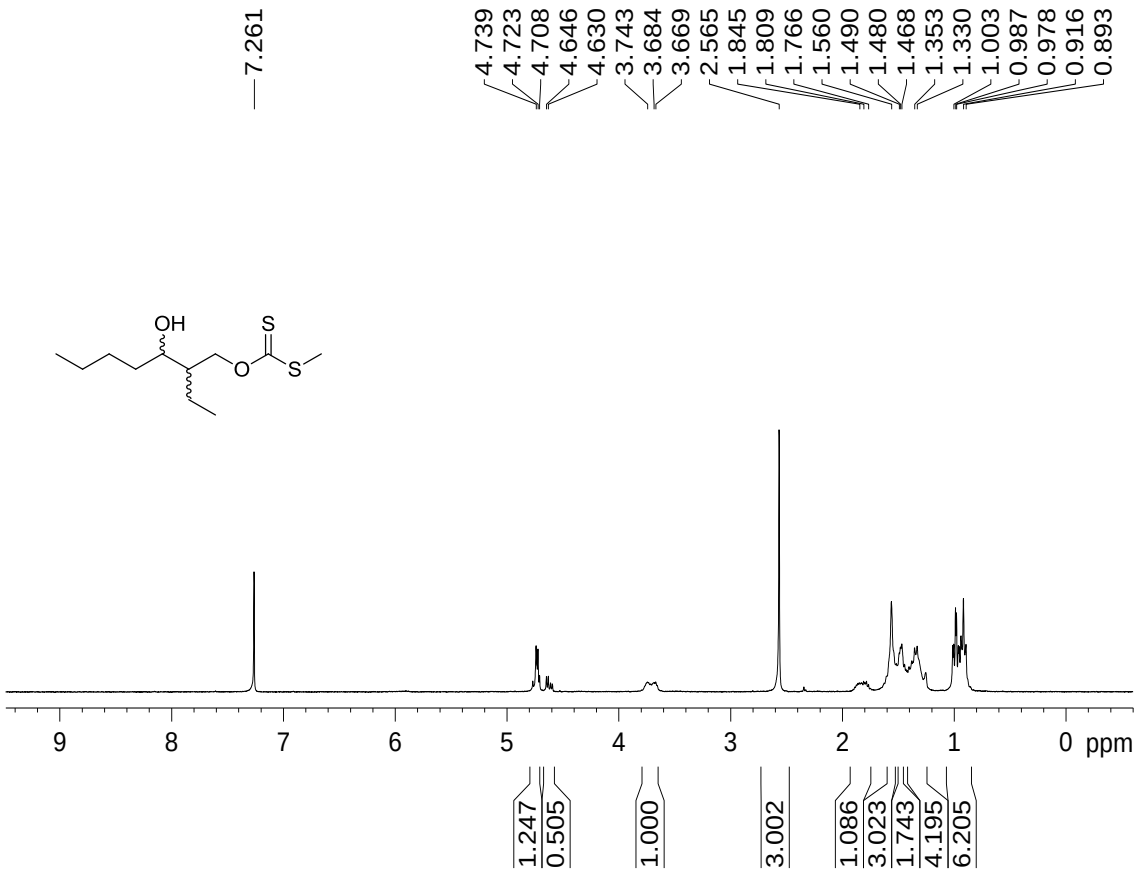

7.260
3.719
3.683
2.393
2.383
2.374
2.365
1.726
1.705
1.685
1.661
1.460
1.448
1.330
1.290
1.251
0.950
0.925
0.900
0.877
OH
O
O
Kred 114
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
4.000
1.298
2.534
6.606
6.027


176.121
77.271
77.017
76.763
71.956
52.502
51.527
35.331
27.893
22.790
22.610
14.028
11.854
OH
O
O
Kred 114
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm

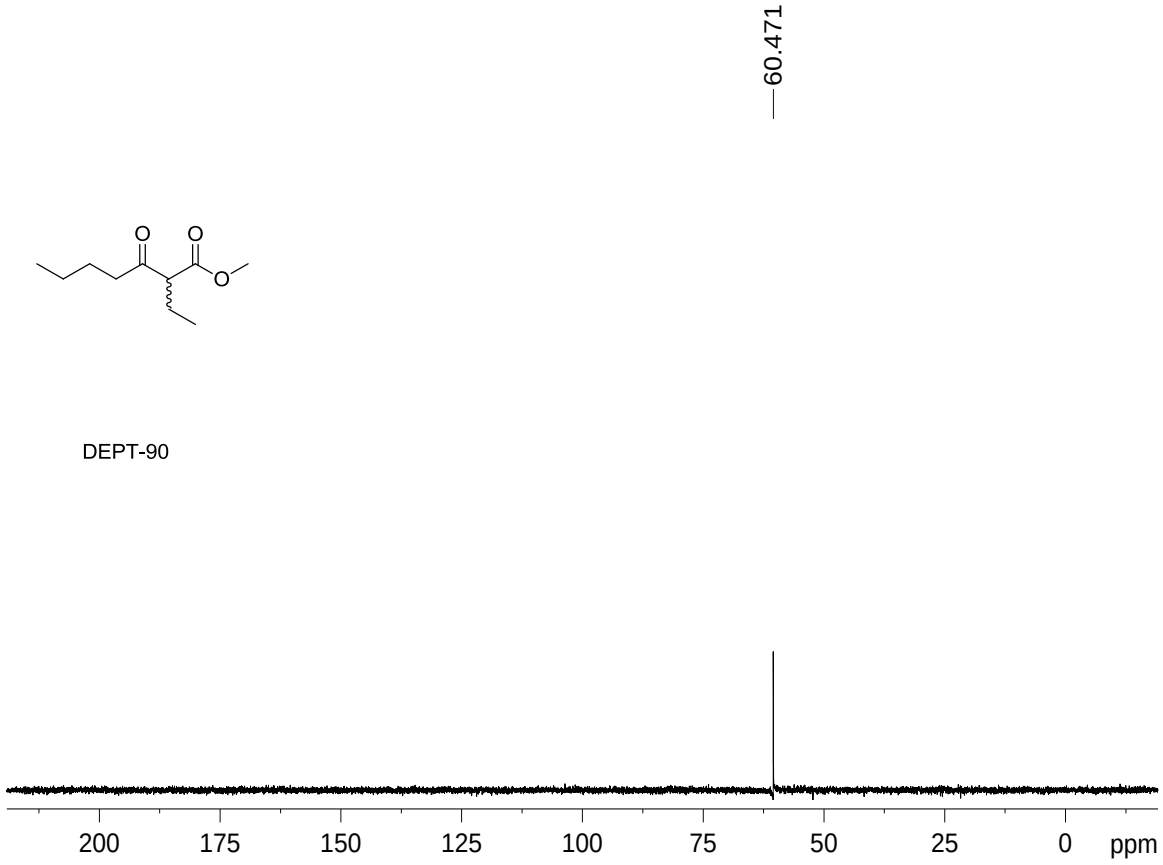

7.260
3.949
3.941
3.912
3.905
3.812
3.789
3.751
3.709
3.692
3.674
2.839
2.801
1.567
1.542
1.470
1.449
1.364
1.340
1.316
0.968
0.943
0.911
0.888
OH
OH
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.016
1.955
2.049
1.858
2.161
5.085
6.047

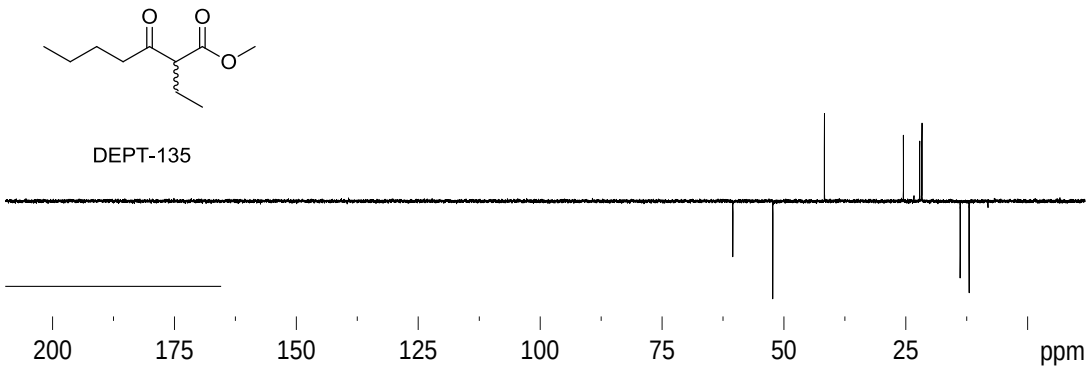

7.260
3.917
3.888
3.734
3.723
3.680
3.645
2.761
1.549
1.526
1.454
1.431
1.349
1.300
0.930
0.903
OD
OD
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
3.001
0.604
2.244
2.181
4.731
6.054


77.436
77.012
76.589
75.709
75.540
64.540
63.751
45.993
45.840
35.381
32.920
28.520
27.928
22.730
21.474
17.940
14.076
12.285
11.758
OH
OH
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm


7.261
4.739
4.723
4.708
4.646
4.630
3.743
3.684
3.669
2.565
1.845
1.809
1.766
1.560
1.490
1.480
1.468
1.353
1.330
1.003
0.987
0.978
0.916
0.893
OH
S
O
S
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0 ppm
1.247
0.505
1.000
3.002
1.086
3.023
1.743
4.195
6.205

DEPT-90




O
O
O
DEPT-135
200
175
150
125
100
75
50
25
ppm

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John Kenly Smith, Encyclopedia of Catalysis, Wiley, **2010**
2. Tatsuta, K.; Hosokawa, S. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4707.
3. Scholl, M; Ding, S; Lee, C.W; Grubbs, R. H, *Organic Letters*, **1999**, *1, 953-956*
4. Stratakis, M.; Garcia, H. *Chem. Rev.,* **2012,** 112, 4469
5. Crossley, R. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8155.
6. a) Faber, K. *Biotransformation in organic Chemistry*, 3rd Edition, Springer, **1997**.: b) Wong and Whitesides *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, volume 12
7. S. G. Neidleman. In *Biocatalysis*. (D. Abramowicz, ed.), pp. 1-24, Van Nostrand Reinhold, New York (1990).
8. Wandery, C; Liese, A,; Kihumbu, D, *Org. Process Res Dev., **2000**, 4, 286*
9. Straathof, A. J; Pauke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. Biotechnol, **2002**, 13, 548*
10. Davis, B. G.; Boyer, V. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 618.
11. Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, 44.
12. Kalaitzakis and Smonou, J. Org. Chem. **2010**, 75, 8658–8661
13. a) Reetz, M. T. ; Jaeger, K. –E. *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 31.; b) Reetz, M. T. ; Becker, M. H.; Kühling, K. M.; Holzwarth, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2647.; c) Arlnold, F. H.; Volkov, A. A. *Curr. Opinion Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54.; Arlnold, F. H, Moore, J. C. (1999) Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution. In: New Enzymes for Organic Synthesis, Scheper T (ed) p 1, Springer, Berlin Heidelberg New York.
14. Reetz, M. T.; Jaeger, K. –E. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 407.
15. Forrest, G. L.; Gonzales, B. Chem-Biol. Interact. 2000, 129, 21.
16. Bradshaw, C. W.; Fu, H.; Shen, G. J.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526.
17. Wong, C. H.; Whitesides, G. M. "*Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*", Tetrahedron Organic Chemistry Series, London, **1993**.
18. Liu, W; Wang, *P. Biotechnol. Adv.* **2007**, *25, 369*

19. Wolfgang Kroutil, Harald Mang, Klaus Edegger, Kurt Faber “Current Opinion in Chemical Biology”, ***2004**, 8, 120-126*
20. Levy,H.R.; Loewus, F.A.; Vennesland, B. J.Am.Chem.Soc., **1957**, 79, 2949.
21. Dale, J.A., Mosher, H.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512
22. Trost, B.M., Belletire, J.L., Godleski, S., Mcdougal, P.G., Balkovec, J.M., *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370
23. Seco, J.M., Quinoa, E., Riguera, R., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17
24. Kalaitzakis, D.; Smonou, I. J. Org. Chem. 2008, 73, 3919-3921
25. R.N. Patel, L. Chu, V.N. Nanduri, L. Jianqing, A. Kotnis, W.L. Parker, M. Liu, R. Mueller, *Tetrahedron: Asymmetry 16 (16)* (**2005**) *2778*.
26. R.N.Patel,L.Chu,R.H.Mueller,*Tetrahedron:Asymmetry 14*(20)(**2003**) *3105*.
27. a)Patel. R. N.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; McNamee, C. G.; Brzozowski, D.; Nanduri, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *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*, 23.
28. R.L. Hanson, S. Goldberg, A. Goswami, T.P. Tully, R.N. Patel, *Adv. Synth. Catal. 347 (7–8)* (**2005**) *1073*.
29. Karenewsky, D. S.; Badia, M. C.; Cushman, D. W.; DeForrest, J. M.; Dejneka, T.; Loots, M. J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 204.
30. Hanson, R. L.; Bembenek, K. S.; Patel, R. N.; Szarka, L. J. *Appl. Microb. Biotechnol.* **1992**, *37*, 599.
31. C.V.C. Prasad, S. Vig, D.W. Smith, Q. Gao, C.T. Polson, J.A. Corsa, V.L. Guss, A. Loo, D.M. Barten, M. Zheng, K.M. Felsenstein, S.B. Roberts, *Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 13* ,**2004**, *3535*.
32. D. Schenk, D. Games, P. Seubert, J*. Mol. Neurosci., 17,* **2001**, *259*.
33. R.N. Patel, A. Goswami, L. Chu, M.-J. Donovan, V.B. Nanduri, S. Goldberg, R. Johnston, S. Prasad, B. Nielsen, F. Junying, W. He, S. Zhongping, K. Wang, R. Eiring, D. Cazzulino, A. Singh, R. Mueller, *Tetrahedron: Asymmetry, 15,* **2004**, *1247*.

34. a) Kelly Velonia, Iason Tsigos, Vassilis Bouriotis, Ioulia Smonou, *Bioorg. Med. Chem. Lett., 9,* **1999**, *65-68,* b) Kelly Velonia, Ioulia Smonou, *Tetrahydron: Assymetry, 12,* **2001**, *3119-3123*
35. Despina J. Bougioukou and Ioulia Smonou, *Tetrahedron Letters, 43,* **2002**, *339–342*
36. Nikos S. Hatzakis, Dimitra Daphnomili, Ioulia Smonou, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21*, **2003**, *309–311,* b) Nikos S. Hatzakis and Ioulia Smonou, *Tetrahedron Letters, 45*, **2004**, *2755–2757 c)* Nikos S. Hatzakis, Ioulia Smonou, *Bioorganic Chemistry, 33*, **2005**, *325–337*
37. Maria Kallergi, Dimitris Kalaitzakis, Ioulia Smonou, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *3946–3950*
38. Dimitris Kalaitzakis, J. David Rozzell, Spiros Kambourakis, Ioulia Smonou, *Org.Letters, 7, 22,* ***2005,*** *4799-4801*
39. Anna Bariotaki, Dimitris Kalaitzakis, Ioulia Smonou, *Org.Letters, 14, 7,* ***2012,*** *1792-1795*
40. Dimitris Kalaitzakis,; Ioulia Smonou.; *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *43-46*
41. Dimitris Kalaitzakis, J. David Rozzell, Spiros Kambourakis, Ioulia Smonou, *Tetrahydron: Assymetry, 18,* **2007**, *2418-2426*
42. Dimitris Kalaitzakis, J. David Rozzell, Ioulia Smonou, Spiros Kambourakis, *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348, 1958 – 1969*
43. Dimitris Kalaitzakis, J. David Rozzell, Spiros Kambourakis, Ioulia Smonou, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2309 – 2313*
44. a) D. Kalaitzakis, I. Smonou ,*Tetrahedron 66*, **2010**, *9431-9439,* b) Dimitris Kalaitzakis, Ioulia Smonou, *J.Org.Chem.* **2010**, *75, 8658–8661*
45. a) Barchi, J.J., Jr; Moore, R. E.; Patterson, G.M.L. *J. Am. Chem. Soc.,* **1984,** *106, 8193-8197* b) Bollag, D.M.; McQueney, P.A.; Zhu, J.; Hensens, O.; Koupal, L.; Liesch, J.; Goetz, M.; Lazarides, E.; Woods, C.M. *Cancer Res.,* **1995,** I55, 2325-233, c) Oka, M.; Yamamoto, K.; Kawano, K.; Hu, S.-L.; Radinov, R.N. *Helv. Chim. Acta.,* ***1992,*** 75, 170-173
46. Κοντοδήμας Δ., Οικονόμου Δ., Θυμάκης Ν., Χ. Μεντή και Ανάγνου Βερονίκη Μ. «Νέος σοβαρός εχθρός των φοινικοειδών, το κολεόπτερο

Rhynchophorus Ferrugineus (Olivier) (Curculionidae: Dryophorinae)», *Γεωργία και Κτηνοτροφία, τεύχος 1, 54-58*, **2006**

47. Kontodimas D., Milonas P., Vassiliou V., Thymakis N., Oikonomou D., *Entomologia Hellenica,* **2005-2006**,*16, 11-15*
48. Kaakeh, W., *Crop Protection*, **2006**, *25, 432-439*
49. a) Ghazavi, & Faghih,. A*pplied Entomology and Phytopathology*; **2002** 69(2): 44-45. b) Κοντοδήμας και συν.,. *Γεωργία – Κτηνοτροφία,* Ιανουάριος **2006***:* 54-57. c) Rahalkar, G.W., Tamharkar, A.J. Shantaram, K.. *Plant. Crops.***1978** 6: 61-64
50. http://www.redpalmweevil.com/life.htm
51. Kostas Niamouris, Panagiota Psirofonia, *ENTOMOLOGIA HELLENICA, 23*, **2014**, *52-58*
52. Κοντοδήμας Δ,. Οικονόμου Δ., Θυμάκης Ν.,. Αποστολοπούλου Α., Πρακτικά Ημερίδας: “Μέτρα προστασίας για το Φοινικόδασος Βάϊ, Αντιμετώπιση εντόμου *R. ferrugineus*. ”, **2006,** 6-10
53. Mori, K.; Kiyota, H.; Malosse, C.; Rochat, D. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1201–1204.
54. Weissling, T. J; Giblim-Davis, R. M.; Gries, G.; Perez, A. L.; Pierce, H. D.; Oehlschlager, A. C. *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20,*505-515