

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Α) ΣΥΝΘΕΣΗ α,α -ΔΙΧΛΩΡΟ- β -ΚΕΤΟ ΕΣΤΕΡΩΝ ΚΑΙ
ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥΣ**

**Β) ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΦΑΙΝΥΛΟ-
ΚΥΚΛΟΠΕΝΤΕΝΙΟΥ**

ΚΕΦΑΛΟΓΙΑΝΝΗ ΜΑΡΙΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΙΟΥΛΙΑ ΣΜΟΝΟΥ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



Bachelor Thesis

**A) SYNTHESIS AND ENZYMATIC REDUCTION OF α,α -
DICHLORO- β -KETO ESTERS**

**B) SYNTHESIS AND PHOTOOXIDATION OF PHENYL-
CYCLOPENTENE**

KEFALOGIANNI MARIA

**BSc Thesis Supervisor
IOULIA SMONU**

HERAKLION 2022

Δήλωση

Δια του παρόντος δηλώνω ότι αυτή η εργασία έχει πραγματοποιηθεί από εμένα προσωπικά στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών. Επιπλέον, δηλώνω ότι έχω γράψει αυτό το έργο ανεξάρτητα, και ότι δε χρησιμοποίησα βοηθήματα ή άλλα εργαλεία πλέον όσον αναφέρονται, και ότι δεν αντέγραψα κείμενα τρίτων χωρίς να τα έχω επισημάνει.

Ηράκλειο, 27/10/2022

Ονοματεπώνυμο

Κεφαλογιάννη Μαρία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Οργανικής Χημείας- Βιοκατάλυσης του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Σμόνου Ιουλίας.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Σμόνου Ιουλία για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της και την καθοδήγηση της.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννόπουλο Βασίλειο και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Κατσουλάκη Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθεια τους και καθοδήγηση στο εργαστήριο.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της εναντιοεκλεκτικότητας κατά την ενζυμική αναγωγή α,α-διχλωρο-β-κέτο εστέρων με χρήση κετορεδουκτασών, με σκοπό το σχηματισμό ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας που χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα φυσικών προϊόντων. Επίσης μελετήθηκε η φωτοοξείδωση υποστρώματος αλκενίου με την χρήση μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης, $^1\text{O}_2$ αλλά και η δοκιμή φωτοοξείδωσης της παραγόμενης αλλυλικής αλκοόλης μέσω ενός παραγώγου της ανθρακινόνης με σκοπό την ανάπτυξη συνθετικής πορείας, η οποία να συνδυάζει την Βιοκατάλυση με την Φωτοκατάλυση.

Στο πρώτο μέρος παρουσιάζεται η εναντιοεκλεκτική αναγωγή των α,α-διχλωρο-β-κέτο εστέρων με χρήση της NADPH εξαρτώμενης κετορεδουκτάσης, KRED 101 προς το σχηματισμό των αντίστοιχων α,α-διχλωρο-β-υδρόξυ εστέρων. Για το σκοπό αυτό συντέθηκε το υπόστρωμα 2,2-διχλωρο-3-κυκλοξέξυλο-3-οξοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας, μελετήθηκε η ενζυμική αναγωγή του και προσδιορίστηκε η απόλυτη στερεοδομή του ανηγμένου προϊόντος με την χρήση MPA-εστέρων. Το προϊόν της αναγωγής, 2,2-διχλωρο-3-κυκλοξέξυλο-3-υδροξυ-προπανοϊκός μεθυλεστέρας σχηματίστηκε με εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια $>99\%$ *ee* και σε αρκετά καλή απόδοση. Έπειτα μελετήθηκε η εναντιοεκλεκτική αναγωγή των υποστρωμάτων α,α-διχλωρο-β-κέτο εστέρων σε τετραπλάσια κλίμακα και τα προϊόντα αναγωγής σχηματίστηκαν σε πολύ καλές αποδόσεις και με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα.

Στο δεύτερο μέρος παρουσιάζεται η σύνθεση του υποστρώματος φαινυλοκυκλοπεντενίου και η μελέτη της φωτοοξείδωσής του με την χρήση μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης, $^1\text{O}_2$. Ακόμη μελετήθηκε η φωτοοξείδωση της αλλυλικής αλκοόλης, 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-εν-1-όλης προς το σχηματισμό της αντίστοιχης ενόνης με την χρήση της εμπορικά διαθέσιμης υδατοδιαλυτής σουλφονικής ανθρακινόνης νατρίου (SAS). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης φωτοοξείδωσης δεν ήταν ικανοποιητικά.

Λέξεις-Κλειδιά: εναντιοεκλεκτική βιοαναγωγή, κετορεδουκτάσες, α,α-διχλωρο-β-κέτο εστέρες, φωτοοξείδωση, μοριακό οξυγόνο απλής κατάστασης, ανθρακινόνη

Abstract

The subject of the present thesis was the enantioselectivity study of the enzymatic reduction of α,α -dichloro- β -keto esters with ketoreductases in order to form compounds of high added value which can be used as intermediates in natural products synthesis. The photooxidation of an alkene substrate was also studied using singlet oxygen, $^1\text{O}_2$, as well as the photooxidation test of the produced allylic alcohol through an anthraquinone derivative in order to develop a synthetic route that combines Biocatalysis and Photocatalysis.

In the first part, the enantioselective reduction of α,α -dichloro- β -keto esters using the NADPH-dependent ketoreductase, KRED 101, to form the corresponding α,α -dichloro- β -hydroxy esters is presented. More specifically, 2,2-dichloro-3-cyclohexyl-3-oxopropanoate methyl ester was synthesized as the substrate, its enzymatic reduction was studied and the absolute configuration of the reduced product was determined using MPA-esters. The reduction product, methyl 2,2-dichloro-3-cyclohexyl-3-hydroxypropanoate, was formed in excellent enantiomeric excess $>99\%$ *ee* and in fairly good yield. The enantioselective reduction of α,α -dichloro- β -keto ester substrates was then studied in a four times larger scale and the reduction products were formed with excellent enantioselectivity, in very good yields and.

In the second part, the synthesis of phenyl-cyclopentene and the study of its photooxidation using singlet oxygen, $^1\text{O}_2$ is presented. The photooxidation of the allylic alcohol, 2-phenylcyclopent-2-en-1-ol, to form the corresponding enone was also studied using the commercially available water-soluble sodium anthraquinone sulfonate (SAS). The results of this specific photooxidation were not satisfactory.

Key Words: enantioselective bioreduction, ketoreductases, α,α -dichloro- β -keto esters, photooxidation, singlet oxygen, anthraquinone

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
Περίληψη	4
Abstract	5
Κεφάλαιο 1.....	7
1.1 Εισαγωγή	8
1.1.1 Συμβολή της Βιοκατάλυσης στην Οργανική Σύνθεση.....	8
1.1.2 Κετορεδουκτάσες	9
1.1.3 Αντίδραση Χλωρίωσης Οργανικών Ενώσεων	14
1.1.4 Σκοπός	16
1.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	17
1.2.1 Σύνθεση του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα και μελέτη της ενζυμικής αναγωγής του	17
1.2.2 Μελέτη ενταντιοεκλεκτικής ενζυμικής αναγωγής α,α-δίχλωρο-β-κέτο εστέρων.....	24
1.3 Πειραματικό μέρος.....	27
1.3.1 Αντιδραστήρια.....	27
1.3.2 Όργανα.....	27
1.3.3 Σύνθεση Υποστρωμάτων.....	27
1.4 Βιβλιογραφία	33
Κεφάλαιο 2.....	35
2.1 Εισαγωγή.....	36
2.1.1 Φωτοοξειδώσεις και Χρήση του Singlet Oxygen ($^1\text{O}_2$)	36
2.1.2 Αντιδράσεις μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$)	37
2.2.3 Σκοπός	39
2.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	40
2.3 Πειραματικό Μέρος	42
2.3.1 Αντιδραστήρια.....	42
2.3.2 Όργανα.....	42
2.3.3 Πειραματική διαδικασία	42
2.4 Βιβλιογραφία	44
Παράρτημα.....	45

Κεφάλαιο 1

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Συμβολή της Βιοκατάλυσης στην Οργανική Σύνθεση

Πολλές φορές η κλασική Οργανική Σύνθεση ενέχει δυσκολίες με αντιδράσεις οι οποίες είναι χρονοβόρες, με μικρές αποδόσεις, αντιδράσεις με μεγάλο κόστος και σχηματισμό τοξικών αποβλήτων τα οποία απαιτούν ιδιαίτερη διαχείριση. Η χρήση ενζύμων ως βιοκαταλύτες μπορεί να είναι μία εναλλακτική προσέγγιση στην Οργανική Σύνθεση και χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο με την εξέλιξη της Βιοτεχνολογίας καθώς δίνει πληθώρα πλεονεκτημάτων. Γενικότερα, τα ένζυμα είναι βιομόρια πρωτεϊνικής φύσης έχοντας ως βιολογικό ρόλο την πραγματοποίηση βιολογικών μετασχηματισμών.¹ Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως ολόκληρος οργανισμός είτε ως απομονωμένο ένζυμο. Η χρήση ολόκληρου του κυττάρου ως βιοκαταλύτη για την διεξαγωγή μίας αντίδρασης οδηγεί συχνά σε μία μικτή στερεοεκλεκτικότητα εξαιτίας των πολλαπλών ανταγωνιστικών ενζύμων παραπλήσιας δραστηριότητας που υπάρχουν στο κύτταρο.² Για το λόγο αυτό συνήθως προτιμάται η χρήση απομονωμένου ενζύμου. Τα ένζυμα δεν επηρεάζουν το σημείο ισορροπίας της αντίδρασης ενώ παράλληλα μειώνουν πολύ το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωσή της.¹

Μία σημαντική ιδιότητα την οποία εμφανίζουν τα ένζυμα είναι η ειδικότητα και στερεοεκλεκτικότητα, απόρροια της οποίας είναι υψηλή εκλεκτικότητα ως προς την χειρομορφία του υποστρώματος. Γενικότερα η εκλεκτικότητα των ενζύμων μπορεί να είναι : χημειο-, τοπο-, εναντιο- και διαστεreo- εκλεκτικότητα. Η στερεοεκλεκτικότητα όμως είναι η πιο σημαντική καθώς δίνει την δυνατότητα να σχηματιστούν οπτικά καθαρές ενώσεις με υψηλή βιολογική δραστηριότητα γεγονός που είναι απαραίτητο για την Βιομηχανία Φαρμάκων και Τροφίμων. Αυτό συμβαίνει διότι τα εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος μπορεί να έχουν αντίθετες βιολογικές επιδράσεις στον οργανισμό με χαρακτηριστικό παράδειγμα κάποια φάρμακα που μόνο το ένα εναντιομερές είναι δραστικό ενώ το άλλο μπορεί να είναι ακόμη και τοξικό για τον οργανισμό. Ακόμη μία ιδιότητα των ενζύμων είναι ότι ακολουθούν τις Αρχές της Πράσινης Χημείας εξασφαλίζοντας έναν βιωσιμότερο τρόπο συνθετικής πορείας χημικών ενώσεων, φιλικό προς το περιβάλλον, καθώς τα ένζυμα είναι πλήρως βιοαποικοδομήσιμα. Ακόμη, τα ένζυμα λειτουργούν σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH και απαιτούν συνήθως υδατικό περιβάλλον αντίδρασης.³

Μεγάλος αριθμός οργανικών χημικών στο παρελθόν αντιμετώπιζε τα ένζυμα ως ακατάλληλους καταλύτες στηρίζοντας την άποψή τους στις λανθασμένες εντυπώσεις ότι ήταν ασταθή, ακριβά και ότι δέχονται μικρό εύρος υποστρωμάτων. Λόγω της εξέλιξης της ενζυμικής Βιοτεχνολογίας, τα ένζυμα τροποποιούνται ώστε να διαθέτουν όλες τις επιθυμητές ιδιότητες για την χρήση τους ως καταλύτες. Ως επακόλουθο η ενζυμική κατάλυση κερδίζει έδαφος σε πολλούς τομείς έρευνας και παραγωγής προϊόντων με το 5% πλέον της ενζυμικής παραγωγής να χρησιμοποιείται στον τομέα της Βιοκατάλυσης.

Ο αριθμός των ενζύμων που έχουν ανακαλυφτεί και αναγνωριστεί από την Διεθνή Ένωση της Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (IUBMB) έως σήμερα είναι περίπου 3700 ενώ ο προβλεπόμενος αριθμός ενζύμων που υπάρχουν συνολικά στην φύση φτάνει τα 25.000. Μόνο το 10% αυτών έχει μελετηθεί και είναι διαθέσιμο εμπορικά με τον αριθμό αυτό σταθερά να αυξάνεται. Για την ευκολότερη μελέτη των ενζύμων η Διεθνής Επιτροπή Ενζύμων το 1956 πρότεινε την κατάταξή τους σε 7 κατηγορίες με βάση τον τύπο αντίδρασης τα οποία καταλύουν. Σε κάθε ένζυμο αντιστοιχεί ένας

μοναδικός κωδικός, EC (Enzyme Commission) ο οποίος περιέχει τέσσερα ψηφία που χωρίζονται με τελεία πχ EC A.B.C.D. Τα ψηφία αυτά κατά σειρά δηλώνουν το είδος της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο, το είδος του υποστρώματος, την φύση του συν-υποστρώματος και τέλος ένας ξεχωριστός αριθμός για κάθε ένζυμο.³ Οι κατηγορίες στις οποίες ταξινομήθηκαν τα ένζυμα παρουσιάζονται στο Πίνακα 1.

Πίνακας 1- Κατηγορίες ταξινόμησης ενζύμων.

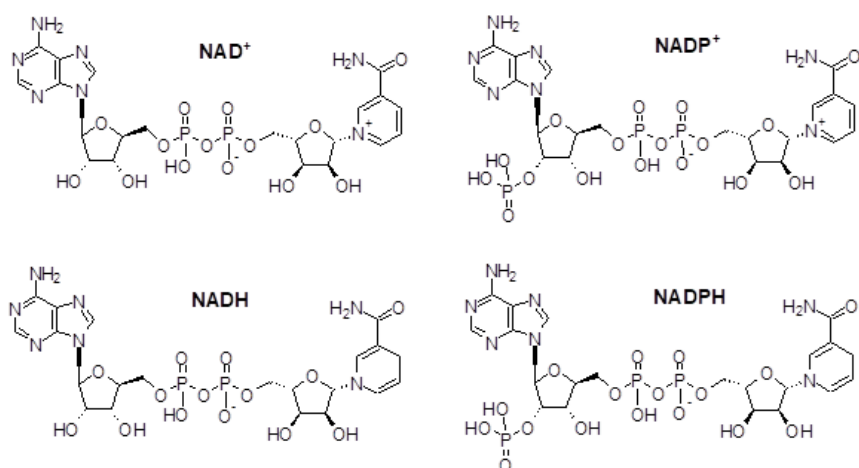
Πρώτο Ψηφίο	Κατηγορία Ενζύμου	Φύση αντίδρασης
1	Οξειδοοξειδοκτάσες	Οξείδωση, Αναγωγή
2	Τρανσφεράσες	Μεταφορά ομάδας: αλδευδική, κετονική, ακύλιου, σακχάρου, φωσφορική, μεθυλική κ.α.
3	Υδρολάσες	Υδρόλυση/Σχηματισμός δεσμών εστέρων, λακτονών, νιτριλίων, εποξειδίων κ.α.
4	Λυάσες	Προσθήκη/απομάκρυνση μικρών μορίων σε διπλούς δεσμούς: C=C, C=O, C=N
5	Ισομεράσες	Ισομερισμοί, επιμερισμοί, αναδιατάξεις
6	Λιγάσες	Συνένωση δύο μορίων με διάσπαση πυροφωσφορικού δεσμού τριφώσφορο-νουκλεοζίτη
7	Τρανσλοκάσες	Μεταφορά ιόντων ή μορίων κατά μήκος των μεμβρανών

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται επί το πλείστον στην Οργανική Σύνθεση είναι οι Οξειδοοξειδοκτάσες (EC 1) και οι Υδρολάσες (EC 3).

1.1.2 Κετοοξειδοκτάσες

Ευρέως χρησιμοποιούμενη υποκατηγορία οξειδοοξειδοκτασών στην οργανική σύνθεση είναι οι κετοοξειδοκτάσες (KREDs) (ή αλκοολικές αφυδρογονάσες, ADHs), οι οποίες αποτελούν τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Το κυριότερο πλεονέκτημα των ενζύμων αυτών είναι η υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα που εμφανίζουν κατά την αναγωγή του υποστρώματος. Η μετατροπή του κέντρου άνθρακα από sp^2 υβριδισμό σε sp^3 συνήθως συνοδεύεται με τη δημιουργία ενός χειρόμορφου κέντρου. Τα συνηθέστερα υποστρώματα των KREDs είναι οι προχειρόμορφες καρβονλικές ομάδες αλδευδών και κετονών οι οποίες μετασχηματίζονται σε ενώσεις με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα.² Τα προϊόντα της αντίδρασης αναγωγής είναι συνήθως χειρόμορφες δευτεροταγείς αλκοόλες με υψηλή

οπτική καθαρότητα οι οποίες αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα στην σύνθεση φυσικών προϊόντων και ενώσεων υψηλής αξίας.⁴ Σε αντίθεση με τα υδρολυτικά ένζυμα, οι οξειδοϋδρογονάσες είναι NAD(P)H εξαρτώμενες το οποίο σημαίνει ότι για να πραγματοποιηθεί μία αντίδραση αναγωγής ή οξείδωσης απαιτείται η χρήση νικοταμιδικού συμπαραγόντα. Ο ρόλος του συμπαραγόντα νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτιδίου NAD(P)H είναι η προσφορά/αποδοχή αντίστοιχα των χημικών ισοδυνάμων υδριδίου στο υπόστρωμα. Με τον τρόπο αυτό το καρβονυλικό υπόστρωμα ανάγεται προς την αντίστοιχη αλκοόλη ενώ το συνένζυμο NAD(P)H οξειδώνεται σε NADP⁺ (Σχήμα 1).

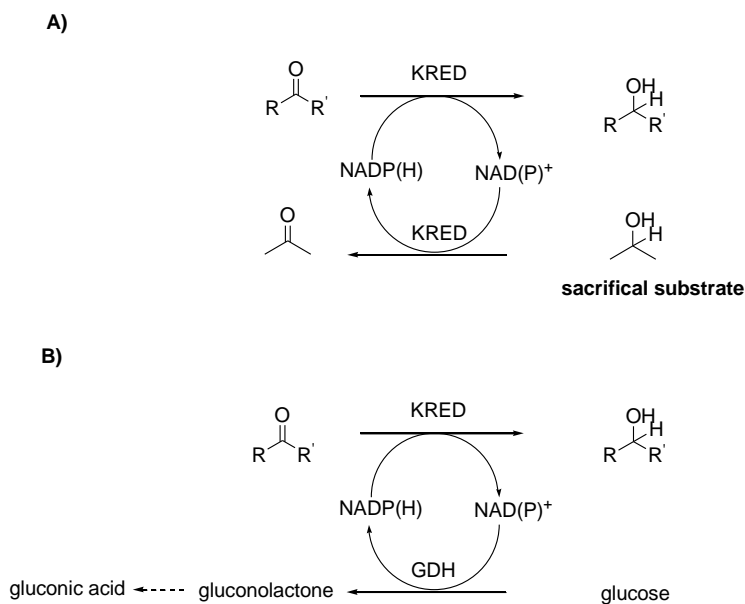


Σχήμα 1. Νικοτιναμιδο Αδένινο Δινουκλεοτίδιο σε οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή και Φωσφορικό Νικοτιναμιδο Αδένινο Δινουκλεοτίδιο σε οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή.

Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης απαιτείται η προσθήκη του συνενζύμου σε στοιχειομετρική ποσότητα. Λόγω του αυξημένου κόστους που έχει το συνένζυμο NAD(P)H απαιτείται ανακύκλωσή του με κάποιο σύστημα ανακύκλωσης ώστε να οδηγείται η ισορροπία προς το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Υπάρχουν διάφορα συστήματα ανακύκλωσης και παρακάτω παρουσιάζονται δύο από τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον (Σχήμα 2):

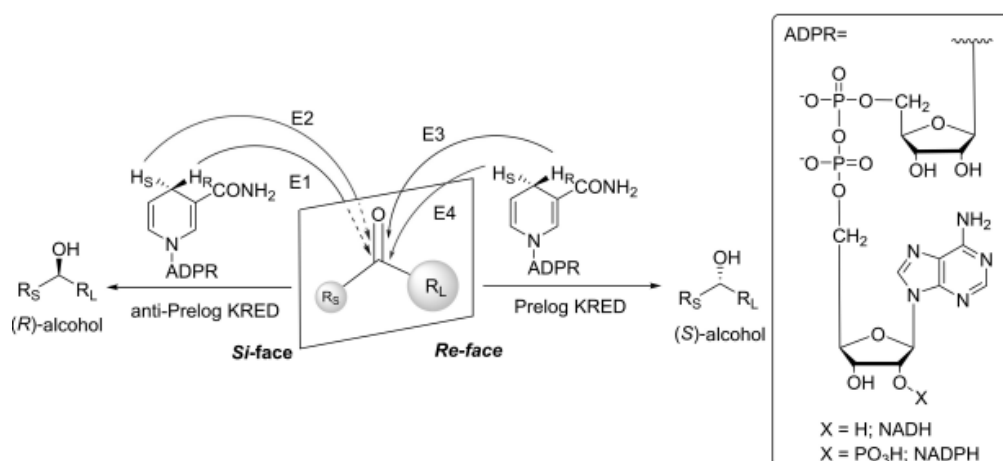
A) Με συνδυασμό υποστρωμάτων: Το ίδιο ένζυμο κετοϋδρογονάσης το οποίο καταλύει την αναγωγή της προχειρόμορφης κετόνης σε οπτικά καθαρή αλκοόλη, καταλύει ταυτόχρονα και την οξείδωση ενός συν-υποστρώματος, συνήθως ισοπροπανόλης. Το μειονέκτημα αυτού του συστήματος ανακύκλωσης είναι η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου για την επιθυμητή αντίδραση.

B) Με συνδυασμό ενζύμων: Εκτός από την κετοϋδρογονάση η οποία καταλύει την κύρια αντίδραση, χρησιμοποιείται ένα δεύτερο ένζυμο το οποίο οξειδώνει το συν-υπόστρωμα το οποίο οδηγεί στην αναγέννηση της ανηγμένης μορφής του συνενζύμου NAD(P)H.³ Αυτή η διαδικασία ανακύκλωσης χρησιμοποιήθηκε και στα πλαίσια των ενζυμικών αναγωγών της συγκεκριμένης εργασίας. Ως συν-υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η D-γλυκόζη και το ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωσή της είναι η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH).



Σχήμα 2. Συστήματα ανακύκλωσης συνενζύμου NAD(P)H.

Η προσφορά και αποδοχή υδριδίου γίνεται στην θέση 4 του νικοτιναμιδικού δακτυλίου. Στην συγκεκριμένη θέση του δακτυλίου βρίσκονται δύο διαστερεοτοπικά υδρογόνα (H_R , H_S) τα οποία είναι pro-R και pro-S αντίστοιχα. Το ένζυμο μπορεί να διακρίνει τις δύο διαστερεοτοπικές επιφάνειες κατά την αναγωγή του συνενζύμου. Η ιδιότητα του αυτή προσδίδει στην αντίδραση στερεοεκλεκτικότητα τόσο ως προς το συνένζυμο όσο και προς το υπόστρωμα. Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά είδη στερεοειδικότητας των KREDs ανάλογα με ποιο υδρογόνο, H_R ή H_S του συνενζύμου προσβάλλει ποια επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης, Re-face και Si-face, ώστε να πραγματοποιηθεί η αναγωγή της (Σχήμα 3).

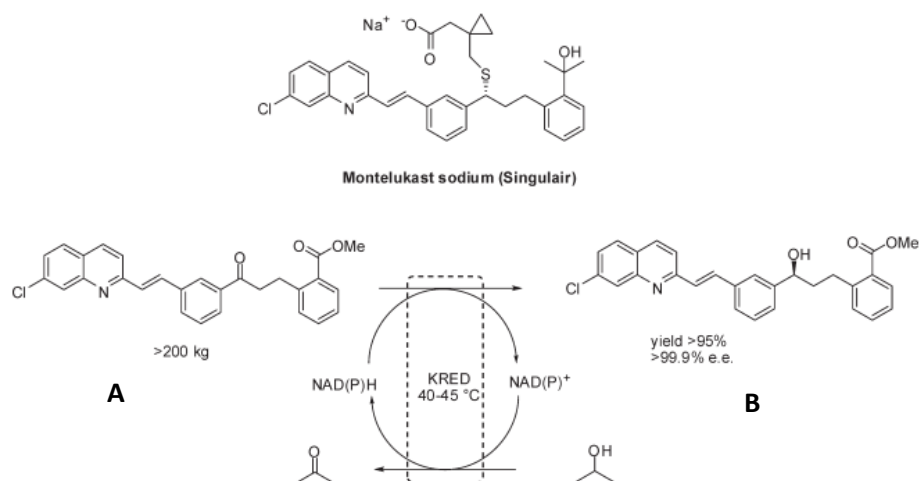


Σχήμα 3. Τύποι στερεοειδικότητας Κετορεδουκτασών (KREDs).⁷

Ο κανόνας του Prelog μπορεί να προβλέψει ποια επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης θα αναχθεί.⁵ Ο κανόνας αυτός αφορά προχειρόμορφες κετόνες με μεγάλη

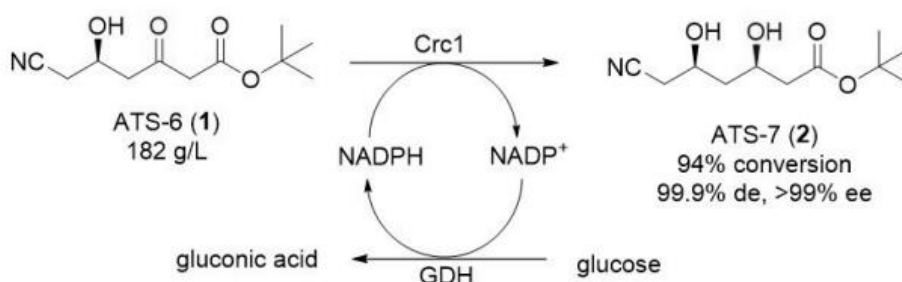
διαφορά μεγέθους στους υποκαταστάτες (small και large ligands) και προβλέπει ότι μόνο η Re επιφάνεια ανάγεται και σχηματίζεται η (*S*)-αλκοόλη. Ο Κανόνας του Prelog ακολουθείται από μεγάλο αριθμό αλκοολικών αφυδρογονασών όπως οι yeast ADH, HLADH και Baker's Yeast. Υπάρχουν όμως και ένζυμα τα οποία δεν τον ακολουθούν και χαρακτηρίζονται ως Anti-Prelog ανάγοντας την Si επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης σχηματίζοντας (*R*)- αλκοόλη.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής μιας κετορεδουκτάσης για την σύνθεση ενός ενδιαμέσου φαρμακευτικής ουσίας είναι η περίπτωση του φαρμάκου κατά του άσθματος Singulair, από την εταιρία Merck. Η εταιρεία Codexis ανέπτυξε μία νέα βιοκαταλυτική διαδικασία για την σύνθεση ενός δραστικού ενδιαμέσου του συγκεκριμένου φαρμάκου (Singulair). Συγκεκριμένα μια κετορεδουκτάση, χρησιμοποιείται πλέον για την ασύμμετρη αναγωγή του (A) προς το σχηματισμό της (*S*)-αλκοόλης (B) η οποία μετατρέπεται στη συνέχεια στο δραστικό φαρμακευτικό συστατικό Montelukast (Σχήμα 4). Η χρήση του βιοκαταλύτη έναντι του αρχικού χειρόμορφου καταλύτη (-)-DIP-Cl έχει πλεονεκτήματα καθώς συμβάλει στην τόπο- και στέρεο- εκλεκτική αναγωγή του αντιδραστηρίου (A) με απόδοση >95% και >99% *ee*. Επίσης σημαντικό είναι ότι οι συνθήκες της αντίδρασης με το ένζυμο είναι φιλικές προς το περιβάλλον και χαμηλότερου κόστους. Για την ανακύκλωση του συμπαράγοντα NAD(P)H χρησιμοποιήθηκε το συν-υπόστρωμα, ισοπροπανόλη.⁶



Σχήμα 4. Βιοκαταλυτικό στάδιο κατά τη σύνθεση του δραστικού ενδιαμέσου Montelukast.⁶

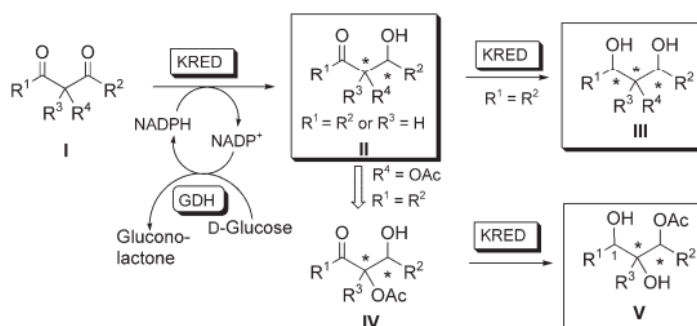
Ακόμη ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα συμβολής της βιοκατάλυσης αποτελεί η χημειοενζυμική σύνθεση της φαρμακευτικής ουσίας Atorvastatin που ανήκει στην κατηγορία των στατινών. Οι στατίνες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενώσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται σε πληθώρα φαρμακευτικών σκευασμάτων τα οποία αντιμετωπίζουν καρδιοαγγειακά νοσήματα καθώς έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την σύνθεση χοληστερίνης στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, η διόλη ATS-7 αποτελεί ένα χειρόμορφο ενδιάμεσο για την παραγωγή του Atorvastatin. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία μία κετορεδουκτάση Crc1 από τον οργανισμό *Candida boidini* χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγή του κέτο-εστέρα ATS-6 προς τον σχηματισμό του ATS-7 υπό βέλτιστες συνθήκες. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά καθώς η απόδοση της βιοαναγωγής βρέθηκε 94% με 99.9% *de* και >99% *ee* (Σχήμα 5).⁷



Σχήμα 5. Στερεοεκλεκτική αναγωγή του κέτο-εστέρα ATS-6 (1) προς την αντίστοιχη διόλη ATS-7(2), ενδιάμεσου του Atorvastatin με την χρήση κετορεδοκτάσης Crc1.⁷

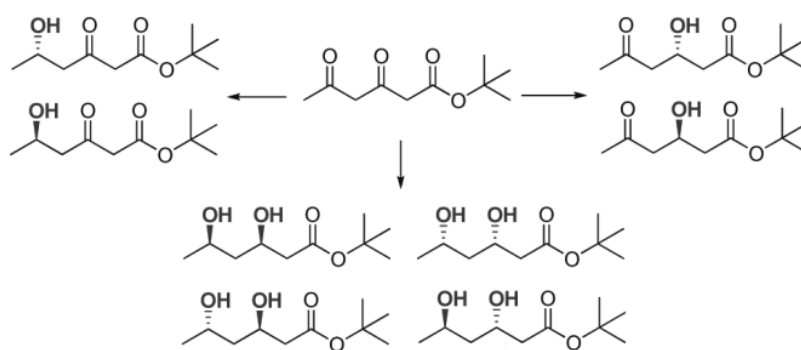
Τα τελευταία 20 χρόνια το εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης-Βιοκατάλυσης με υπεύθυνη την κ. Σμόνου Ι. έχει μελετήσει σε βάθος τις βιοκαταλυτικές αναγωγές μεγάλου εύρους υποστρωμάτων και πιο συγκεκριμένα υποστρώματα όπως οι 1,3 δικετόνες, οι β-κέτο εστέρες, οι β,δ-δικέτοεστέρες, οι α-άμιδο και α-κυανοάλκυλο-β-κετοεστέρες με την χρήση απομονωμένων, εμπορικά διαθέσιμων NADPH εξαρτώμενων κετορεδοκτασών.

Το 2006 περιγράφηκε η σύνθεση υψηλής αξίας χειρόμορφων ενδιάμεσων για ενώσεις με σημαντική βιολογική δραστηριότητα. Από α-υποκατεστημένες 1,3- δικετόνες σχηματίζονται οι αντίστοιχες β-κέτο αλκοόλες ή 1,3 διόλες με την χρήση 34 απομονωμένων και εμπορικά διαθέσιμων KREDs. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν αναγωγή με υψηλή τοπο- και στερεο- εκλεκτικότητα (Σχήμα 6).⁸



Σχήμα 6. Ενζυμική Αναγωγή α-άλκυλο-1,3 δικετονών ή α-άλκυλο-β-κέτο εστέρων με την χρήση NADPH εξαρτώμενων Κετορεδοκτασών.⁸

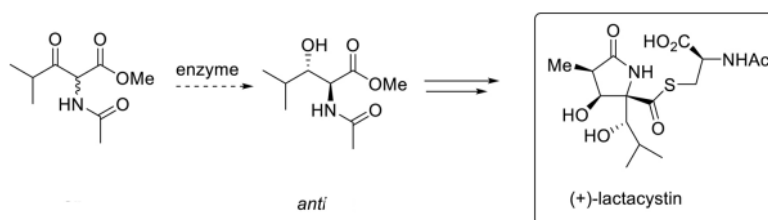
Στην συνέχεια, το 2012 η ερευνητική μας ομάδα μελέτησε την ενζυμική αναγωγή περισσότερο πολύπλοκων υποστρωμάτων όπως οι β,δ-δικέτο εστέρες με την χρήση 23 εμπορικά διαθέσιμων απομονωμένων κετορεδοκτασών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με έναν από τους πιο απλούς δικετοεστέρες, τον 3,5- διοξοεξανοϊκό-τριτ-βουτυλεστέρα και σχηματίστηκαν 7 από τα 8 πιθανά στερεοϊσομερή, με υψηλή εναντιομερική και διαστερομερική περίσσεια και σε ένα στάδιο, στην ίδια φιάλη αντίδρασης και χωρίς απομόνωση του ενδιάμεσου προϊόντος (one-step, one-pot) (Σχήμα 7).⁹



Σχήμα 7. Όλα τα πιθανά προϊόντα αναγωγής του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα.⁹

Παράλληλα η ερευνητική μας ομάδα έχει συνθέσει ποικίλα φυσικά προϊόντα εφαρμόζοντας τις παραπάνω βιοκαταλυτικές μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα το 2006 περιγράφηκε η σύνθεση της φυσικής φερομόνης (+)-Sitophilure από NADPH εξαρτώμενες KREDs, μία σύνθεση 2 σταδίων.^{10a} Ακόμη περιγράφηκε η σύνθεση της φυσικής φερομόνης Sitophilate σε δύο στάδια τα οποία περιλαμβάνουν μια ενζυμική αναγωγή ακολουθούμενη από μια ενζυμική υδρόλυση.^{10b} Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα σύνθεσης φυσικών προϊόντων που περιγράφηκε το 2011, είναι η ολική σύνθεση του (*R*)-3-υδροξύ-εξανοϊκού-(*S*)-2-πεντυλεστέρα με χημειοενζυμικό τρόπο σε μόλις τρία στάδια όπου αντιδράσεις κλειδιά ήταν δύο ενζυμικές αναγωγές και μια ενζυμική μετεστεροποίηση.¹¹ Τέλος περισσότερα φυσικά προϊόντα τα οποία συντέθηκαν από την ερευνητική μας ομάδα είναι η Stegobinone, Stegobiol. Όλα τα παραπάνω φυσικά προϊόντα συντέθηκαν με εξαιρετική ενταντιοεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα και σε υψηλές αποδόσεις.¹²

Το 2020 ακόμη περιγράφηκε η ασύμμετρη αναγωγή α-άμιδο και α-κυανοάλκυλο-β-κέτο εστέρων προς τον σχηματισμό οπτικά καθαρών β-υδροξύ-α-άμιδο-εστέρων και β-υδροξύ-α-κυανοάλκυλο εστέρων με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα χρησιμοποιώντας NADPH εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μέθοδος οδήγησε στην σύνθεση του 2-ακεταμιδο-3-υδροξύ-4-μεθυλοπεντανοϊκού-τριτ-βουτυλεστέρα, ένα πολύτιμο χειρόμορφο ενδιάμεσο για τη σύνθεση της lactacystin (αντιβιοτικού) με υψηλή απόδοση και διαστερεοεκλεκτικότητα.¹³



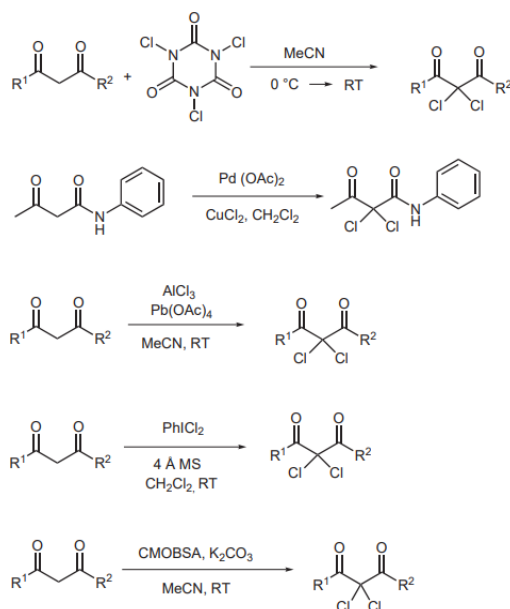
Σχήμα 8. Ενζυμικά καταλυόμενη σύνθεση του anti-2-ακετάμιδο-3-υδροξύ-4-μεθυλοπεντανοϊκού ως ενδιάμεσο για την σύνθεση του (+)-lactacystin.¹³

1.1.3 Αντίδραση Χλωρίωσης Οργανικών Ενώσεων

Στην Βιομηχανία Φαρμάκων και στην Φαρμακευτική Χημεία η χρήση αλογονωμένων ενώσεων αποτελεί ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο πεδίο εφαρμογής. Ειδικότερα οι χλωριωμένες ενώσεις απαρτίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό των αλογονωμένων

ενώσεων οι οποίες χρησιμοποιούνται στα φαρμακευτικά σκευάσματα για την θεραπεία ασθενειών όπως η μνηιγγίτιδα, η υπέρταση, η αναιμία, βακτηριακές μολύνσεις και πολλές ακόμα παθήσεις.¹⁴ Το χλώριο προσδίδει στην ένωση χημική και μεταβολική σταθερότητα γεγονός το οποίο είναι απαραίτητο για την δράση ενός φαρμάκου. Η μεταβολική τους σταθερότητα αυξάνεται σε σύγκριση με τις μη χλωριωμένες μητρικές ενώσεις ενώ ταυτόχρονα δεν επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης του φαρμάκου με το υπόστρωμα.¹⁵ Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην λιποφιλική του φύση δηλαδή την ικανότητα δέσμευσής των ενώσεων αυτών σε λιπόφιλες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης είτε λιπόφιλων τμημάτων των πρωτεϊνών. Γενικότερα ο δεσμός άνθρακα χλωρίου είναι πολύ σημαντικός στην Οργανική Σύνθεση και πολλές χλωριωμένες ενώσεις χρησιμοποιούνται ως βασικές δομικές μονάδες για την σύνθεση περαιτέρω ενώσεων. Συγκεκριμένα οι α,α-διχλωριωμένες δικαρβονυλικές ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση οπτικά ενεργών α,α-δίχλωρο-β-υδρόξυ εστέρων, ενώσεις με σημαντική βιολογική δραστηριότητα.¹⁶

Καθίσταται λοιπόν επιτακτική η ανάγκη εύρεσης μεθόδων χλωρίωσης οι οποίες να είναι φιλικές προς το περιβάλλον και με ικανοποιητικές αποδόσεις. Παλαιότερα πειραματικά πρωτόκολλα για την διχλωρίωση δικαρβονυλικών ενώσεων προϋπόθεταν την χρήση τοξικών αντιδραστηρίων και καταλυτών αλλά και μεγάλο κόστος για την υλοποίησή τους. Μερικά παραδείγματα μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι: α)τριχλωροϊσοκυανουρικό οξύ/CH₃CN¹⁷, β)Pd(OAc)₂¹⁸, γ) AlCl₃/Pb(OAc)₄¹⁹, δ)PhICl₂/CH₂Cl₂²⁰, στ)CMOBSA/K₂CO₃,MeCN²¹ (Σχήμα 9). Οι παραπάνω μέθοδοι διχλωρίωσης έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την χρήση οργανικών διαλυτών ενώ κάποιες από αυτές απαιτούν την χρήση τοξικών αντιδραστηρίων και καταλυτών βαρέων μετάλλων.¹⁶



Σχήμα 9. Παλαιότερες μέθοδοι α,α-διχλωρίωσης β-δικαρβονυλικών ενώσεων.¹⁶

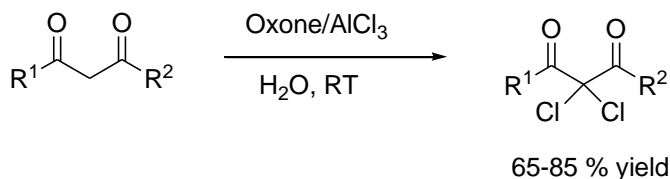
Η ερευνητική μας ομάδα έχει προτείνει ως μέθοδο α,α-διχλωρίωσης 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων το σύστημα Oxone/AlCl₃ σε υδατικό περιβάλλον, μια μεθοδολογία που κρίθηκε πολύ αποτελεσματική καθώς τα προϊόντα α,α-διχλωρίωσης σχηματίστηκαν σε αρκετά υψηλές αποδόσεις και στις περισσότερες των περιπτώσεων σε σύντομους χρόνους αντίδρασης. Το συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιήθηκε και

στην παρούσα διπλωματική εργασία. Το Oxone χαρακτηρίζεται ως ένα “triple salt” άλατος του καλίου με υπεροξυμονοθειϊκό οξύ το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως ήπιο οξειδωτικό. Οι σημαντικότερες ιδιότητες του έγκεινται στο γεγονός ότι είναι ένα σταθερό αντιδραστήριο, μη τοξικό, χαμηλού κόστους και δραστικό σε υδατικό περιβάλλον.²² Η μέθοδος αυτή υπερισχύει σε σχέση με τις προηγούμενες λόγω της πιο φιλικής προς το περιβάλλον και βιώσιμης προσέγγισης για τον μετασχηματισμό χημικών ενώσεων. Το Oxone χρησιμοποιείται ως οξειδωτικό σε πληθώρα αντιδράσεων εκτός από την διχλωρίωση δικαρβονυλικών ενώσεων.²³



Σχήμα 10. Μοριακός τύπος εμπορικά διαθέσιμου Oxone και δραστικής οξειδωτικής μορφής.²³

Για να επιτευχθεί η διχλωρίωση απαιτείται μία πηγή χλωρίου όπως το AlCl_3 όπου με την παρουσία του Oxone στο διάλυμα σχηματίζονται κατιόντα χλωρίου (Cl^+) τα οποία μπορούν να προσβληθούν από την πυρηνόφιλη ενολική μορφή του δικαρβονυλικού συστήματος σχηματίζοντας τελικά τις α, α -διχλωρωμένες ενώσεις.¹⁶



Σχήμα 8 . Διχλωρίωση 1,3 δικαρβονυλικών ενώσεων με σύστημα Oxone/ AlCl_3 .

1.1.4 Σκοπός

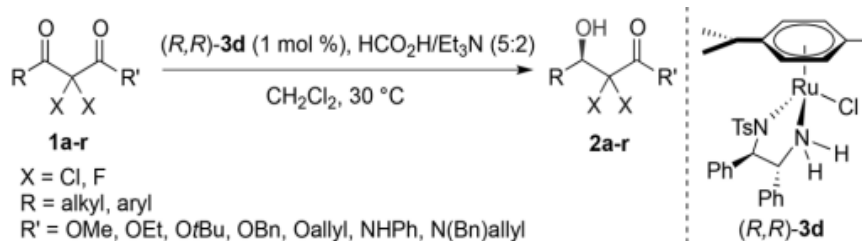
Στο πρώτο Κεφάλαιο της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας συντέθηκε το υπόστρωμα 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξέυλο-3-οξοπροπανοϊκός μεθυλεστεράς με σκοπό τη μελέτη της εναντιοεκλεκτικής ενζυμικής αναγωγής του με την KRED 101. Εκτός από το συγκεκριμένο υπόστρωμα μελετήθηκαν και άλλοι α, α -δίχλωρο- β -κέτο εστέρες ως προς την ενζυμική αναγωγή τους στις ίδιες συνθήκες αντίδρασης. Η μελέτη αυτή έχει στόχο την εύρεση ενός εναλλακτικού τρόπου σύνθεσης των α, α -δίχλωρο- β -υδρόξυ εστέρων μέσω ενός σταδίου.

1.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

1.2.1 Σύνθεση του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα και μελέτη της ενζυμικής αναγωγής του

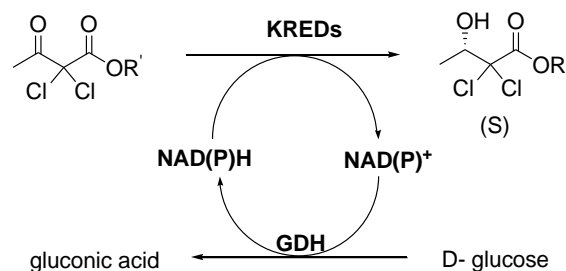
Η ασύμμετρη αναγωγή α,α-δίχλωρο-β-κέτο εστέρων αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο συνθετικό μετασχηματισμό στον οποίο το τελικό προϊόν είναι οπτικά καθαροί α,α-δίχλωρο-β-υδρόξυ εστέρες, σημαντικά ενδιάμεσα για μόρια με υψηλή βιολογική δραστικότητα.

Βιβλιογραφικά ο μοναδικός τρόπος που έχει μελετηθεί για την αποτελεσματική σύνθεση α,α-δίχλωρο-β-υδρόξυ εστέρων είναι από την ομάδα του Zheng με την χρήση ενός οργανομεταλλικού καταλύτη Ru ([RuCl(p-cymene)(R,R)-TsDPEN]). Οι βέλτιστες συνθήκες στην αντίδραση ασύμμετρης μεταφοράς υδρογόνου είναι με την χρήση διαλύτη CH₂Cl₂, και ως πηγή Η το σύστημα HCOOH/Et₃N και θερμοκρασία στους 30 °C.²⁴ Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για απλούστερα υποστρώματα με υψηλές αποδόσεις και υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα. Αντίθετα σε αρωματικά συστήματα και σε περισσότερο παρεμποδισμένα υποστρώματα οι αποδόσεις ήταν πιο χαμηλές καθώς και το ποσοστό της εναντιομερικής περιόσεως.



Σχήμα 9. Αναγωγή α,α-διαλογωνωμένων-β-κέτο εστέρων (1a-r) με καταλύτη [RuCl(p-cymene) (R,R)-TsDPEN)] (3d) προς σχηματισμό α,α- διαλογωνωμένων-β-υδρόξυ εστέρων (2a-r).²⁴

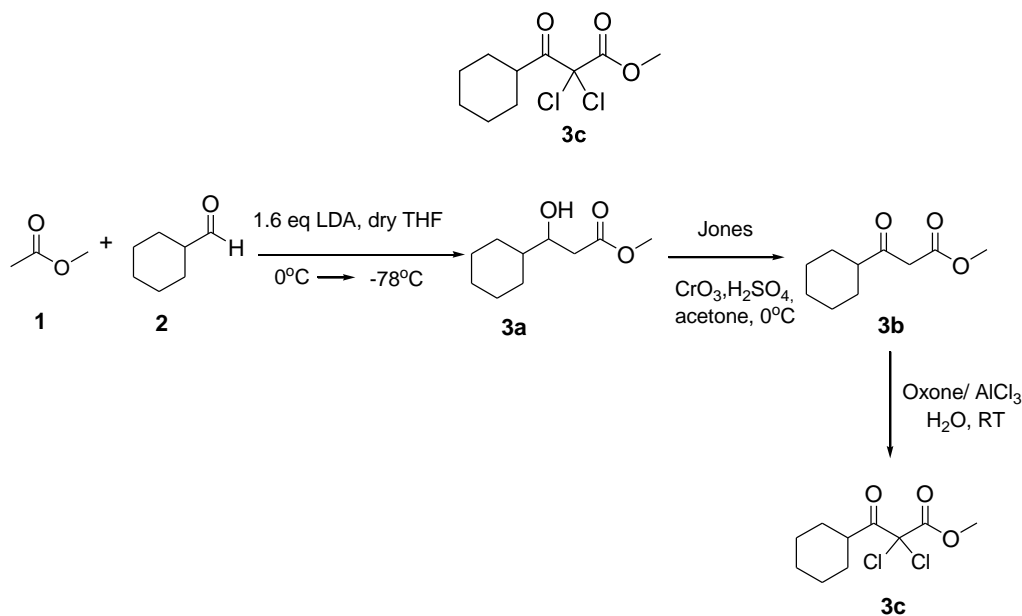
Η ερευνητική μας ομάδα έχει μελετήσει εκτενώς την στερεοεκλεκτική αναγωγή προχειρόμορφων α-υποκατεστημένων-β-κέτο εστέρων με την χρήση NAD(P)H εξαρτώμενων κετορεδοκτασών. Η ενζυμική αυτή μέθοδος συγκρινόμενη με την μέθοδο του οργανομεταλλικού καταλύτη Ru, αποτελεί μία περιβαλλοντικά φιλικότερη συνθετική πορεία, πιο οικονομική και με βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Οι κετορεδοκτάσες κατέλυσαν σε ένα βήμα την στερεοεκλεκτική αναγωγή ενός εύρους υποστρωμάτων προς το σχηματισμό (S)-α,α-δίχλωρο-β-υδρόξυ εστέρων με αρκετά καλές αποδόσεις και με εξαιρετική οπτική καθαρότητα (>99% ee). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα αυτά συμπεριλαμβάνουν ακόμη και στερεοχημικά παρεμποδισμένα υποστρώματα στα οποία η προηγούμενη μέθοδος δεν είχε επιτυχία.²⁵



Σχήμα 10. Ενζυμική αναγωγή α,α-δίχλωρο-β- κέτο- εστέρων με χρήση κετορεδουκτασών (KREDs) προς το σχηματισμό (S)- α,α-δίχλωρο-β-υδρόξυ εστέρων. Σύστημα ανακύκλωσης του συμπαράγοντα NADPH με το σύστημα αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) και D- γλυκόζη.

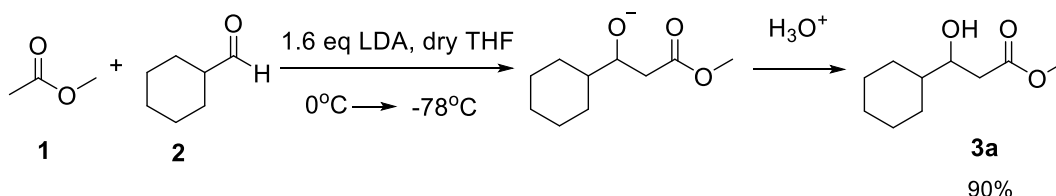
Η παρούσα Πτυχιακή εργασία στο πρώτο κεφάλαιο περιλαμβάνει την σύνθεση α,α-δίχλωρο-β-κέτο εστέρων και την ενζυμική αναγωγή τους με την χρήση των KREDs. Σκοπός της μελέτης αυτής όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω είναι η απευθείας βιοαναγωγή α,α-δίχλωρο-β-κέτο εστέρων με την χρήση των κετορεδουκτασών προς τον σχηματισμό των αντίστοιχων χειρόμορφων υδρόξυ εστέρων με υψηλή εναντιομερική καθαρότητα.

Το πρώτο υπόστρωμα το οποίο συντέθηκε ήταν ο 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-οξοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3c**) με σκοπό την μελέτη της ενζυμικής αναγωγής του. Για την σύνθεση του συγκεκριμένου υποστρώματος πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αλδολικής συμπύκνωσης, χημικής οξείδωσης με αντιδραστήριο Jones και αντίδραση δίχλωρίωσης με σύστημα Oxone/ AlCl_3 .



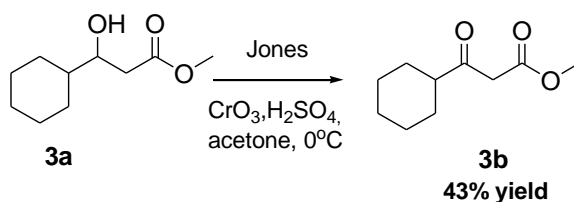
Σχήμα 11. Συνθετική πορεία για τον σχηματισμό του υποστρώματος 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3c**).

Αρχικά, την πρώτη αντίδραση για την σύνθεσή του αποτελεί μία αλδολική συμπύκνωση μεταξύ του οξικού μεθυλεστέρα (**1**) και της κυκλοεξυλομεθανάλης (**2**) προς το σχηματισμό του 3-κυκλοεξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3a**). Τα αντιδραστήρια (**1**) και (**2**) ήταν εμπορικά διαθέσιμα. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση απαιτήθηκαν επίσης τα αντιδραστήρια n-BuLi και δισοπροπυλαμίνη, τα οποία ήταν εμπορικά διαθέσιμα, με σκοπό τον *in situ* σχηματισμό της λίθιο δισοπροπυλαμίνης (LDA). Το τελικό προϊόν (**3a**) απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό με απόδοση 90%.



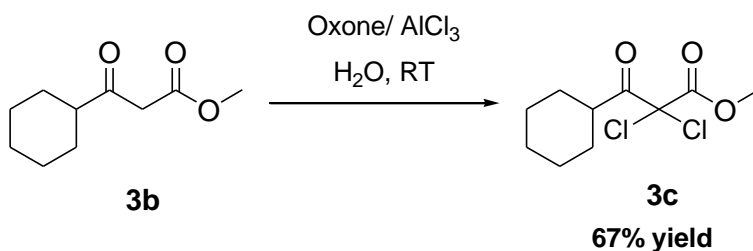
Σχήμα 12. Αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης οξικού μεθυλεστέρα (**1**) και κυκλοεξυλομεθανάλης (**2**) σε διαλύτη dry THF προς το σχηματισμό 3-κυκλοεξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3a**).

Έπειτα ο 3-κυκλοεξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3a**) υφίσταται χημική οξείδωση με αντιδραστήριο Jones (CrO_3 , H_2SO_4) σε διαλύτη ακετόνη στους 0°C προς το σχηματισμό του αντίστοιχου κετονικού υποστρώματος, 3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3b**). Για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης και τελικά απομονώθηκε με απόδοση 43%.



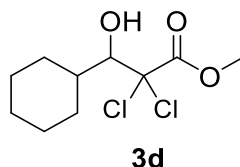
Σχήμα 13. Αντίδραση χημικής οξείδωσης του 3-κυκλοεξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3a**) με αντιδραστήριο Jones προς τον σχηματισμό του 3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3b**).

Στην συνέχεια ο 3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3b**) υπόκειται σε αντίδραση διχλωρίωσης με το σύστημα Oxone/ AlCl_3 . Στην συγκεκριμένη αντίδραση διχλωρίωσης χρησιμοποιήθηκαν 2.1 eq Oxone και 2.3 eq του αντιδραστήριου AlCl_3 . Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατικό περιβάλλον και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το προϊόν της αντίδρασης, 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3c**) χρειάστηκε καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας και τελικά απομονώθηκε με απόδοση 67%.

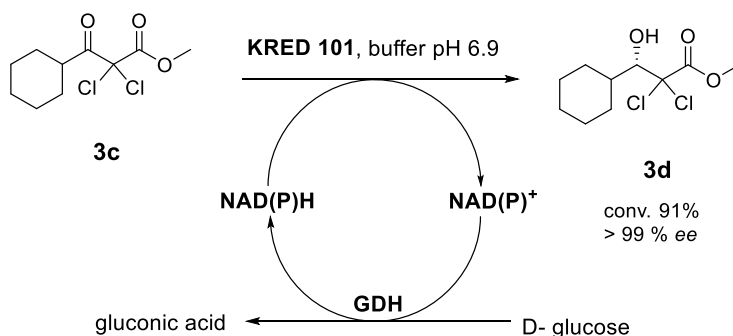


Σχήμα 14. Αντίδραση διχλωρίωσης του 3-κυκλοξέυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3b**) με σύστημα Oxone/ AlCl_3 προς τον σχηματισμό του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξέυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3c**).

Εφόσον συντέθηκε το υπόστρωμα 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξέυλο-3-οξοπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3c**) θα μελετηθεί στο μέρος αυτό η ενζυμική αναγωγή του με το ένζυμο Αλκοολικής Αφυδρογονάσης/Κετορεδουκτάσης. Η KRED 101 είναι το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την κατάλυση τη στερεοεκλεκτικής αναγωγής προς τον σχηματισμό του αντίστοιχου α,α-δίχλωρο-β-υδροξυ εστέρα, **3d**.



Για να πραγματοποιηθεί η ενζυμική αναγωγή επειδή η KRED είναι ένα NADPH εξαρτώμενο ένζυμο απαιτείται ένα σύστημα ανακύκλωσης του συμπαραγόνα για μείωση του κόστους και αύξηση της απόδοσης. Το σύστημα ανακύκλωσης το οποίο χρησιμοποιείται περιλαμβάνει το ένζυμο Αφυδρογονάση της Γλυκόζης (GDH) και την D-γλυκόζη ως συνυπόστρωμα. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος του ποσοστού μετατροπής με Αέρια Χρωματογραφία (GC) και βρέθηκε 91%. Ο έλεγχος της εναντιομερικής περίσσειας πραγματοποιήθηκε ξανά με αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιώντας χειρόμορφη κολώνα. Η εναντιοεκλεκτότητα της αντίδρασης ήταν εξαιρετική (>99% ee).



Σχήμα 15. Ενζυμική αναγωγή του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξέυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3c**) προς το 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξέυλο-3-υδροξυ-προπανοϊκό μεθυλεστέρα (**3d**) με την χρήση της KRED-101 και σύστημα ανακύκλωσης συμπαραγόνα NADPH: Αφυδρογονάση της Γλυκόζης(GDH)/D-γλυκόζη.

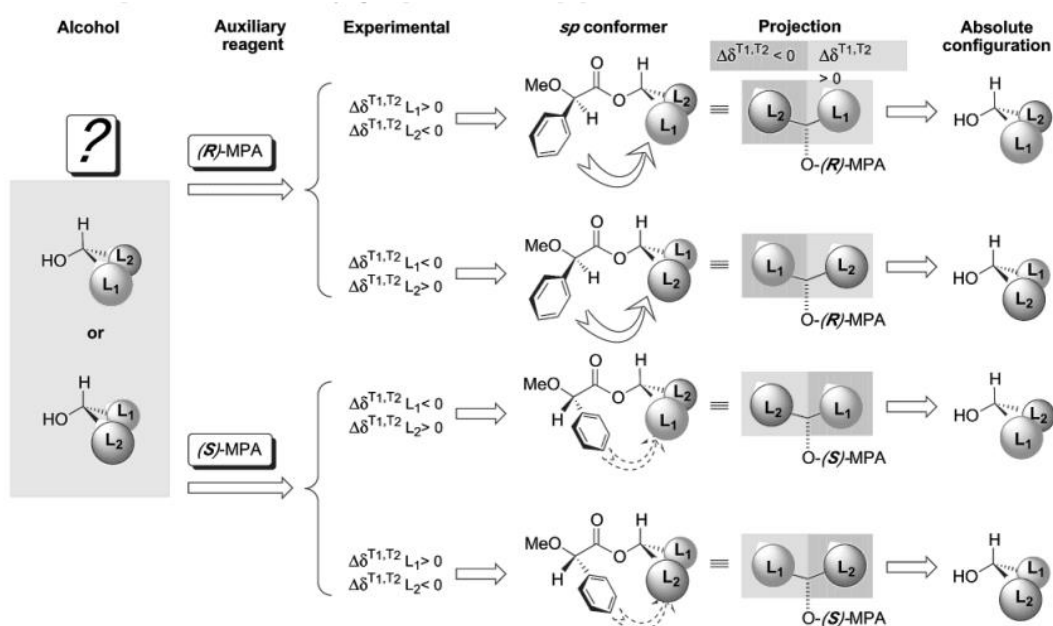
Οφείλουμε να επισημάνουμε ότι σε κάθε στάδιο της συνθετικής πορείας η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με την χρήση χρωματογραφίας λεπτής

στιβάδας (TLC) καθώς και ότι έγινε φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση όλων των υποστρωμάτων με ^1H NMR και σε σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα.²⁶

Η ένωση 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδροξυ-προπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3d**) η οποία συντέθηκε μετά από την στερεοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή μελετήθηκε ως προς την απόλυτη στερεοδομή.

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών βασίζεται στην αξιόπιστη μέθοδο του Mosher και της ομάδας του, όπου βασίζεται στην σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων στο φάσμα ^1H NMR των δύο διαστερομερών εστέρων οι οποίοι σχηματίζονται μετά από αντίδραση εστεροποίησης του υπό διερεύνησης υποστρώματος με τους οπτικά ενεργούς α-μεθόξυ-φαινυλοξικούς εστέρες, (*R*)-MPA και (*S*)-MPA.

Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι κατά την εστεροποίηση μίας δευτεροταγούς αλκοόλης με τα εναντιομερή (*R*)-MPA και (*S*)-MPA, η επικρατέστερή τους διαμόρφωση περιλαμβάνει το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και την μεθόξυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 16 αυτή η διαμόρφωση οδηγεί τους υποκαταστάτες L_1 και L_2 της αλκοόλης να έχουν απέναντί τους συγκεκριμένο υποκαταστάτη ανάλογα με το εναντιομερές του εστέρα. Ειδικότερα, ο υποκαταστάτης L_1 έχει απέναντί του το φαινύλιο στον (*R*)-MPA ενώ ο L_2 έχει απέναντί του το H της αλκοόλης. Αντίθετα στον (*S*)-MPA εστέρα ο L_1 υποκαταστάτης βρίσκεται απέναντί του το H της αλκοόλης και ο L_2 το φαινύλιο. Μία γενική αρχή της μεθόδου αναφέρει ότι οι ομάδες που είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα ^1H NMR λόγω της προστασίας που επιφέρει στον υποκαταστάτη. Οπότε ο L_1 στον (*R*)-MPA θα εμφανιστεί σε υψηλότερα πεδία δηλαδή σε χαμηλότερη χημική μετατόπιση (ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη χημική του μετατόπιση στον (*S*)-MPA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα ^1H NMR για την ομάδα L_1 μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι αρνητική ($\Delta\delta^{R-S} < 0$). Αντίθετα ο υποκαταστάτης L_2 έχει σαν αποτέλεσμα ότι η διαφορά στις μετατοπίσεις για την μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι θετική ($\Delta\delta^{R-S} > 0$).²⁷



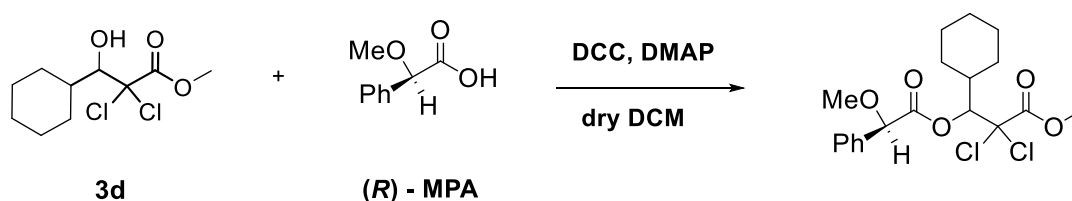
Σχήμα 16. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (R)-MPA και (S)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.²⁷

Λόγω των διαφοροποιήσεων αυτών στα φάσματα ^1H NMR των (R)-MPA και (S)-MPA εστέρων, σε κάθε περίπτωση είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των δευτεροταγών αλκοολών και στην συγκεκριμένη περίπτωση για την μελέτη α,α-δίχλωρο-β-υδρόξυ εστέρων όπως το υπόστρωμα 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3d**).

Αρχικά, η αντίδραση εστεροποίησης του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3d**) με τον (R)-MPA εστέρα χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί 3 φορές ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για ένα βέλτιστο αποτέλεσμα απόδοσης. Στην πρώτη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν 1.1 eq DCC και 1.1 eq (R)-MPA και καταλυτική ποσότητα DMAP σε διαλύτη dry DCM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 0 °C και αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά από έλεγχο στις 2 h με ^1H NMR βρέθηκε ότι η αντίδραση δεν προχώρησε. Στην δεύτερη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ισοδύναμα DCC, (R)-MPA και καταλυτική ποσότητα DMAP. Οι συνθήκες της αντίδρασης παρέμειναν στους 0 °C αρχικά και αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αντίδραση αφέθηκε για 48h και ελέγχθηκε με ^1H NMR. Η αντίδραση δεν ολοκληρώθηκε οπότε πραγματοποιήθηκε 3^η δοκιμή. Στην δοκιμή αυτή τα τελικά ισοδύναμα των αντιδραστηρίων αυξήθηκαν σε 1.6 eq για το DCC και 1.6 eq για το (R)-MPA και η θερμοκρασία της αντίδρασης αυξήθηκε στους 50 °C. Η θέρμανση ώθησε την αντίδραση να ολοκληρωθεί σε σύγκριση με τις προηγούμενες δοκιμές καθώς το υπόστρωμα είναι αρκετά παρεμποδισμένο επομένως απαιτεί αρκετή ενέργεια για να αντιδράσει. Η αντίδραση ελέγχθηκε με ^1H NMR και βρέθηκε ότι ολοκληρώθηκε με επιτυχία.

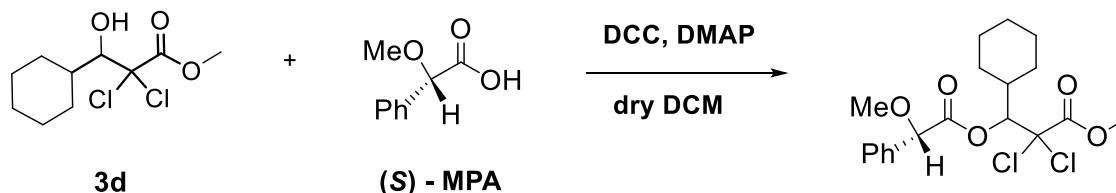
Πίνακας 2. Δοκιμές σε ισοδύναμα και συνθήκες στην αντίδρασης εστεροποίησης του **3d** με τον (*R*)-MPA.

entry	eq. (3d)	eq. DCC	eq. (<i>R</i>)-MPA	Συνθήκες
1	1	1.1	1.1	0 °C → RT 2 h
2	1	1.1	1.1	0 °C → RT 48 h
3	1	1.6	1.6	0 °C → 50 °C 2.5 h



Σχήμα 17. Αντίδραση εστεροποίησης του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3d**) με τον (*R*)-MPA εστέρα με χρήση DCC/DMAP.

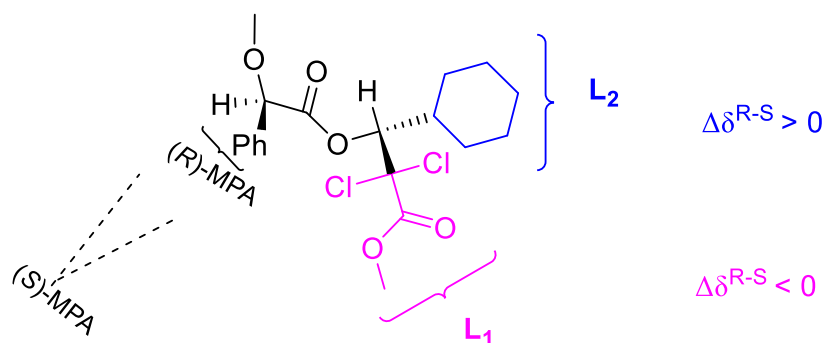
Στην συνέχεια το ίδιο υπόστρωμα, 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3d**) υπόκειται σε αντίδραση εστεροποίησης με τον (*S*)-MPA εστέρα. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση απαιτήθηκαν 1.7 eq DCC και 1.7 eq (*S*)-MPA σε dry DCM και καταλυτική ποσότητα DMAP. Οι συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτές της 3^{ης} δοκιμής δηλαδή αρχικά η θερμοκρασία ήταν στους 0°C και έπειτα θερμάνθηκε στους 50 °C και ολοκληρώθηκε σε 2.5h.



Σχήμα 18. Αντίδραση εστεροποίησης του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3d**) με τον (*S*)-MPA εστέρα με χρήση DCC/DMAP.

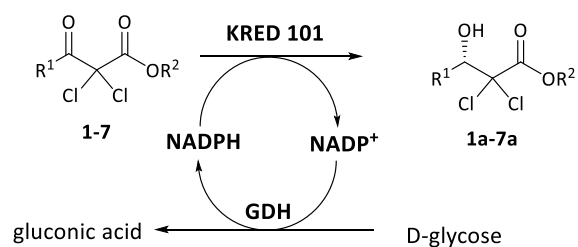
Έγινε λήψη των φασμάτων ¹H NMR και στις δύο εστεροποιημένες ενώσεις για να ερευνηθεί η απόλυτη στερεοδομή του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3d**) το οποίο έχει σχηματιστεί έπειτα από ενζυμική αναγωγή με KRED 101. Αρχικά, υποθέτουμε ότι η απόλυτη στερεοδομή του υποστρώματος **3d** είναι το (*R*) εναντιομερές της αλκοόλης. Ως L₁ υποκαταστάτη θεωρούμε την μεθύλυ ομάδα του εστέρα και το κυκλοέξυλο ως L₂ ομάδα. Σύμφωνα με την θεωρία πρέπει η διαφορά των μετατοπίσεων στα φάσματα ¹H NMR να είναι αρνητική, Δδ^{R-S} < 0 ως προς την ομάδα L₁. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο υποκαταστάτης L₁ βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με το φαινύλιο άρα μετατοπίζεται σε χαμηλότερες μετατοπίσεις. Από τα φάσματα ¹H NMR που φαίνονται στο αντίστοιχο Παράρτημα, βλέπουμε ότι η κορυφή η οποία αντιστοιχεί στον L₁ υποκαταστάτη για τον (*R*)-εστέρα εντοπίζεται στα 3.82 ppm ενώ στον (*S*)-εστέρα εμφανίζεται στα 3.46 ppm. Συμπερασματικά, η πειραματική διαφορά των μετατοπίσεων των κορυφών

βρίσκεται θετική, $\Delta\delta^{R-S} > 0$ σε αντίθεση με την θεωρία. Ακόμη, θεωρητικά για την ομάδα L_2 η διαφορά μετατοπίσεων πρέπει να είναι θετική, $\Delta\delta^{R-S} > 0$ λόγω ότι ο L_2 βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με το H στον (*R*)-εστέρα με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε υψηλότερες μετατοπίσεις από τον (*S*)-εστέρα. Οι πειραματικές κορυφές της ομάδας L_2 βρίσκονται σε εύρη 1.51-1.40 ppm και 1.81-1.60 ppm για τον (*R*)-εστέρα ενώ για τον (*S*)-εστέρα εμφανίζονται στα 1.82-1.60 ppm και 1.99-1.95 ppm. Οπότε η πειραματική διαφορά των μετατοπίσεων υπολογίζεται αρνητική, $\Delta\delta^{R-S} < 0$. Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε αντίθετα αποτελέσματα από την θεωρία και άρα συμπεραίνουμε ότι η υποθετική (*R*)-στερεοδομή της αλκοόλης που χρησιμοποιήσαμε είναι λανθασμένη. Καταλήγοντας τελικά ότι η απόλυτη στερεοδομή του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδροξυ-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3d**) μετά την ενζυμική αναγωγή με την KRED 101 είναι η αντίστροφη, δηλαδή (*S*).



1.2.2 Μελέτη εναντιοεκλεκτικής ενζυμικής αναγωγής α,α-δίχλωρο-β-κέτο εστέρων

Στη συνέχεια αυτού του κεφαλαίου της παρούσας Πτυχιακής εργασίας μελετάται η εναντιοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή υποστρωμάτων α,α-δίχλωρο-β-κέτο εστέρων σε μεγαλύτερη κλίμακα. Το υπόστρωμα προστίθεται στην αντίδραση σε ποσότητα τέσσερις φορές μεγαλύτερη, δηλαδή, σε 20 mg έναντι των 5 mg που έχουν μελετηθεί παραπάνω. Στις ενζυμικές αυτές αναγωγές χρησιμοποιήθηκε η Κετορεδοκτάση 101 με το γνωστό σύστημα ανακύκλωσης. Τα υποστρώματα **1-7** τα οποία μελετήθηκαν χρειάστηκαν 1-24 h για να ολοκληρωθεί η αντίδραση και οι αποδόσεις βρέθηκαν από 50-84%. Η εναντιοεκλεκτικότητα σε όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν $>99\%$ *ee* με το προϊόν να είναι το (*S*)-εναντιομερές των α,α-δίχλωρο-β-υδροξυ-εστέρων το οποίο επιβεβαιώθηκε με χειρόμορφη κολώνα GC.



1: R¹ = Et, R² = Me

2: R¹ = Pr, R² = Et

3: R¹ = Me, R² = Et

4: R¹ = Bu, R² = Me

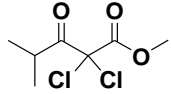
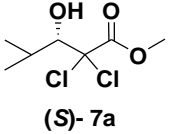
5: R¹ = propargyl, R² = Me

6: R¹ = cyclohexyl, R² = Me

7: R¹ = i-Pr, R² = Me

Πίνακας 3. Εναντιοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή α,α-διχλωρο-β-κέτο-εστέρων 1-7 με KRED 101.

Entry	Υπόστρωμα	Χρόνος αντίδρασης	Yield%	ee%	Προϊόν
1		1 h	75	>99	 (S)-1a
2		3 h	65	>99	 (S)-2a
3		1.5 h	69	>99	 (S)-3a
4		3 h	84	>99	 (S)-4a
5		5 h	50	>99	 (S)-5a
6		24 h	50	>99	 (S)-6a

7		5 h	60	>99	 (S)- 7a
---	---	-----	----	-----	--

Συμπερασματικά, παρουσιάστηκε μια αποτελεσματική χημειοενζυμική συνθετική πορεία για τον σχηματισμό του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοέξυλο-3-υδρόξυ-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3d**) με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα και σε αρκετά καλή απόδοση. Με την μέθοδο του Mosher βρέθηκε ότι η απόλυτη στερεοδομή του **3d** αντιστοιχεί στο (*S*)-εναντιομερές. Επίσης η ενζυμική αναγωγή επτά διαφορετικών α,α-δίχλωρο-κέτο εστέρων με την χρήση της NADPH εξαρτώμενης KRED 101 οδήγησε στο σχηματισμό των αντίστοιχων (*S*)-α,α-δίχλωρο-υδρόξυ εστέρων με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% *ee*) και αρκετά καλές αποδόσεις ακόμη και σε τέσσερις φορές μεγαλύτερη κλίμακα (υποστρώματα **1-7**).

1.3 Πειραματικό μέρος

1.3.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϊδοφουρανίο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϊδοφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό διχλωρομεθάνιο (DCM). Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.²⁸ Οι Κετορεδουκτάσες είναι της εταιρίας Biocatalytics, το συνένζυμο NADPH από την εταιρία Prozomix και η αφυδρογονάση της γλυκόζης της εταιρίας Johnson Matthey. Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες της εταιρίας Merck, Silica gel 60 F₂₅₄ και ως διαλύτης ανάπτυξης Hex:EtOAc σε αναλογία v/v, 4:1.

1.3.2 Όργανα

Τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR ελήφθησαν με τα φασματόμετρα 300MHz και 500MHz της Bruker. Οι χημικές μετατοπίσεις αντιστοιχούν σε ppm και σχετίζονται σύμφωνα με την κορυφή του διαλύτη (CDCl₃, δ: 7,26, ¹³CDCl₃, δ: 77,0). Η πρόοδος των χημικών αντιδράσεων ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας πλάκες silica gel (Merck grade 60 F₂₅₄) και σε αρκετές περιπτώσεις με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας (GC-MS) SHIMADZU GC-MS QP5050 εξοπλισμένο με Τριχοειδή στήλη Supelco (MDN-5 30nm x 0.25mm, πάχος φιλμ 0.25μm) και ανιχνευτή μάζας χημικού ιονισμού (5971A MS). Για την αέρια χρωματογραφία (GC) χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος SHIMADZU GC-2014 εξοπλισμένος με ανιχνευτή FID και μη πολική στήλη (HP-5 capillary, 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane) με σκοπό την παρακολούθηση των αντιδράσεων, ενώ για την εύρεση της εναντιοεκλεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε χειρόμορφη κολώνα (J&W CP-Chirasil-Dex CB (25 x 0.25 x 0.25 μm) συνολικού μήκους 25m.

1.3.3 Σύνθεση Υποστρωμάτων

Σύνθεση 3-κυκλοξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (3a) με αλδολική συμπύκνωση

Σε ατμόσφαιρα ξηρού αζώτου και διαλύτη ξηρό THF (20 ml) διαλύθηκε η δισοπρωπυλαμίνη (874 mg, 8.64 mmol, 1.2 ml) και αφού ψύχθηκε στους 0 °C σε παγόλουτρο για 10 min υπό ανάδευση, προστέθηκε στάγδην το n-BuLi (1.6 M, 6.5 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 min και στη συνέχεια ψύχθηκε ξανά με μείγμα ξηρού πάγου και ακετόνης στους -78 °C. Ακολούθησε η προσθήκη του οξικού μεθυλεστέρα **1** (400 mg, 5.4 mmol, 428 μl) σε ξηρό THF στάγδην

και με ανάδευση. Έπειτα προστίθεται η κυκλοεξυλομεθανόλη **2** (600 mg, 5.4 mmol, 654 μ l) στάγδην στο μείγμα της αντίδρασης υπό ανάδευση για 40min μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης η οποία ανιχνεύτηκε με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδος (TLC) και GC-MS.

Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη διαιθυλαιθέρα και εκχύλιση του υδατικού διαλύματος με κορεσμένο NH_4Cl . Ακολούθησε ξήρανση με MgSO_4 και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 90%.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): δ 3.78 (ddd, $J_1=9.6$ Hz, $J_2=6.3$ Hz, $J_3=2.8$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.52 (dd, $J_1=16.3$ Hz, $J_2=2.8$ Hz, 1H), 2.42 (dd, $J_1=16.3$ Hz, $J_2=9.6$ Hz, 1H), 1.87-1.84 (m, 1H), 1.77-1.73(m, 2H), 1.67-1.64(m, 2H), 1.41-1.34(m, 1H), 1.24-1.12 (m, 4H), 1.08-0.98 (m, 2H)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 173.9, 72.1, 51.7, 43.0, 38.3, 28.8, 28.2, 26.4, 26.1, 26.0.

Σύνθεση 3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (3b) με χημική οξείδωση

Σε φιάλη των 20ml με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύθηκε ο 3-κυκλοεξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3a**) (400 mg, 2.15 mmol) σε 2-3 ml ακετόνης και ψύχθηκε στους 0°C με την χρήση παγόλουτρου και αναδεύεται. Έπειτα έγινε η προσθήκη του αντιδραστήριου Jones (774 μ l) στάγδην με το διάλυμα αρχικά να χρωματίζεται καστανοκόκκινο και αφήνεται υπό ανάδευση για 40 min όπου το αντιδραστήριο Jones βρίσκεται σε περίσσεια. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί και ελέγχθηκε με TLC.

Για να σταματήσει η αντίδραση προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με $\text{pH}=8$ προκειμένου να εξουδετερωθεί η περίσσεια του αντιδραστήριου Jones. Έπειτα πραγματοποιούνται δύο εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα και συλλέχτηκε η οργανική φάση. Στην συνέχεια η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 και ακολούθησε διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 40:1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 43%.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): (keto:enol, 83:17) δ 12.05 (s.br, 1H_{enol}), 4.96 (s, 1H_{enol}), 3.73 (s, 3H_{keto}), 3.71 (s, 3H_{enol}), 3.49 (s, 2H_{keto}), 2.47-2.42 (m, $1\text{H}_{\text{keto-enol}}$), 1.89-1.86 (m, $2\text{H}_{\text{keto-enol}}$), 1.80-1.77 (m, $2\text{H}_{\text{keto-enol}}$), 1.68-1.65 (m, $1\text{H}_{\text{keto-enol}}$), 1.38-1.17 (m, $5\text{H}_{\text{keto-enol}}$).

^{13}C NMR (500MHz, CDCl_3): δ 205.7, 167.9, 86.6, 52.3, 51.0, 47.0, 43.5, 29.9, 28.1, 25.8, 25.7, 25.4.

Σύνθεση 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (3c) παρουσία συστήματος Oxone/ AlCl_3

Σε σφαιρική φιάλη των 20 ml με μαγνητικό αναδευτήρα προστέθηκε ποσότητα του 3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**3b**) (140 mg, 0.76 mmol) και στην συνέχεια 19 ml απιονισμένου H_2O . Στην συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Oxone (982 mg, 1.596 mmol) και έπειτα το AlCl_3 (233 mg, 1.748 mmol) σταδιακά διότι εκλύεται αέριο HCl . Η αντίδραση πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος και ελέγχθηκε με TLC. Ολοκληρώθηκε μετά από 3 h.

Για να ολοκληρωθεί η αντίδραση προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα Rochelle 0.2 ml για την διάλυση των αλάτων αλουμινίου. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν 3 εκχυλίσεις με Et₂O, το διφασικό μείγμα ανακινήθηκε και συλλέχτηκε η οργανική φάση. Στην συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης ξηραίνεται με MgSO₄ και ακολουθείται απλή διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος πραγματοποιείται Χρωματογραφία στήλης (Hex: EtOAc, v/v, 42:1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 67%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.91 (s, 3H), 3.0 (tt, *J*₁ = 11.5 Hz, *J*₂ = 3.4 Hz, 1H), 1.94-1.91 (m, 2H), 1.72-1.69 (m, 1H), 1.57-1.49 (m, 2H), 1.36-1.22 (m, 3H).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 196.9, 164.1, 81.9, 54.8, 45.6, 30.8, 25.4.

Ενζυμική Αναγωγή του 2,2-δίχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (3c)

Σε 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 6.9) και 20 μl DMSO προστέθηκαν 5 mg του υποστρώματος, 18-24 mg D-γλυκόζης, 2 mg NADPH, 2 mg της Κετορεδουκτάσης KRED 101 και τέλος 2 mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH). Το μίγμα αναδεύτηκε σε 37 °C για 24 h. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχυλίσεις του μίγματος με EtOAc (2x1.5 mL) και βρέθηκε η απόδοση 91%.

Εύρεση στερεοδομής 2,2-διχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (3d) με εστεροποίηση μέσω R-MPA εστέρα

Σε φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα, 2,2-διχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (3d) (9 mg, 0.035 mmol) προστέθηκε διαλύτης ξηρό DCM περίπου 4 ml. Έπειτα προστέθηκε το αντιδραστήριο DCC (8mg, 0.039 mmol) και ο R-MPA (7 mg, 0.039 mmol) και ψύχεται με παγόλουτρο στους 0 °C. Στην συνέχεια προστέθηκε DMAP σε καταλυτική ποσότητα. Το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση μέχρι να θολώσει. Μετά από ανάδευση 20 min το μείγμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο με θέρμανση στους 50 °C και αφέθηκε για 24 h. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θέρμανση απαιτείται για να βοηθήσει την αντίδραση λόγω μεγάλης παρεμπόδισης. Μετά το πέρας των 24 h έγινε προσθήκη επιπλέον ποσότητας DCC 4 mg, R-MPA 3 mg και καταλυτικής ποσότητας DMAP. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται για 2.5 h μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC.

Για την απομόνωση του τελικού προϊόντος το μείγμα της αντίδρασης υπόκειται σε διήθηση υπό κενό και έπειτα πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με διαλύτη CH₂Cl₂. Η απομάκρυνση του διαλύτη έγινε σε συνθήκες ελαττωμένης πίεσης. Ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 50:1).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.48-7.45 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 3H), 5.45 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.84 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 1.81-1.60 (m, 5H), 1.51-1.40 (m, 4H), 1.14-1.06 (m, 2H).

Εύρεση στερεοδομής 2,2-διχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (3d) με εστεροποίηση μέσω S-MPA εστέρα

Σε φιαλίδιο στο οποίο βρίσκεται το υπόστρωμα, 2,2-διχλωρο-3-κυκλοξυλο-3-υδροξυπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (**3d**) (9 mg, 0.035 mmol) προστέθηκε διαλύτης ξηρό DCM περίπου 4 ml. Το μείγμα της αντίδρασης στην συνέχεια ψύχθηκε στους 0 °C με χρήση παγόλουτρου. Έπειτα προστέθηκε το αντιδραστήριο DCC (12 mg, 0.060 mmol) και ο *S*-MPA (10 mg, 0.060 mmol) και ψύχεται με παγόλουτρο στους 0 °C. Στην συνέχεια προστέθηκε DMAP σε καταλυτική ποσότητα. Το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση μέχρι να θολώσει. Μετά το πέρας 1.5 h το μείγμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο με θέρμανση στους 50 °C. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θέρμανση απαιτείται για να βοηθήσει την αντίδραση λόγω μεγάλης παρεμπόδισης. Μετά από 1.5 h έγινε προσθήκη επιπλέον ποσότητας DCC 4 mg, *S*-MPA 3 mg και καταλυτικής ποσότητας DMAP. Το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 2.5h μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC.

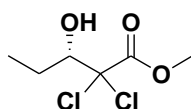
Για την απομόνωση του τελικού προϊόντος το μείγμα της αντίδρασης υπόκειται σε διήθηση υπό κενό και έπειτα πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με διαλύτη CH₂Cl₂. Η απομάκρυνση του διαλύτη έγινε σε συνθήκες ελαττωμένης πίεσης. Έπειτα για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 50:1).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.48-7.45 (m, 2H), 7.37-7.30 (m, 3H), 5.41 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.81 (s, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 1.99-1.95 (m, 1H), 1.82-1.60 (m, 10H).

Γενικό πειραματικό ενζυμικής αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας

Σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 6.9) και 920 μl DMSO προστέθηκαν 5 mg του υποστρώματος, 88 mg D-γλυκόζης, 8mg της Κετορεδοκτάσης KRED 101, 4 mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) και τέλος 8 mg NADPH. Το μίγμα αναδεύτηκε σε 37 °C για 1-5 h ανάλογα με το υπόστρωμα. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχυλίσεις του μίγματος με EtOAc (3x1.5 mL). Ακολούθησε χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος (Hex/EtOAc, v/v, 25:1).

(*S*)-2,2-διχλωρο-3-υδροξυπεντανοϊκός μεθυλεστέρας (**1a**)

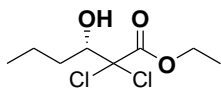


Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**1**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**1a** μέσα σε 1h, >99% *ee* και απόδοση 75%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.12 (dd, *J*₁ = 10.0 Hz, *J*₂ = 2.1 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 1.98-1.90 (m, 1H), 1.66-1.56 (m, 1H), 1.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 166.4, 86.7, 78.8, 54.5, 24.2, 10.4.

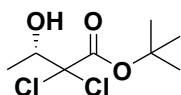
(*S*)-2,2-διχλωρο-3-υδροξυεξανοϊκός αιθυλεστέρας (**2a**)



Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-3-οξοεξανοϊκού αιθυλεστέρα (**2**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**2a** μέσα σε 3h, >99% *ee* και απόδοση 65%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.36 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.23-4.21 (m, 1H), 2.51 (s.br, 1H), 1.86-1.79 (m, 1H), 1.72-1.57 (m, 2H), 1.52-1.44 (m, 1H), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 165.9, 87, 77.1, 64, 33.1, 19.1, 13.8 (2C).
(*S*)-**2,2-διχλωρο-3-υδροξυβουτανοϊκός τετρ-βουτυλεστέρας (3a)**

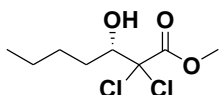


Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-3-οξοβουτανοϊκού τετρ-βουτυλεστέρα (**3**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**3a** μέσα σε 1.5h, >99% *ee* και απόδοση 69%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.41 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H), 1.54 (s, 9H), 1.43 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 164.6, 87.9, 85.3, 73.5, 27.6, 17.2.

(*S*)-**2,2-διχλωρο-3-υδροξυεπτανοϊκός μεθυλεστέρας (4a)**

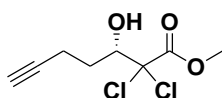


Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-3-οξοεπτανοϊκού μεθυλεστέρα (**4**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**4a** μέσα σε 3h, >99% *ee* και απόδοση 84%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.22-4.19 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.49 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.46-1.32 (m, 3H), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 166.4, 86.8, 77.3, 54.5, 30.7, 27.9, 22.4, 13.9.

(*S*)-**2,2-διχλωρο-3-υδροξυεπτ-6-υνοϊκός μεθυλεστέρας (5a)**

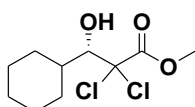


Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-3-οξοεπτ-6-υνοϊκού μεθυλεστέρα (**5**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**5a** μέσα σε 5h, >99% *ee* και απόδοση 50%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.42 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.8 (s.br, 1H), 2.51-2.39 (m, 2H), 2.16-2.09 (m, 1H), 2.01 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.90-1.83 (m, 1H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 166.3, 85.9, 83.0, 75.9, 69.4, 54.6, 29.8, 15.0.

(S)-2,2-διχλωρο-3-κυκλοεξυλ-3-υδροξυπροπανοϊκός μεθυλεστέρας (6a)

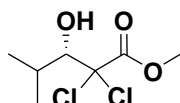


Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-3-κυκλοεξυλο-3-οξοπροπανοϊκού μεθυλεστέρα (**6**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**6a** μέσα σε 24h, >99% *ee* και απόδοση 50%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.04 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 2.04-2.01 (m, 1H), 1.87-1.65 (m, 6H), 1.23-1.11 (m, 3H)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 166.4, 87.5, 80.6, 54.4, 40.5, 31.3, 28.1, 26.3, 26.04, 25.9.

(S)-2,2-διχλωρο-3-υδροξυ-4-μεθυλοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας (7a)



Η ενζυμική αναγωγή του 2,2-διχλωρο-4-μεθυλ-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**7**) πραγματοποιήθηκε με βάση το γενικό πειραματικό αναγωγής μεγαλύτερης κλίμακας με την χρήση KRED 101 σχηματίζοντας το (*S*)-**7a** μέσα σε 24h, >99% *ee* και απόδοση 60%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.07 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.22-2.13 (m, 1H), 1.08 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.05 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 166.5, 87.3, 80.8, 54.5, 30.6, 21.3, 17.2.

1.4 Βιβλιογραφία

1. Faber K., BIOTRANSFORMATIONS IN ORGANIC CHEMISTRY A TEXTBOOK, **2011** Springer.
2. Kampourakis S., Smonou I., Kalaitzakis D., *Org. Lett.* **2005**, 7, 22, 4799-4801.
3. ΚΛΩΝΗΣ Ι., ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, **2020**, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
4. Kambourakis S., Rozzell J. D., Kaluzna I. A., *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3682-3689.
5. Prelog, V. *Appl. Chem.*, **1964**, 9: 119.
6. Hall, M., Bommarius, A.S., *Chem. Rev.* **2011**, 111, 4088-4110.
7. Li Z., Yang H., Liu J., Huang Z., Chen F., *Chem. Rec.* 2021, 21, 1611-1630.
8. D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, I. Smonou, S. Kambourakis *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1958–1969.
9. Bariotaki, A., Kalaitzakis, D., Smonou, I., *Org. Lett.*, **2012**, 14 (7), 1792–1795.
10. a) Kalaitzakis, D., Rozzel, J. D., Kampourakis, S., Smonou, I., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 2309–2313.
b) Kalaitzakis, D., Rozzel, J. D., Kampourakis, S., Smonou, I., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 2418–2426.
11. Kallergi M., Kalaitzakis, D., Smonou, I., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3946–3950.
12. Kalaitzaki D., Smonou, I., *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 43-46.
13. Giannopoulos V., Tyrikos-Ergas T., Myrtollari K., Smonou I., *Molecular Catalysis*, 490, **2020** 110952.
14. Fang, W. Y ,Ravindar, L. Rakesh, K. P., Manukumar, H. M.; Shantharam, C. S., Alharbi N. S., Qin, H. L., *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, 173, 117.
15. Sanchez D.S., Baeza A., Alonso D.A., *Symmetry*, **2016**, 8, 3
16. Giannopoulos V., Katsoulakis N., Smonou I., *Synthesis*, **2022**, 54, 2457-2463
17. Leonardo S. de Almeida, Pierre M. Esteves, Marcio C.S. de Mattos, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 25, 3001-3004.
18. Liu, W.; Tan, L.; Zhou, P.; Chen, C.; Zhang, Q, *Synthesis*, **2013**, 45, 2600.
19. Kim, J.-J.; Kweon, D.-H.; Cho, S.-D.; Kim, H.-K.; Lee, S.-G.; Yoon, Y. -J. *Synlett* **2006**, 194.
20. Duan, X.; Zhou, H.; Tian, X.; Liu, J.; Ma, J. *Synthesis*, **2015**, 47, 777.
21. Pu, X.; Li, Q; Lu, Z.; Yang, X. *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 5937.
22. Hussain, H., Green, I. R., Ahmed, I. *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 3329.
23. Alvi S., Jayant V., Ali R., *ChemistrySelect*, **2022**, 7, 23.
24. Zheng L.S., Phansavath P., Ratovelomanana-Vidal V., *Org. Lett.*, **2018**, 20, 5107-5111.
25. Giannopoulos V., Smonou I., *Eur.J. Org.Chem.*, **2022**, 27.
26. Ludeke, S., Richter, M., Müller M., *Adv. Synth. Catal.*, **2009**, 351, 253 – 259.
27. Seco J. M., Riguera R., Quinoa E., *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 17–117
28. Blanchard, J.S., *Methods in Enzymol.*, **1984**, 104, 404.

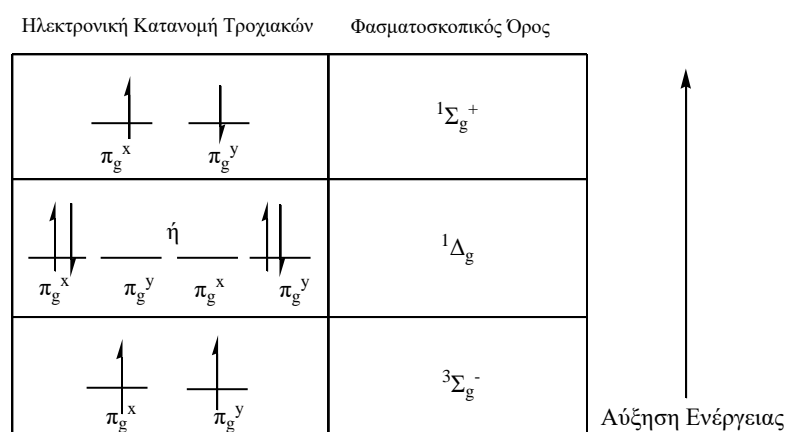
Κεφάλαιο 2

2.1 Εισαγωγή

2.1.1 Φωτοοξειδώσεις και Χρήση του Singlet Oxygen ($^1\text{O}_2$)

Σημαντική εφαρμογή του μοριακού οξυγόνου (O_2) στην Οργανική Σύνθεση είναι ότι παρουσία ορατού φωτός μπορούν να σχηματιστούν οξυγονωμένα παράγωγα οργανικών ενώσεων τα οποία αποτελούν είτε φυσικά προϊόντα είτε και ενδιάμεσα φαρμάκων. Ένας τρόπος αξιοποίησης ενέργειας ο οποίος μελετήθηκε αρκετά τα προηγούμενα χρόνια ήταν με την χρήση φωτοευαισθητοποιητών (photosensitizers). Οι ενώσεις αυτές, όπως οι πορφυρίνες, οι χλωροφύλλες και άλλες ενώσεις με εκτεταμένο π-συζυγιακό σύστημα, έχουν την ικανότητα να απορροφούν το ορατό/υπεριώδες μεταβιβάζοντας αυτή την ενέργεια στο οξυγόνο ή και στο υπόστρωμα οδηγώντας τελικά σε μία αντίδραση οξείδωσης.

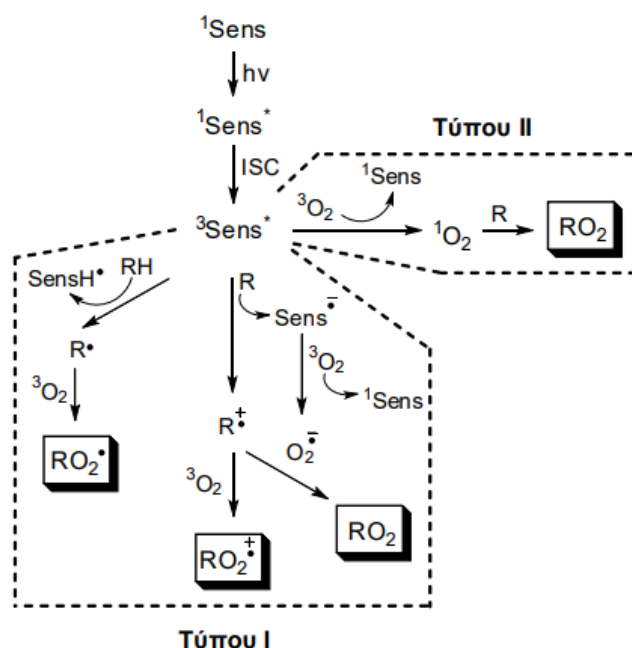
Οι ιδιότητες του μοριακού οξυγόνου προκύπτουν από την μοναδικότητα της ηλεκτρονικής του δομής. Μία από αυτές είναι ότι έχει τριπλή βασική κατάσταση ($X^3\Sigma_g^-$) με δύο ηλεκτρόνια σθένους με παράλληλα σπιν τα οποία του προσδίδουν παραμαγνητική φύση. Η απλή διεγερμένη κατάσταση, $^1\Delta_g$ περιέχει δύο μονήρη ηλεκτρόνια σε ένα τροχιακό ενώ στην μεγαλύτερη ενεργειακά διεγερμένη κατάσταση $^1\Sigma_g^+$, τα δύο μονήρη ηλεκτρόνια βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά με αντιπαράλληλο σπιν (Σχήμα 1). Στην χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, $^3\Sigma_g^-$ το μοριακό οξυγόνο συμπεριφέρεται στις χημικές αντιδράσεις ως ρίζα, στην δεύτερη διεγερμένη μονή κατάσταση, $^1\Sigma_g^+$ δεν έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια σε υγρή φάση ενώ στην μικρότερης ενέργειας διεγερμένη απλή κατάσταση, $^1\Delta_g$ χαρακτηρίζεται ως singlet oxygen και παρουσιάζει πλούσια χημική συμπεριφορά καθώς αποτελεί το δραστικό ενδιάμεσο στις αντιδράσεις φωτοοξείδωσης.¹



Σχήμα 1. Διάγραμμα κατανομής ηλεκτρονίων στα τροχιακά του μοριακού οξυγόνου και Φασματοσκοπικοί Όροι.

Ο σχηματισμός του οξυγόνου απλής κατάστασης, $^1\text{O}_2$ μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω χημικών είτε φωτοχημικών διεργασιών. Υπάρχουν δύο μηχανισμοί φωτοοξειδώσεων οι οποίοι έχουν κατηγοριοποιηθεί από τον Gollnick ως Τύπου I και Τύπου II. Ο μηχανισμός Τύπου I περιλαμβάνει την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου του υποστρώματος, RH από τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή ($^3\text{Sens}^*$). Μετέπειτα το

οξυγόνο βασικής κατάστασης, $^3\text{O}_2$ προσβάλλει το ριζικό ενδιάμεσο του υποστρώματος R· σχηματίζοντας τα οξυγονωμένα προϊόντα. Άλλος ένας μηχανισμός ο οποίος παρατηρήθηκε για τον Τύπο I είναι η μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή και του υποστρώματος σχηματίζοντας την κατιοντική ρίζα, R^+ . Στον μηχανισμό Τύπου II η ενέργεια του τριπλής κατάστασης φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρεται στο $^3\text{O}_2$ σχηματίζοντας το $^1\text{O}_2$ το οποίο στην συνέχεια έχει την δυνατότητα να αντιδράσει με το υπόστρωμα σχηματίζοντας τα οξυγονωμένα προϊόντα. Για να ευνοηθεί η αντίδραση φωτοοξειδωσις Τύπου I πρέπει το υπόστρωμα να οξειδώνεται εύκολα και ο φωτοευαισθητοποιητής να ανάγεται δύσκολα. Ο μηχανισμός Τύπου II ευνοείται στις αντίθετες συνθήκες.²



Σχήμα 2. Μηχανισμοί Φωτοευαισθητοποιούμενων οξειδώσεων.²

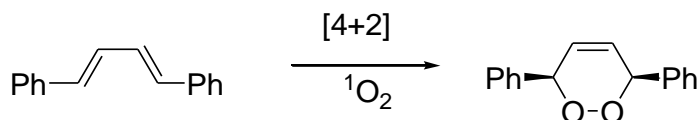
2.1.2 Αντιδράσεις μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$)

Γενικότερα, το μοριακό οξυγόνο απλής κατάστασης (Singlet Oxygen) αποτελεί ένα ισχυρό οξειδωτικό το οποίο έχει την ικανότητα να αντιδρά με υψηλή τοπο- και στερεο-εκλεκτικότητα. Η ικανότητά του αυτή το καθιστά ένα σημαντικό ενδιάμεσο για τον τομέα της Οργανικής Σύνθεσης.³

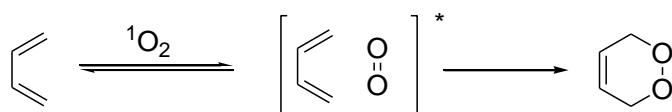
Οι κατηγορίες αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει το οξυγόνο απλής κατάστασης, $^1\text{O}_2$ με υποστρώματα $\text{C}=\text{C}$ είναι τρεις: (i) Αντίδραση κυκλοπροσθήκης [4+2] σε διένια και ανθρακένια, (ii) Αντίδραση κυκλοπροσθήκης [2+2] σε ενολικούς εστέρες και αλκένια (χωρίς αλλυλικά υδρογόνα) και (iii) Αντίδραση Ενίου.

Αρχικά, η αντίδραση [4+2] κυκλοπροσθήκης χρησιμοποιείται για την σύνθεση πολλών φυσικών ή μη προϊόντων από υποστρώματα διενίων και ανθρακενίων. Το $^1\text{O}_2$ έχει τον ρόλο ενός διενόφιλου σχηματίζοντας ενδοϋπεροξειδία ως τελικά προϊόντα αποτελώντας μία αντίδραση ανάλογη της Diels-Alder. Ένας σύγχρονος μηχανισμός ο οποίος προτάθηκε για αυτήν την αντίδραση περιλαμβάνει έναν αντιστρεπτό μηχανισμό με σχηματισμό ενός ενεργοποιημένου ενδιαμέσου. Το ενεργοποιημένο αυτό ενδιάμεσο

μπορεί να είναι είτε κάποιο δίπολο είτε κάποιο δίριζο ενδιάμεσο.⁴ Ο μηχανισμός της αντίδρασης εξαρτάται από το είδος του υποστρώματος αλλά και τις συνθήκες της αντίδρασης (πχ διαλύτης). Η σχηματισμός ενδοϋπεροξειδίων αποτελεί μία υψηλού ενδιαφέροντος σύνθεση για ενώσεις με βιολογική δραστικότητα όπως αυτή των Προσταγλανδινών.^{3,5}

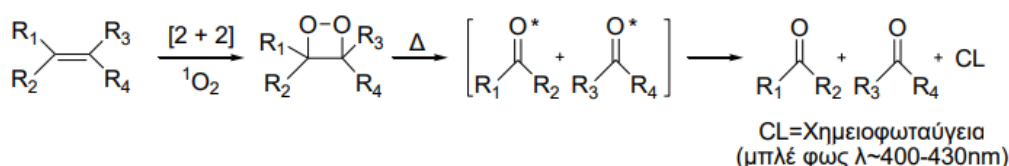


Σχήμα 3. Παράδειγμα αντίδρασης [4+2] κυκλοπροσθήκης του $^1\text{O}_2$ σε 1,4 διφαινυλο-1,3 βουταδιένιο.³



Σχήμα 4. Αντιστρεπτός μηχανισμός [4+2] κυκλοπροσθήκης του $^1\text{O}_2$.

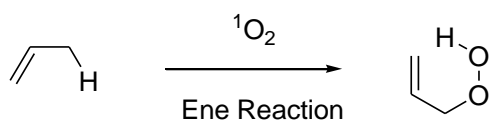
Η αντίδραση [2+2] κυκλοπροσθήκης του $^1\text{O}_2$ σε διπλό δεσμό C-C αποτελεί επίσης μία χρήσιμη αντίδραση για την Οργανική Σύνθεση. Το 1970 έγινε πρώτη φορά η σύνθεση 1,2 διοξετανών με φωτοχημική διεργασία. Η σύνθεσή τους περιλάμβανε την χρήση είτε ηλεκτρονικά πλούσιων ολεφινών είτε ολεφινών όπου τα αλλυλικά τους υδρογόνα δεν αποσπώνται εύκολα. Οι ενώσεις αυτές όταν αποσυντεθούν θερμικά παράγουν τριπλές διεγερμένες καταστάσεις καρβονυλικών ενώσεων με εκπομπή φωτός (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Φωτοχημική σύνθεση 1,2- διοξετανών και θερμική τους αποσύνθεση.³

Σε αντίθεση με την [4+2] κυκλοπροσθήκη, ο μηχανισμός της [2+2] κυκλοπροσθήκης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ενώ διάφορα ενδιάμεσα και μεταβατικές καταστάσεις έχουν προταθεί. Ο ακριβής μηχανισμός εξαρτάται από το εκάστοτε υπόστρωμα και την πολικότητα του διαλύτη.³

Η αντίδραση ενίου (Ene reaction) αποτελεί μία πολύ μελετημένη αντίδραση του $^1\text{O}_2$ εξαιτίας των πολυάριθμων συνθετικών εφαρμογών του. Αρχικά, αποτελεί έναν από τους ευκολότερους τρόπους παραγωγής αλλυλικών υπεροξειδίων από ακόρεστους υδρογονάνθρακες σχηματίζοντας πολλά φυσικά και μη φυσικά προϊόντα μέσω αλλυλικής οξείδωσης. Έπειτα από πολύχρονες μελέτες βγήκε το συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης του ενίου είναι αντιστρεπτός με σχηματισμό ενός ενδιάμεσου προϊόντος, ενός υπερεποξειδίου. Ο μηχανισμός αυτού του τύπου παρουσιάζει τοποεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα ανάλογα με το είδος του υποστρώματος, το οποίο επηρεάζει το σχηματισμό του ενδιαμέσου. Στερεοχημικοί και ηλεκτρονικοί παράγοντες μπορούν τελικά να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την εκλεκτικότητα της αντίδρασης.³



Σχήμα 6. Παράδειγμα αντίδρασης ενίου του $^1\text{O}_2$ στο υπόστρωμα 1-προπενίου.

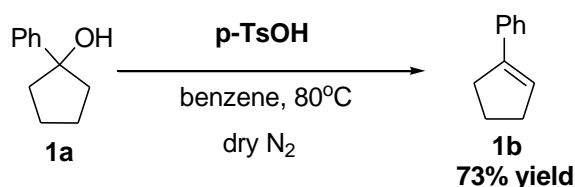
2.2.3 Σκοπός

Το συγκεκριμένο κεφαλαίο εστιάζει στην σύνθεση του υποστρώματος φαίνυλο κυκλοπεντενίου και την μελέτη της φωτοοξειδωσης του με την χρήση μοριακού οξυγόνου απλής κατάστασης, $^1\text{O}_2$ και εν συνεχεία στη μελέτη της φωτοοξειδωσης της παραγόμενης αλλυλικής αλκοόλης με υδατοδιαλυτή ανθρακινόνη ως φωτοκαταλύτη. Στόχος είναι η ανάπτυξη μίας συνθετικής πορείας η οποία να περιλαμβάνει τον συνδυασμό Βιοκατάλυσης και Φωτοκατάλυσης ως διαδοχικές αντιδράσεις για τη σύνθεση οργανικών μορίων. Οι αντιδράσεις αυτές υπόκεινται στις Αρχές της Πράσινης Χημείας έχοντας πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με άλλες μεθόδους.

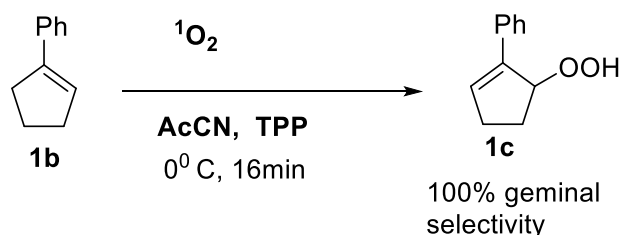
2.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Το δεύτερο Κεφάλαιο της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας αποσκοπεί στην σύνθεση του υποστρώματος φαίνυλο κυκλοπεντενίου (**1b**) και την μελέτη της φωτοοξειδωσής του με την χρήση του μοριακού οξυγόνου μονής κατάστασης, $^1\text{O}_2$. Στη συνέχεια μελετήθηκε περαιτέρω η αντίδραση φωτοοξειδωσης του αρχικού προϊόντος με την χρήση σουλφονικής ανθρακινόνης (SAS), ενός υδατοδιαλυτού φωτοκαταλύτη.

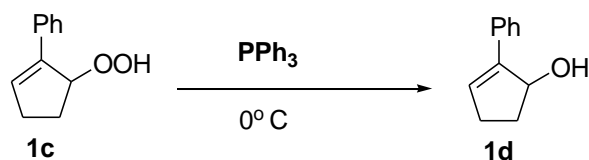
Αρχικά, για την σύνθεση του επιθυμητού υποστρώματος, φαίνυλο κυκλοπεντενίου (**1b**) χρησιμοποιήθηκε η 1-φαίνυλο-κυκλοπεντανόλη (**1a**) η οποία είχε συντεθεί μέσω αντίδρασης Grignard μεταξύ της κυκλοπεντανόνης και του βρωμιούχου φαινυλομαγνησίου. Η 1-φαίνυλο-κυκλοπεντανόλη (**1a**) είχε παρασκευαστεί παλαιότερα στο εργαστήριο και είχε αποθηκευτεί για μελλοντική χρήση. Για την σύνθεση του επιθυμητού υποστρώματος η 1-φαίνυλο-κυκλοπεντανόλη (**1a**) αφυδατώθηκε με χρήση του αντιδραστήριου *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) και διαλύτη βενζόλιο σε ατμόσφαιρα ξηρού αζώτου με ικανοποιητική απόδοση 73%.



Έπειτα το υπόστρωμα φαίνυλο κυκλοπεντένιο (**1b**) υπόκειται σε αντίδραση φωτοοξειδωσης με μοριακό οξυγόνο, $^1\text{O}_2$ και φωτοευαισθητοποιητή την τετρά-φαίνυλο-πορφυρίνη (TPP). Η αντίδραση αυτή ολοκληρώθηκε με επιτυχία δίνοντας το προϊόν, 1-(5-υδροϋπεροξοκυκλοπεντ-1-ένυλο)βενζόλιο (**1c**) με υψηλή εκλεκτικότητα. Η αντίδραση αυτή του $^1\text{O}_2$ σε υποστρώματα αλκενίων με άλκυλο ομάδα μεγάλου μεγέθους σε αλληλική θέση παρουσιάζει το φαινόμενο της γειτονικής εκλεκτικότητας (geminal selectivity). Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στη προτίμηση απόσπασσης του H από την ομάδα η οποία βρίσκεται σε γειτονική θέση του άρυλο υποκαταστάτη κατευθύνοντας την αντίδραση τοποεκλεκτικά λόγω είτε στερικών είτε ηλεκτρονικών παραγόντων.⁶

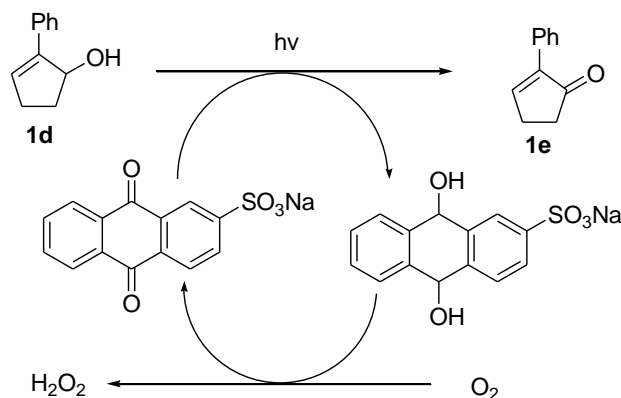


Στην συνέχεια το προϊόν της φωτοοξειδωσης, 1-(5-υδροϋπεροξοκυκλοπεντ-1-ένυλο)βενζόλιο (**1c**) ανάγεται με την χρήση τριφαίνυλοφωσφίνης (PPh₃) προς το σχηματισμό της 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόλης (**1d**) σε θερμοκρασία 0 °C (εξώθερμη αντίδραση). Η απόδοση της αντίδρασης βρέθηκε περίπου 70%.



Η ομάδα των Hollmann και Arends μελέτησε την αντίδραση φωτοοξείδωσης σε υποστρώματα αλκοολών και αλκενίων με την εμπορικά διαθέσιμη σουλφονική ανθρακινόνη νατρίου (SAS) με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Εκμεταλλευόμενοι τις μοναδικές ιδιότητες της ανθρακινόνης και της υδατοδιαλυτής της φύσης κατάφεραν να οξειδώσουν εκλεκτικά υποστρώματα αλκοολών χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο. Αυτή η οργανοκαταλυτική μέθοδος δίνει την δυνατότητα μίας εναλλακτικής πορείας οξείδωσης φιλικότερης προς το περιβάλλον.⁷

Έτσι, μελετήθηκε η φωτοοξείδωση της αλλυλικής αλκοόλης 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόλη (**1d**), η οποία σχηματίστηκε μετά την αρχική φωτοοξείδωση και αναγωγή του υπεροξειδίου, με έναν υδατοδιαλυτό φωτοκαταλύτη, την σουλφονική ανθρακινόνη νατρίου (SAS). Για την αντίδραση αυτή ακολουθήθηκαν οι προτεινόμενες συνθήκες της συγκεκριμένης δημοσιευμένης μελέτης: διαλύτης νερό, ατμόσφαιρα κορεσμένου οξυγόνου, λευκό φως από λάμπα Ξένου (300 W, $\lambda > 300$ nm) και η θερμοκρασία να μην ξεπερνά τους 30 °C. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 40 min αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά καθώς έπειτα από έλεγχο με GC βρέθηκαν πολλές κορυφές οι οποίες δεν αντιστοιχούν στο επιθυμητό προϊόν, 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόνη (**1e**).



Σχήμα 7. Αντίδραση φωτοοξείδωσης του 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόλη (**1d**) προς 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόνη (**1e**) με την χρήση σουλφονική ανθρακινόνη νατρίου (SAS) ως φωτοκαταλύτη.

2.3 Πειραματικό Μέρος

2.3.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες της εταιρίας Merck, Silica gel 60 F₂₅₄ και ως διαλύτης ανάπτυξης Hex:EtOAc σε αναλογία v/v, 4:1.

2.3.2 Όργανα

Τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR ελήφθησαν με τα φασματόμετρα 300MHz και 500Hz της Bruker. Οι χημικές μετατοπίσεις αντιστοιχούν σε ppm και σχετίζονται σύμφωνα με την κορυφή του διαλύτη (CDCl₃, δ: 7,26, ¹³CDCl₃, δ: 77,0). Τα φάσματα GC πάρθηκαν με αέριο χρωματογράφο της εταιρίας Shimadzu 2014 εξοπλισμένο με ανιχνευτή FID και μη πολική στήλη (HP-5 capillary, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane). Οι αντιδράσεις φωτοξείδωσης πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή η οποία περιλάμβανε λάμπα Ξένου (300 W, λ>300 nm) και κορεσμένη ατμόσφαιρα O₂.

2.3.3 Πειραματική διαδικασία

Σύνθεση 1-κυκλοπεντυλοβενζολίου (1b) με αντίδραση αφυδάτωσης

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα υπό συνθήκες ξηρούN₂ προστίθεται η 1-φαινυλοκυκλοπεντανόλη (1a) (13.8 mg, 0.85 mmol) διαλυμένη σε 3-4 ml διαλύτη βενζολίου. Έπειτα προστίθεται επιπλέον ποσότητα 6-7 ml του διαλύτη βενζολίου και καταλυτική ποσότητα του p-TsOH (p-Τολουολοσουλφονικό οξύ). Στην συνέχεια εφαρμόζεται ψυκτήρας και το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού του διαλύτη, ~80 °C ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες reflux. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 20 min και ελέγχθηκε με την χρήση TLC.

Το προϊόν (1b) απομονώθηκε έπειτα από δύο εκχύλισεις με διαιθυλαιθέρα (Et₂O) όπου η οργανική φάση συλλέχθηκε και προστέθηκε ποσότητα υδατικού διαλύματος NaHCO₃ και έπειτα μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος κορεσμένου NaCl για ακόμη μία εκχύλιση. Στην συνέχεια στην οργανική φάση προστέθηκε ξηραντικό MgSO₄ και απομακρύνθηκε με απλή διήθηση. Τέλος πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση.

Για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (PE:EtOAc, v/v, 40:1). Το προϊόν απομονώθηκε σε απόδοση 73%.

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃): δ 7.45 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.32 (t, J=7.45 Hz, 2H), 7.22 (t, J=7.45 Hz, 1H), 6.20-6.19 (m, 1H), 2.74-2.70 (m, 2H), 2.56-2.52 (m, 2H), 2.06-2.00 (m, 2H).

¹³CNMR (500 MHz, CDCl₃): δ 142.4, 136.8, 128.2, 126.8, 126.1, 125.5, 33.3, 33.1, 23.3.

Σύνθεση 1-(5-υδροϋπεροξυ κυκλοπεντ-1-ενυλ)βενζολίου (1c) με αντίδραση Φωτοοξειδωσης με $^1\text{O}_2$

Σε σφαιρική φιάλη που περιείχε το υπόστρωμα 1-κυκλοπεντυλοβενζόλιο (**1b**) (185 mg, 1.23 mmol) προστέθηκαν 15-20 ml ακέτυλο νιτριλίο (AcCN) και καταλυτική ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή, τέτραφαίνυλο-πορφυρίνη (TPP). Έπειτα το μείγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε στην συσκευή φωτοοξειδωσης η οποία περιλάμβανε μία λάμπα Ξένου (300 W, $\lambda > 300$ nm) και κορεσμένη ατμόσφαιρα O_2 . Η θερμοκρασία ήταν ρυθμισμένη στους 0-5 °C. Μετά το πέρας 16 min η αντίδραση ολοκληρώθηκε και ελέγχθηκε με TLC.

Σύνθεση 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόλης (1d) με αντίδραση αναγωγής με PPh_3

Στο μείγμα της αντίδρασης του 1-(5-υδροϋπεροξυ κυκλοπεντ-1-ένυλο)βενζολίου (**1c**) το οποίο βρισκόταν σε παγόλουτρο προστέθηκε τόση ποσότητα τριφαινυλοφωσφίνης (PPh_3) όση χρειαζόταν ώστε να αναχθεί το υπόστρωμα στο τελικό προϊόν, 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόλη. Κατά τις προσθήκες της PPh_3 η πορεία της αντίδρασης ελεγχόταν με TLC. Για τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (PE: EtOAc, v/v, 30:1, 20:1, 10:1). Η απόδοση μετά την αντίδραση αναγωγής βρέθηκε περίπου 70%.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): δ 7.57 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 7.35 (t, $J=7.45\text{ Hz}$, 2H), 7.27-7.24 (m, 1H), 6.32-6.31 (m, 1H), 5.24-5.23 (m, 1H), 2.71-2.64 (m, 1H), 2.47-2.36 (m, 2H), 1.96-1.91 (m, 1H), 1.77 (s.br, 1H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 144.5, 134.7, 130.0, 128.5, 127.3, 126.1, 77.2, 34.0, 30.4.

Σύνθεση 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόνης (1e) με αντίδραση φωτοοξειδωσης με ανθράκινο-2-σουλφονικό νάτριο (SAS)

Σε μικρό φιαλίδιο με μαγνητικό αναδευτήρα προστίθεται ποσότητα της 2-φαινυλοκυκλοπεντ-2-ενόλης (**1d**) (5 mg, 0.03 mmol) και 1 ml απιονισμένου νερού. Έπειτα προστίθεται καταλυτική ποσότητα ανθράκινο-2-σουλφονικό νατρίου (SAS) ως φωτοκαταλύτη. Το μείγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε στην συσκευή φωτοοξειδωσης η οποία αποτελείται από παροχή κορεσμένου οξυγόνου και λευκό φως από μία λάμπα Ξένου (300 W, $\lambda > 300$ nm) και έλεγχο της θερμοκρασίας (0-5 °C). Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε περίπου στους 30 °C. Μετά από 1 h το δείγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα και ελέγχθηκε με αέρια χρωματογραφία. Το τελικό προϊόν δεν έγινε δυνατόν να απομονωθεί σε ικανοποιητική απόδοση.

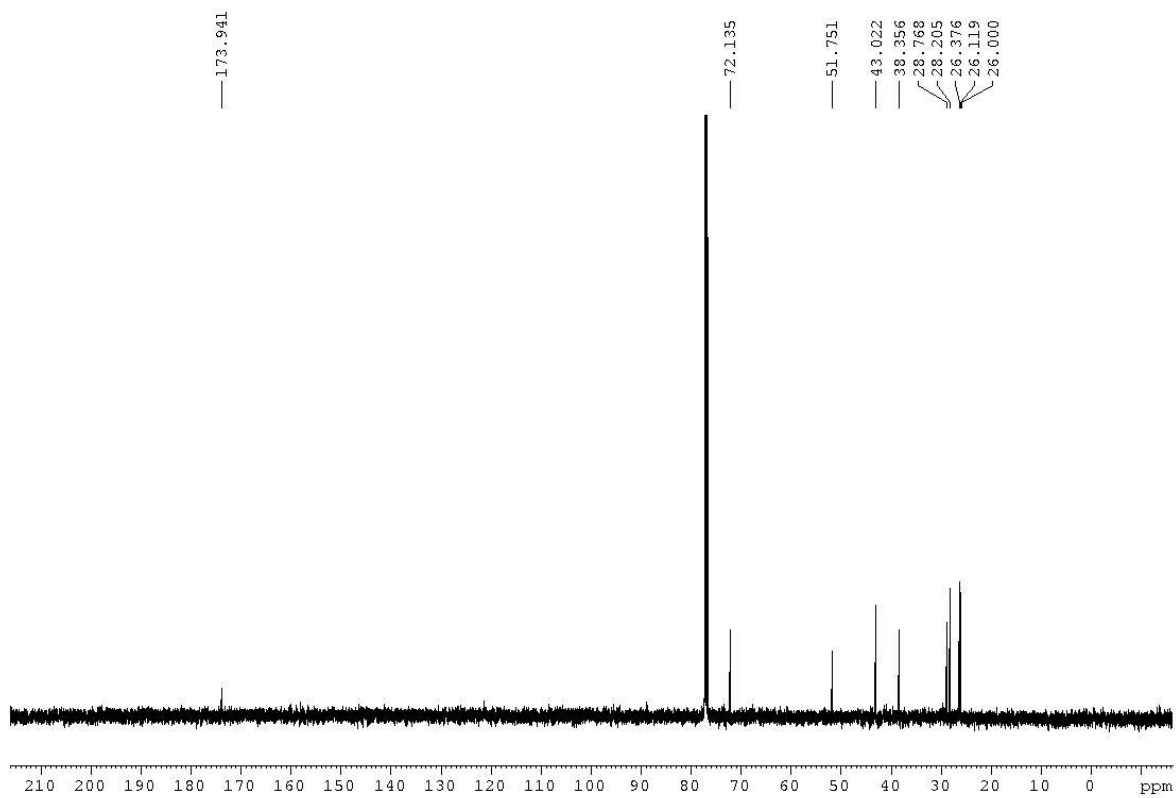
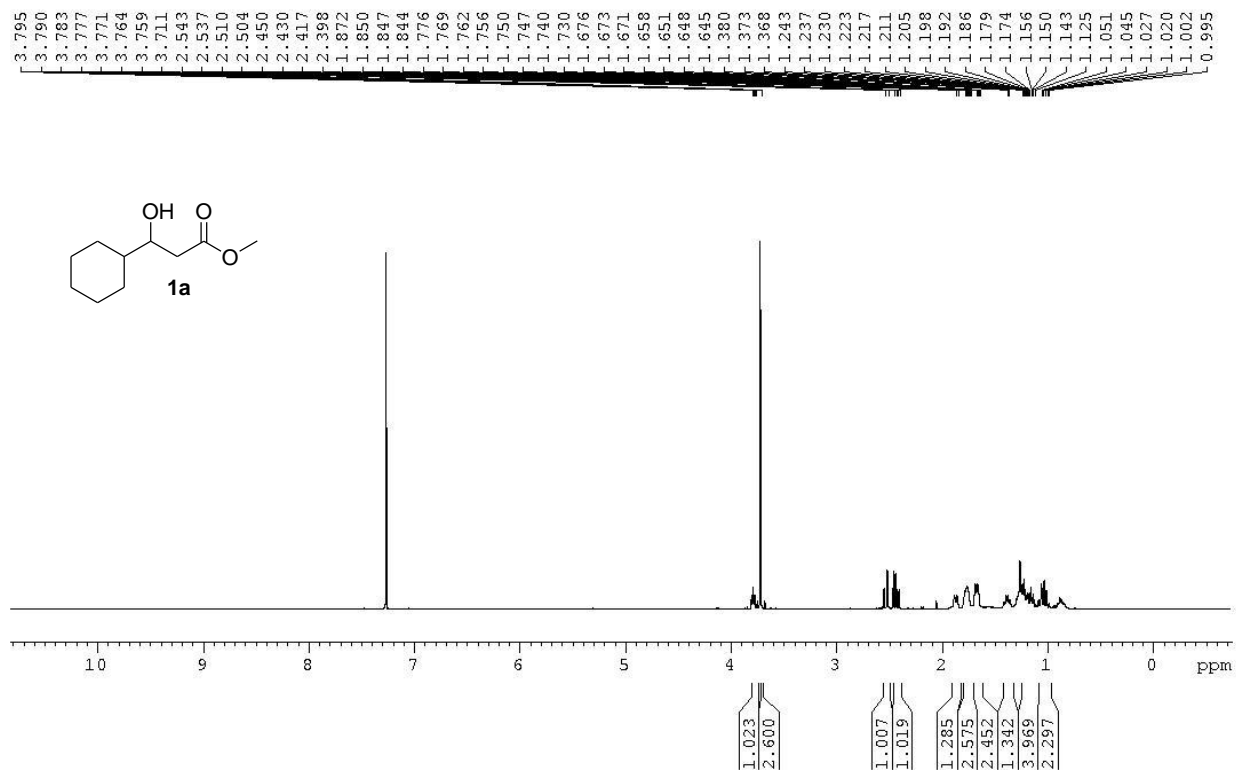
2.4 Βιβλιογραφία

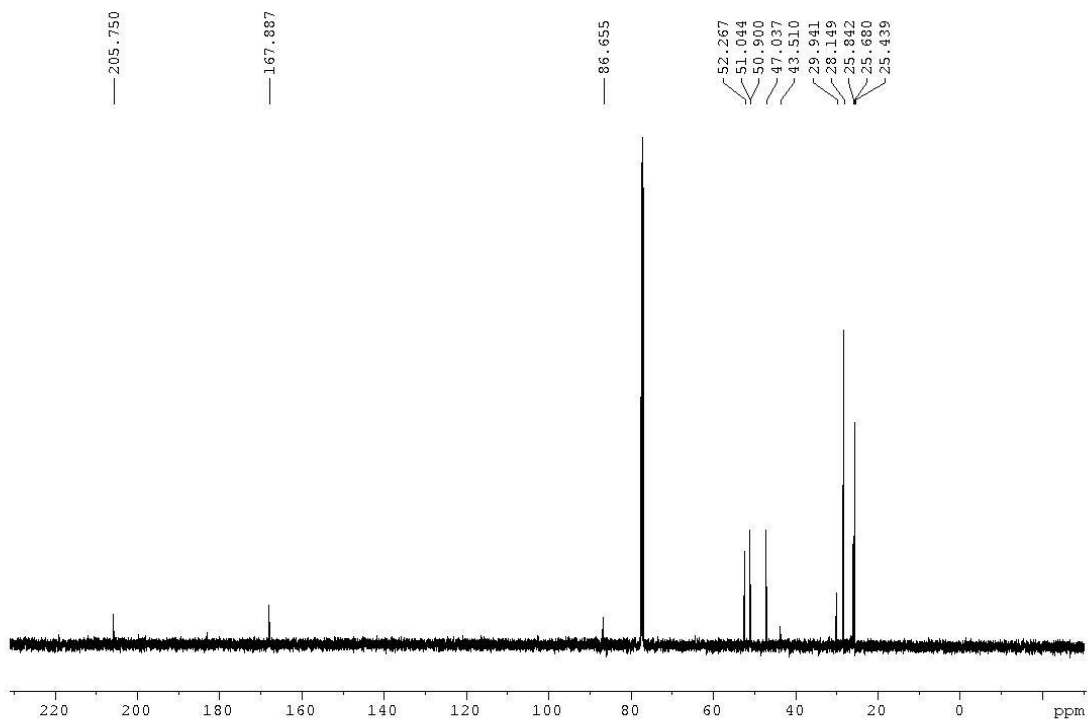
1. Ogilby Peter R., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3181-3209
2. Gollnick, K. *Adv. Photochem.* **1968**, 6, 1.
3. Orfanopoulos M., *Photochemistry and Photobiology*, **2021**, 97, 1182-1218.
4. Sevin F., McKee M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 19, 4591–4600.
5. Hamberg M., Samuelsson B., *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242, 5336–5343.
6. Orfanopoulos M., Alberti M.N., *Synlett*, **2010**, No. 7, 999–1026
7. Zhang W., Hollmann F., Gacs J., Isabel W. C. E. Arends, *ChemCatChem* **2017**, 9, 3821 – 3826.

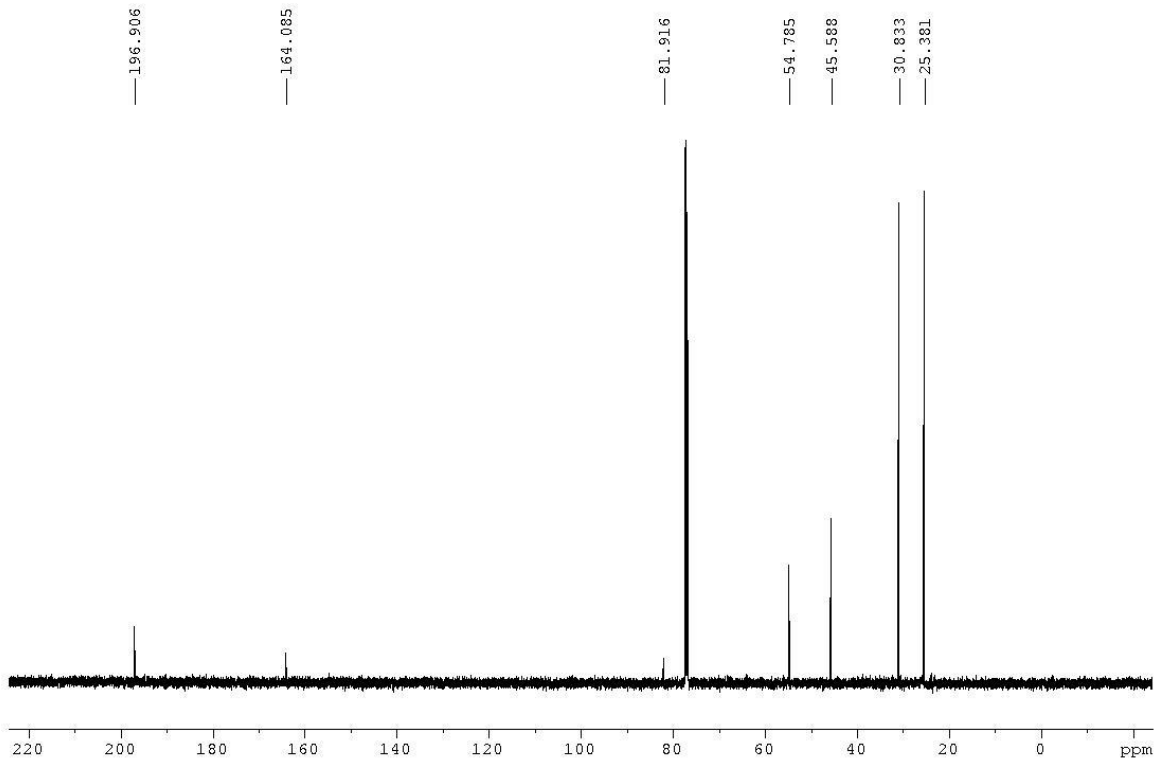
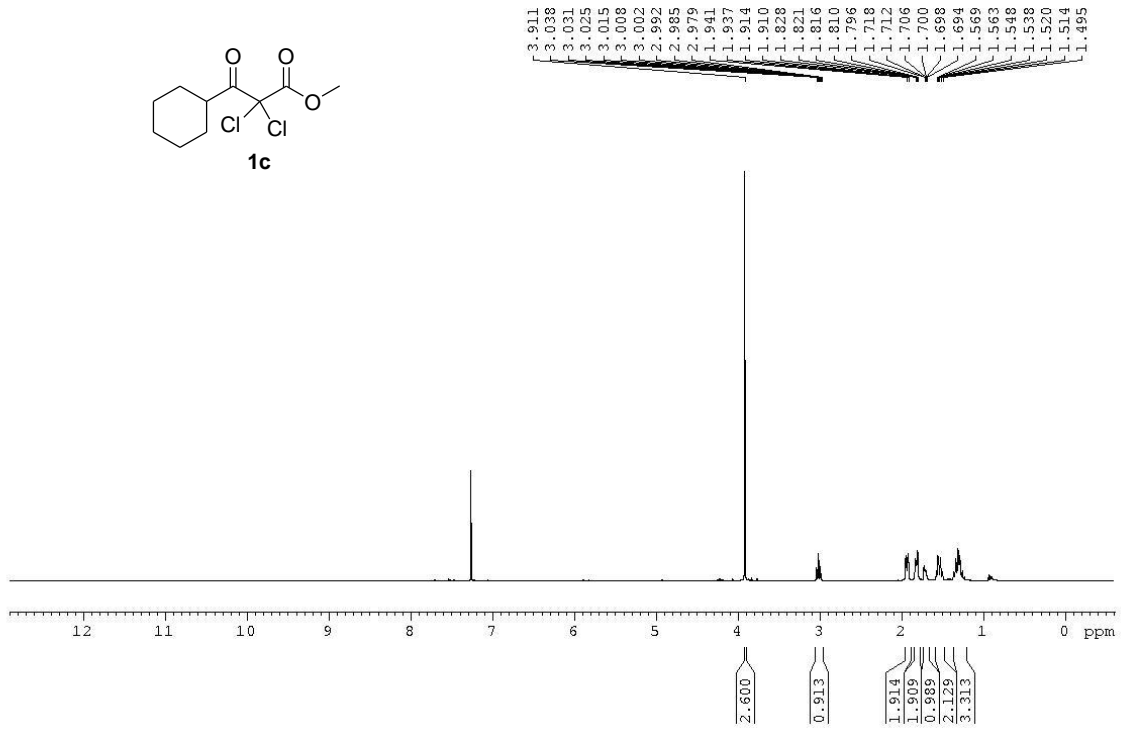
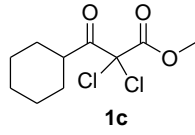
Παράρτημα

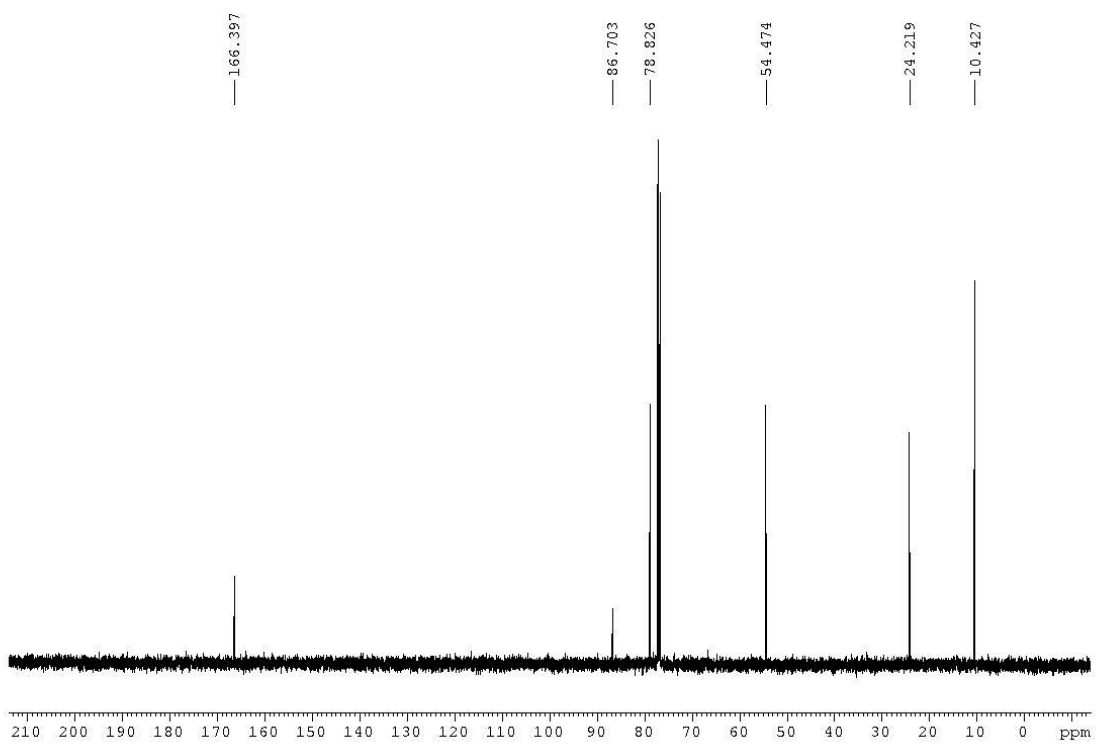
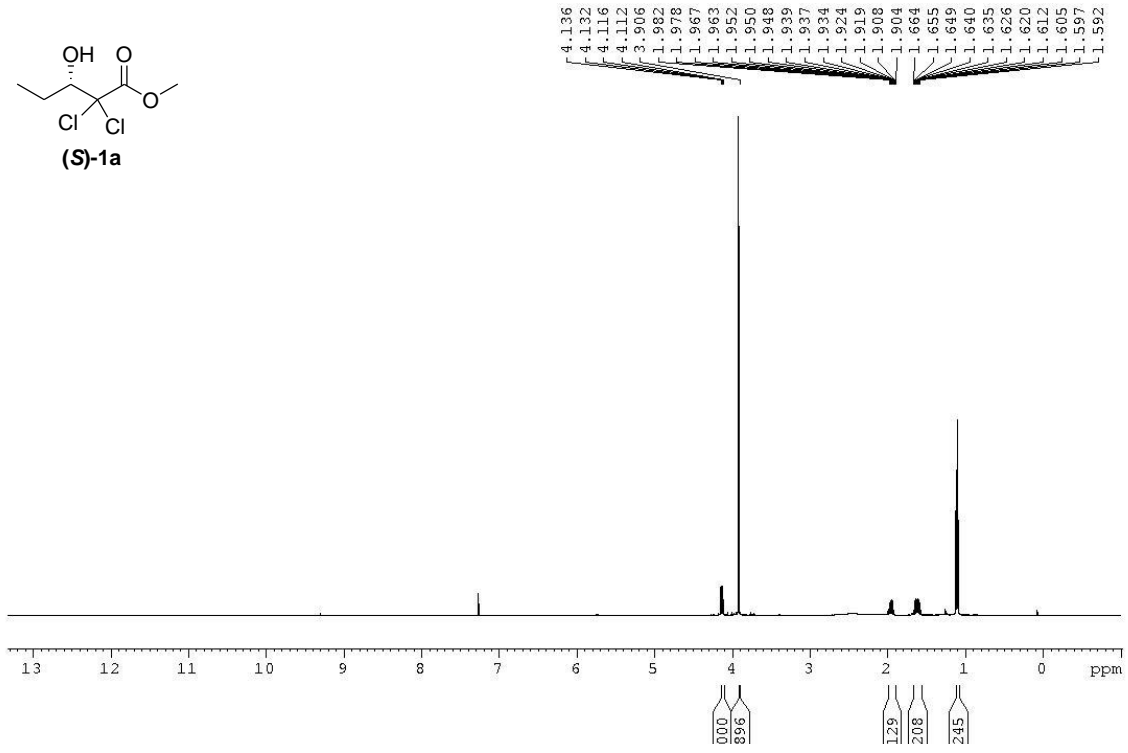
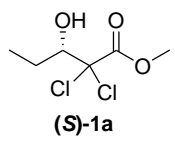
Φάσματα $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

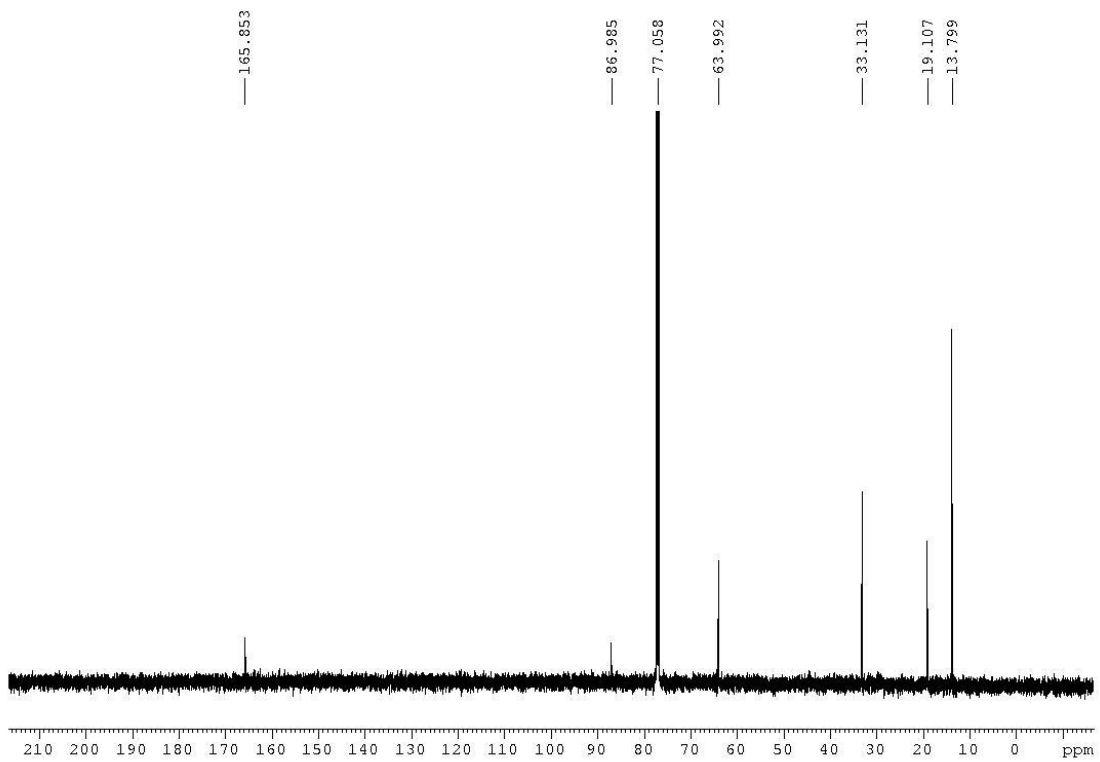
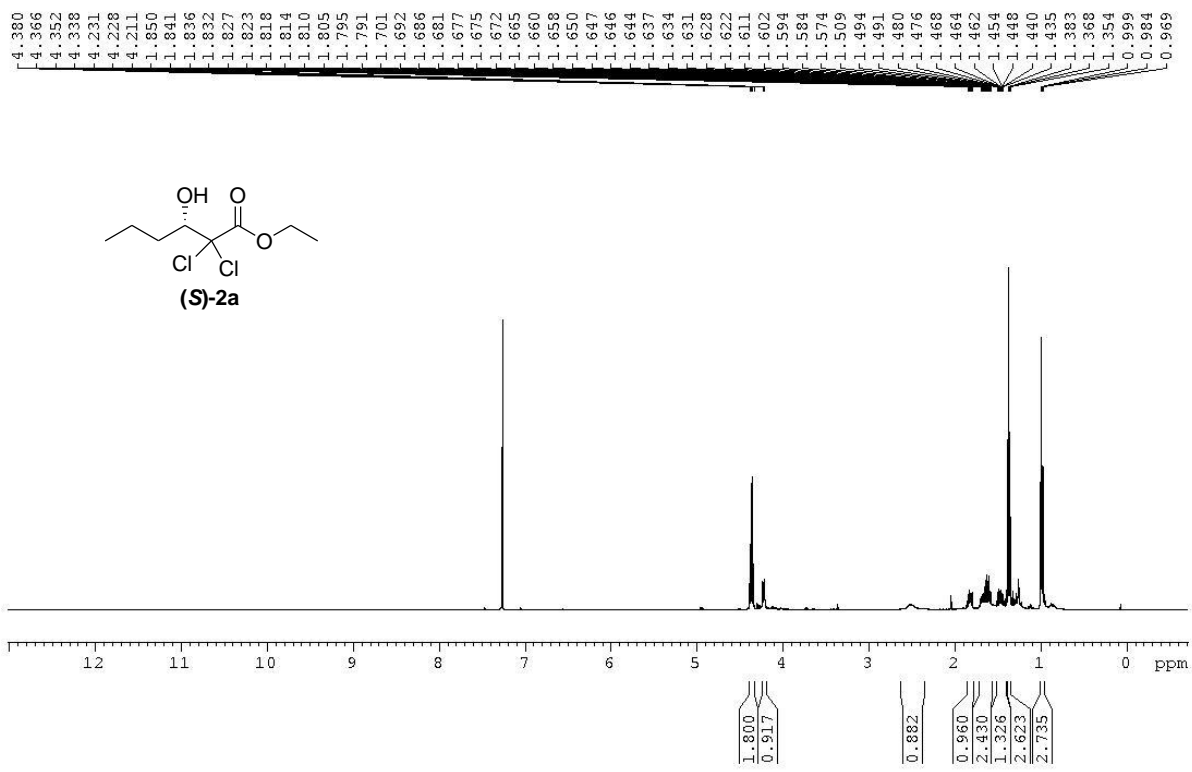
και αέριας χρωματογραφίας (GC)

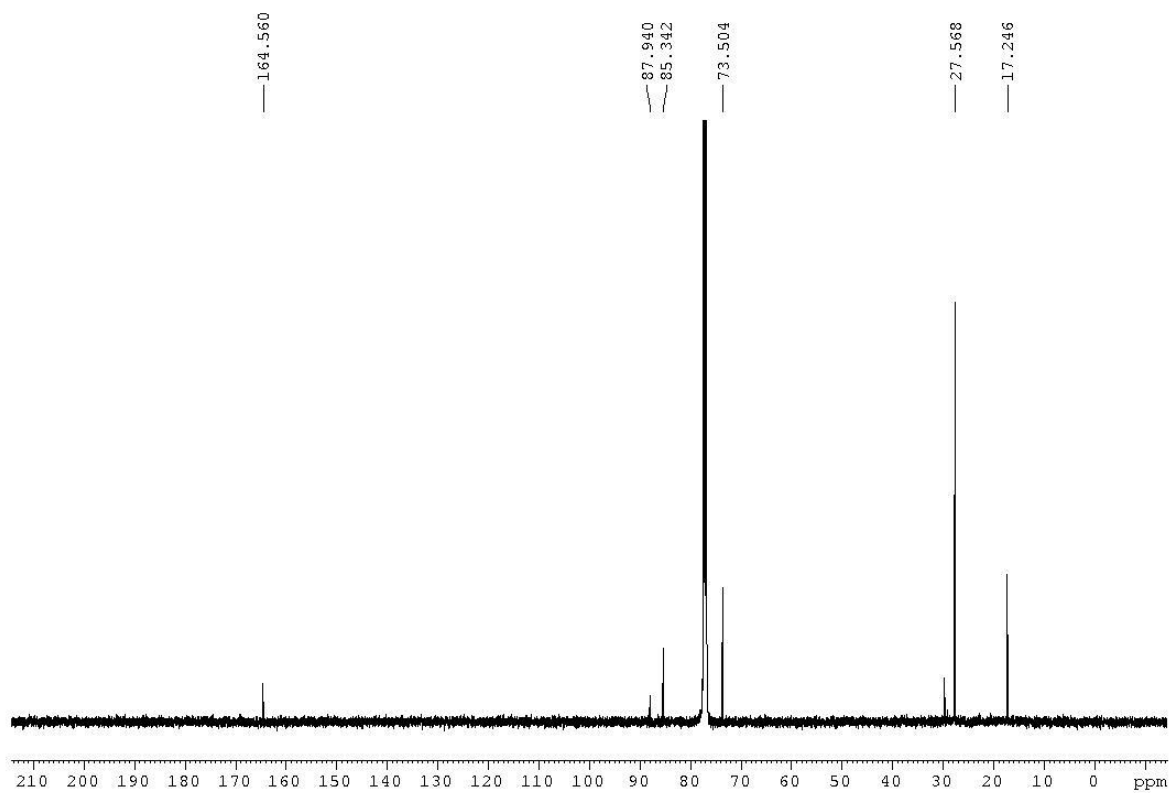
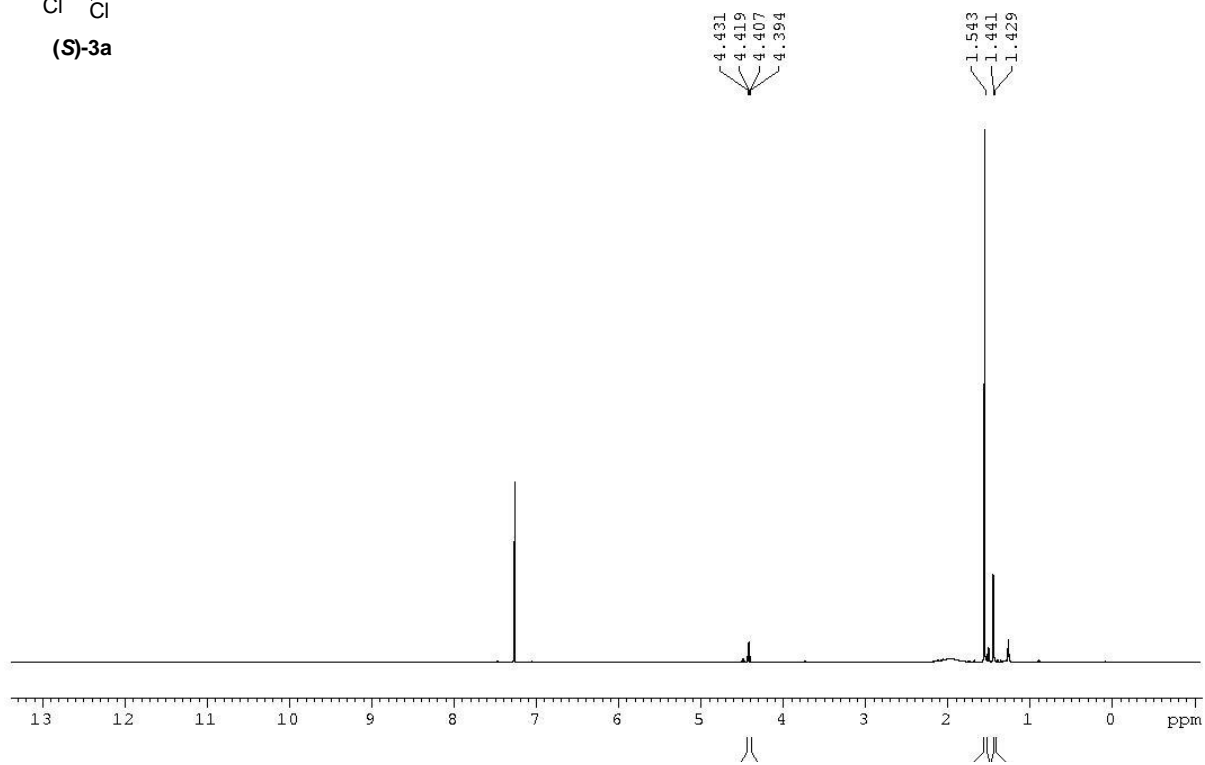
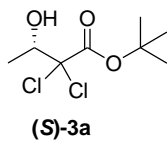


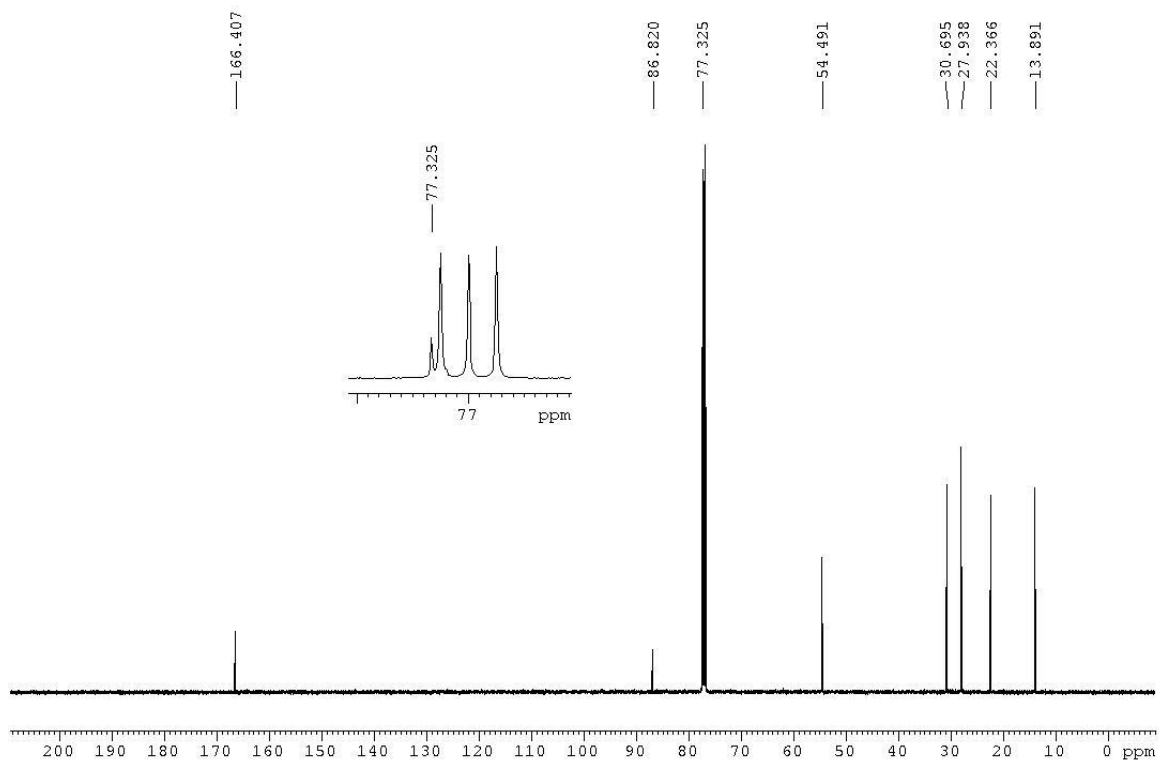
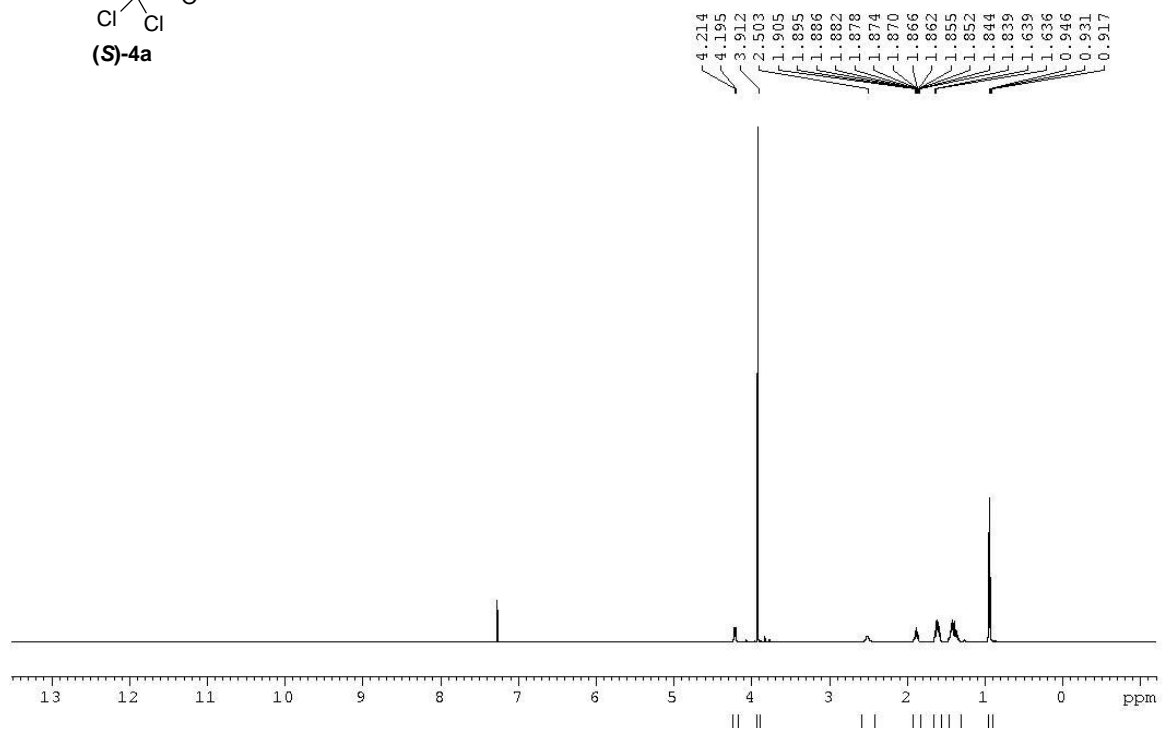
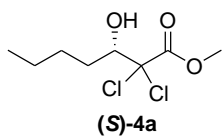


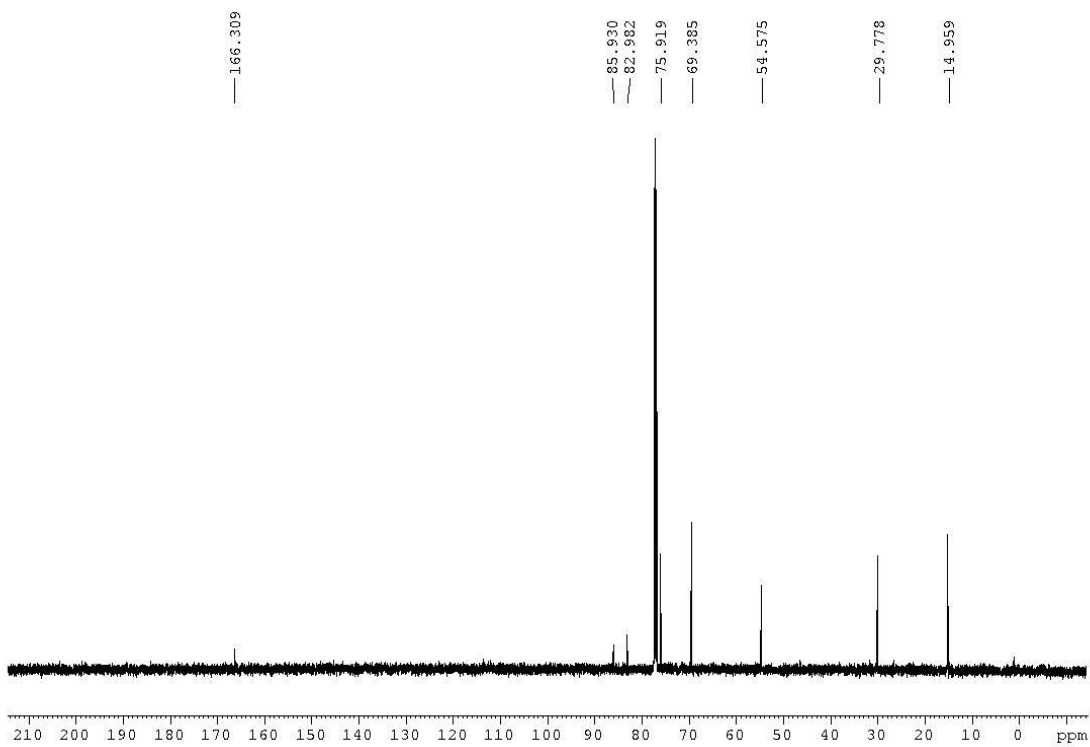
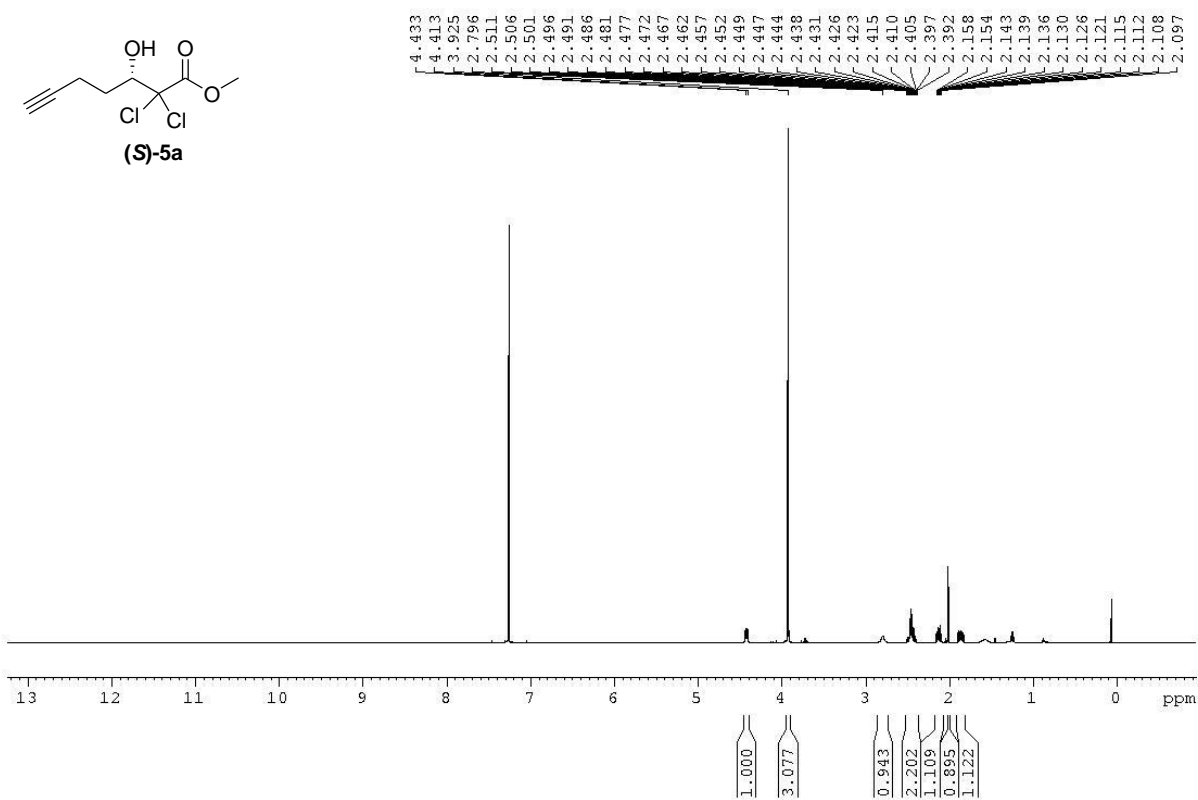
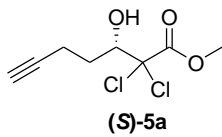


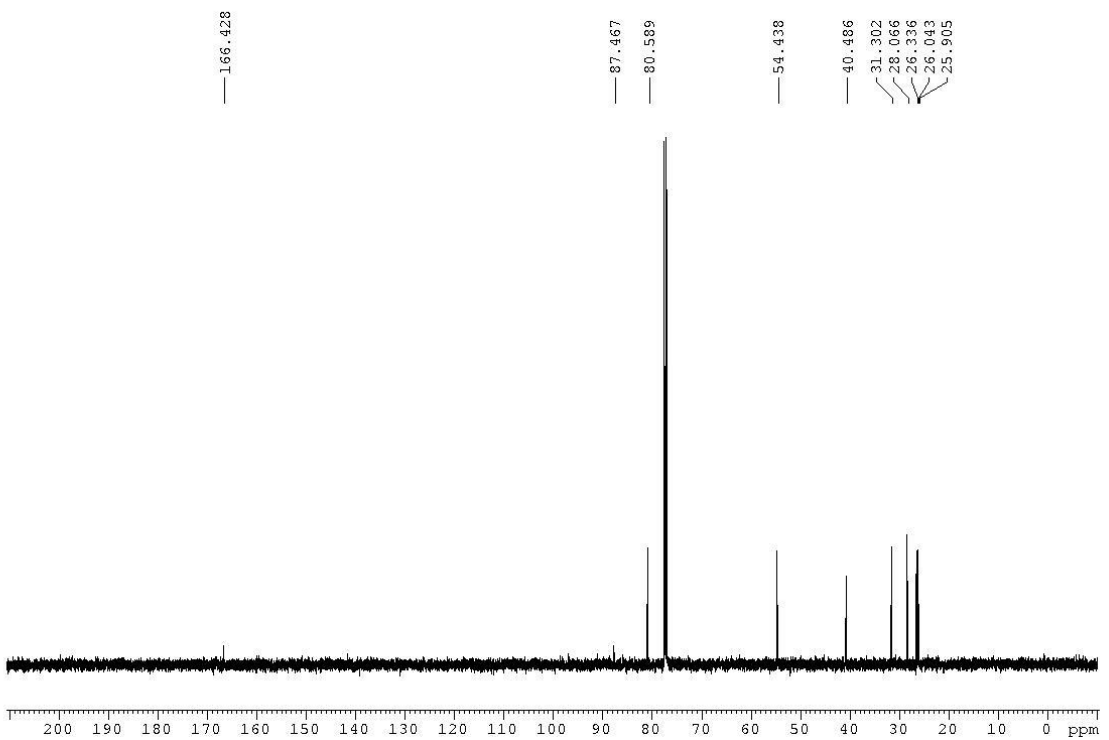
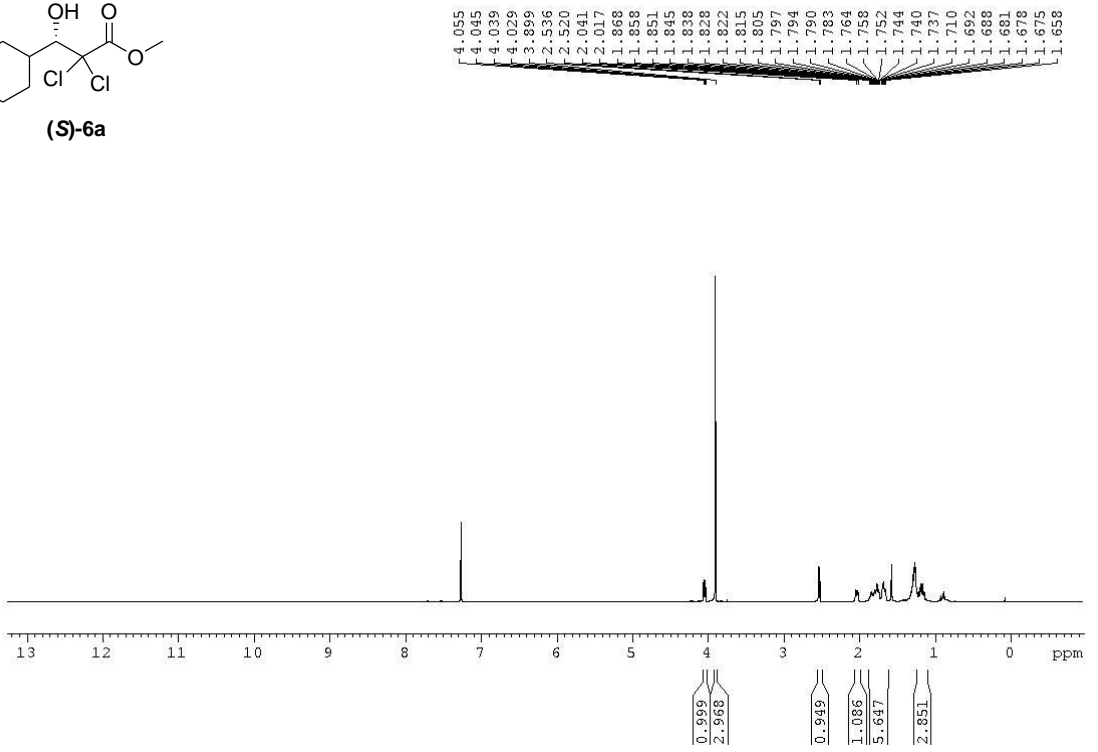
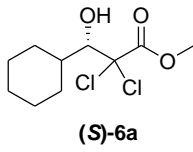


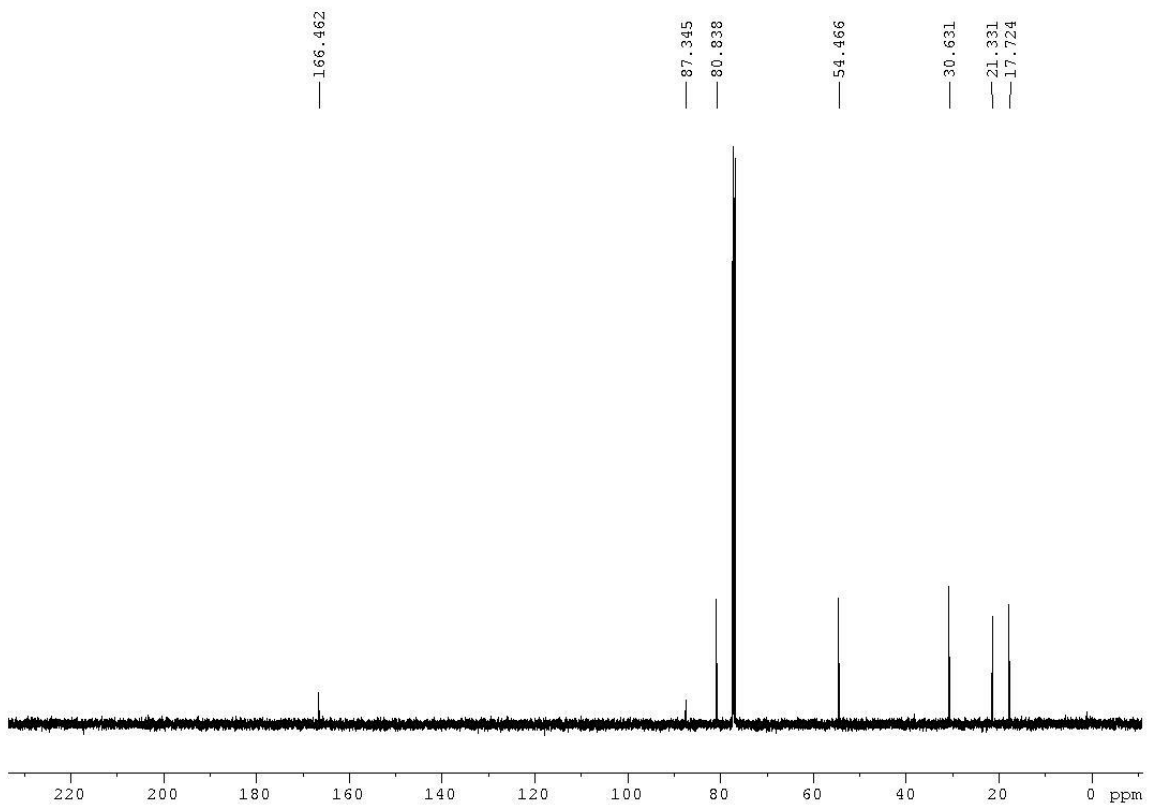
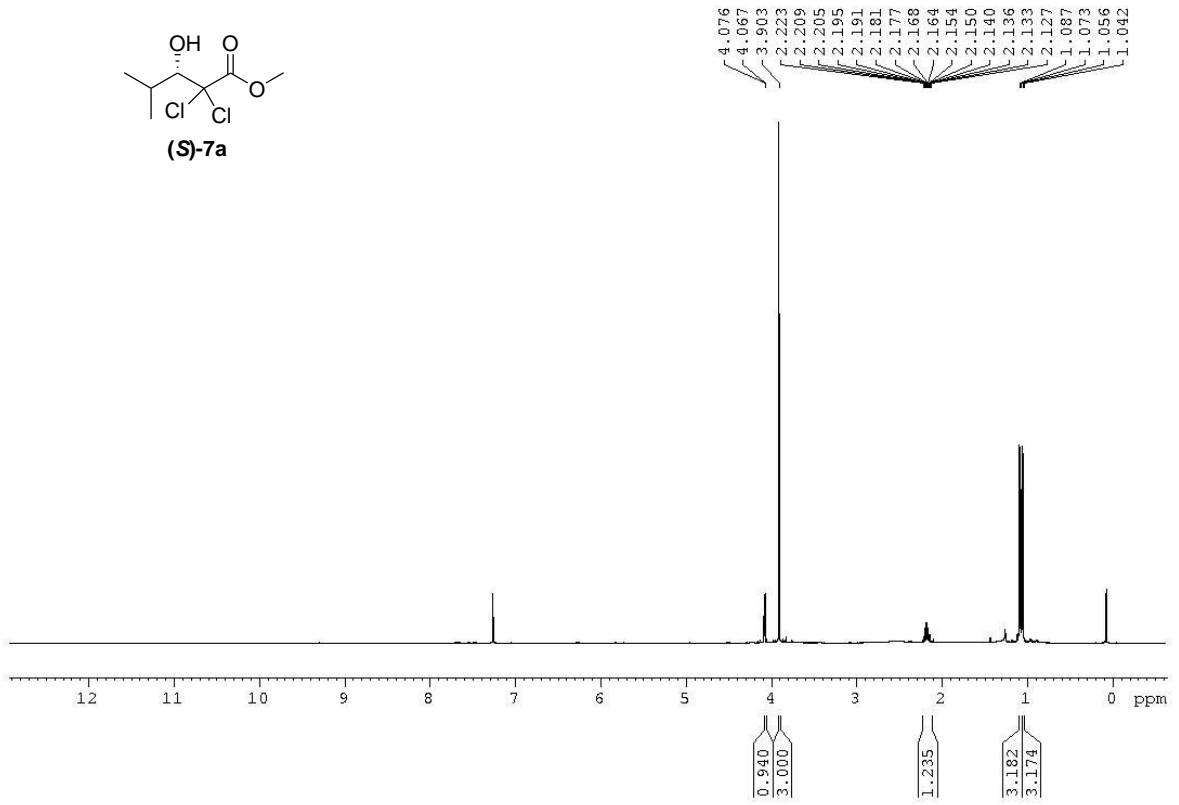
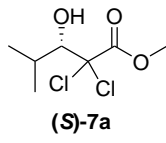


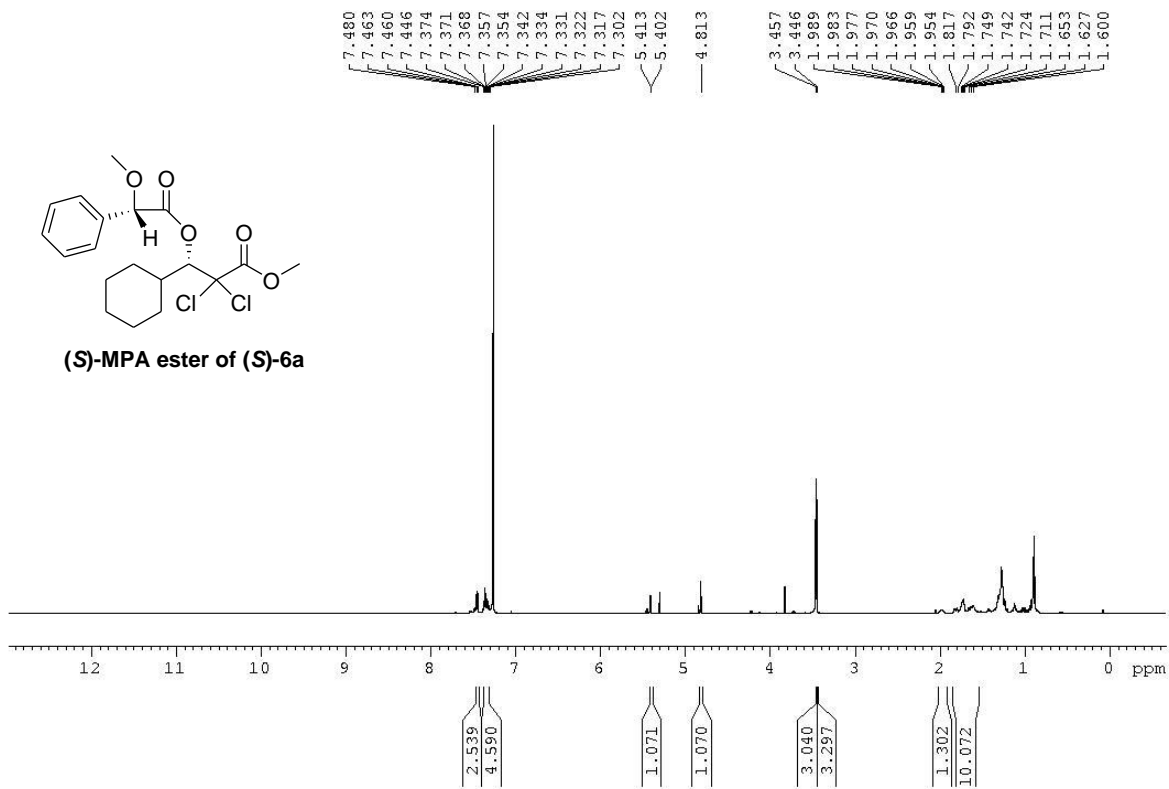
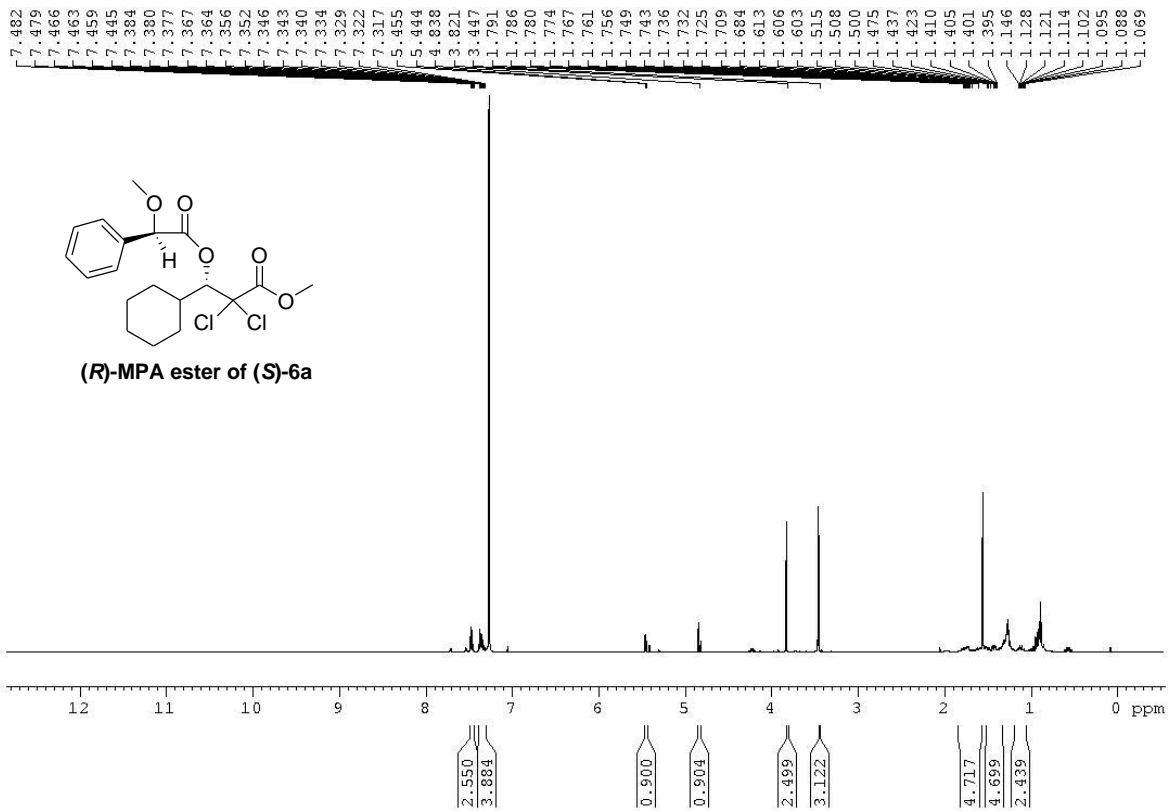


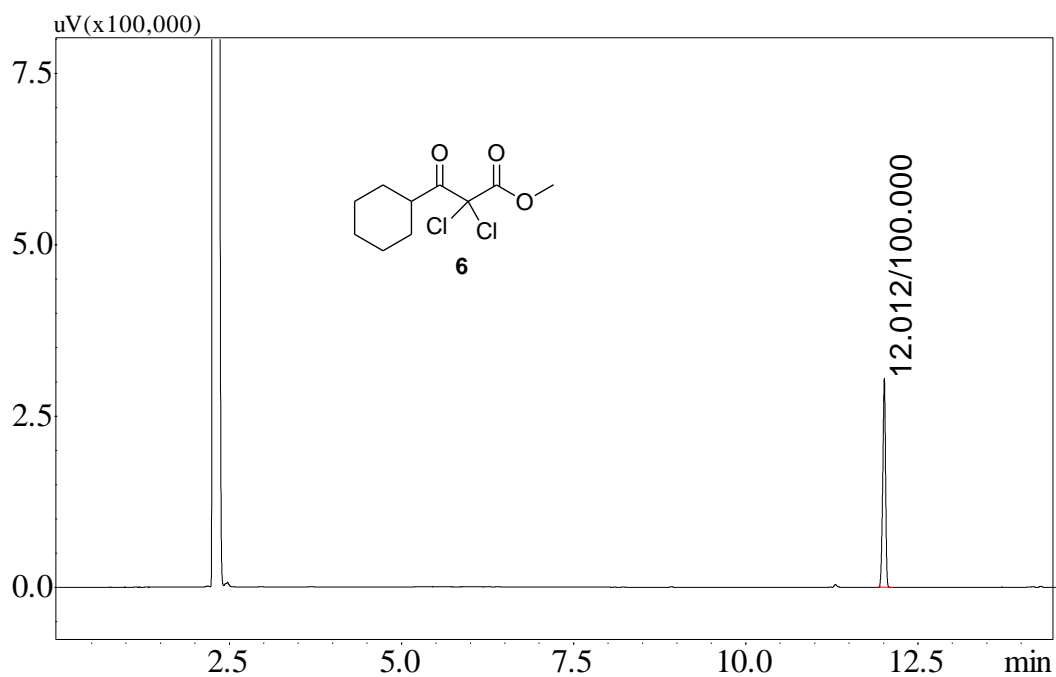




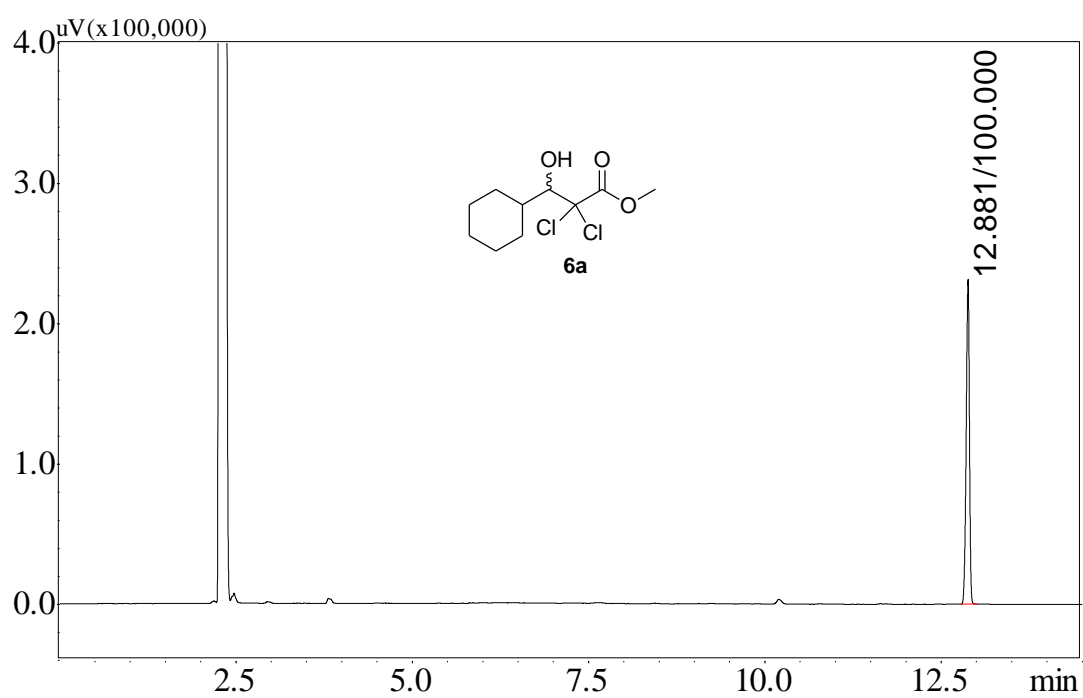


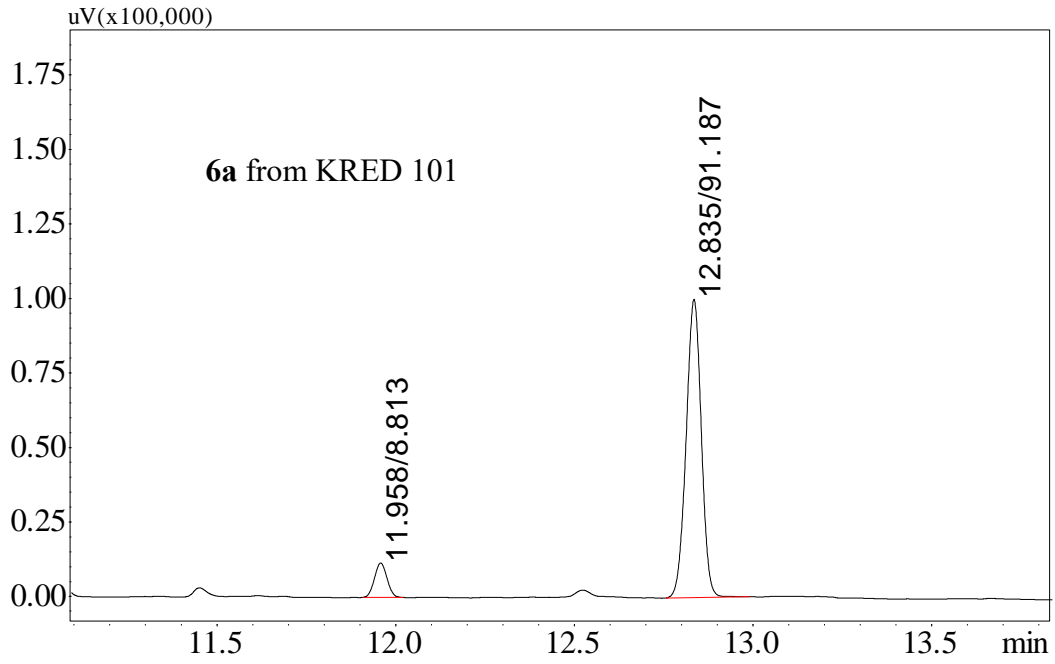




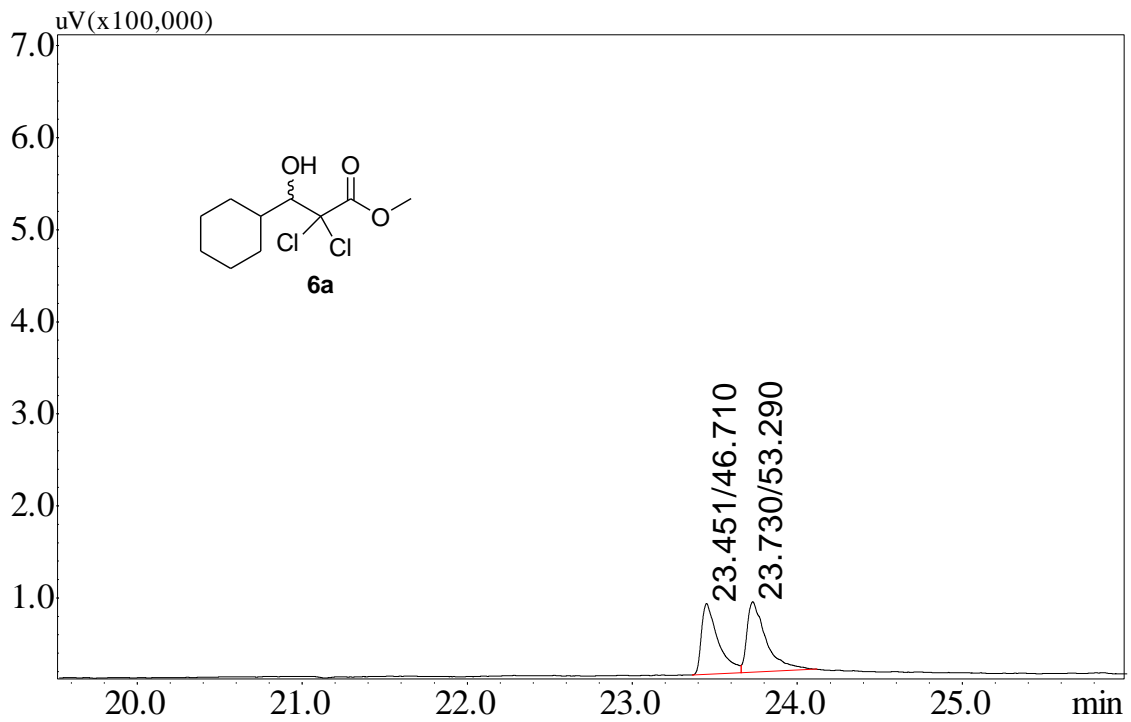


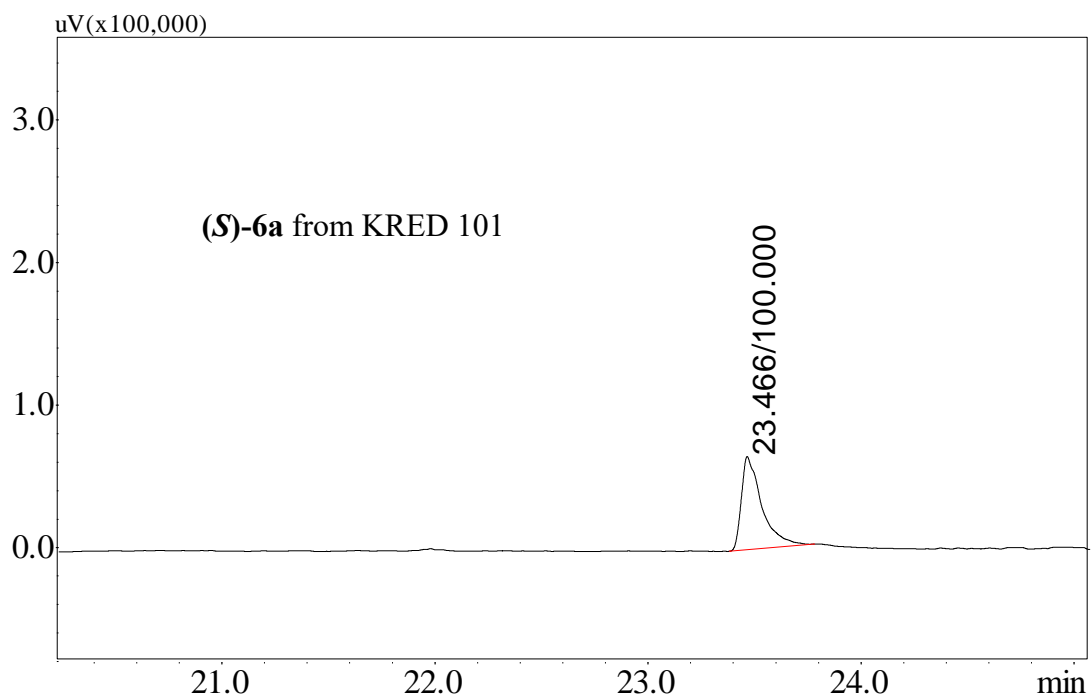
Χρησιμοποιήθηκε μη πολική κολώνα (HP-5 capillary, 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm , 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane).

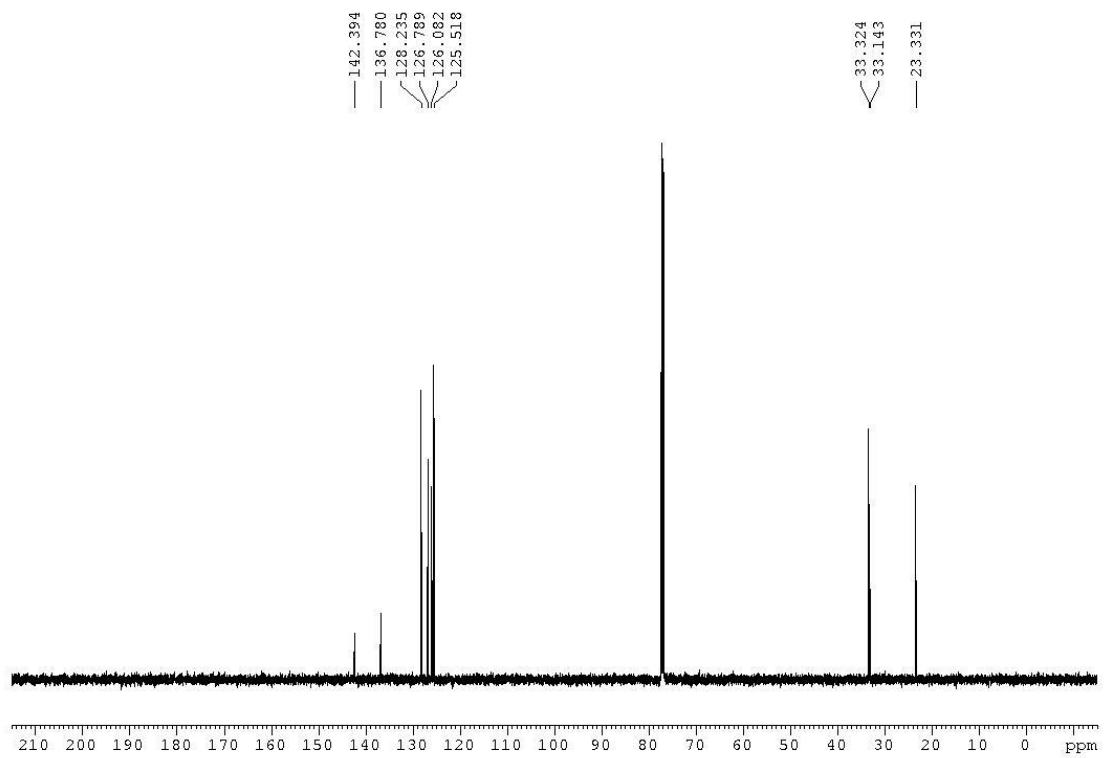
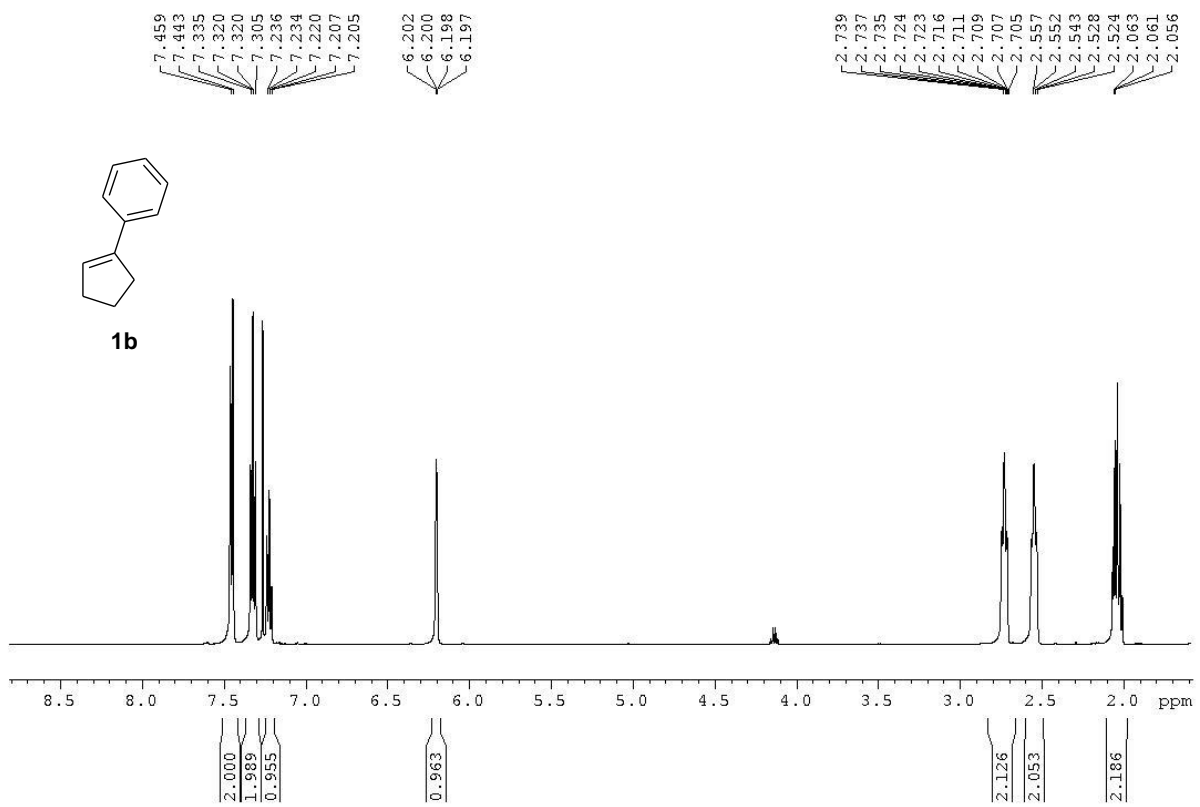


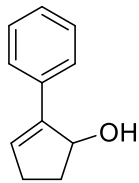


Χρησιμοποιήθηκε χειρόμορφη κολώνα (J&W CP-Chirasil-Dex CB ($25 \times 0.25 \times 0.25 \mu\text{m}$) συνολικού μήκους 25m.









1d

