ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

CD-g-C_3N_4 ΩΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΥ

ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΝΑΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

ΧΑΤΖΟΥΔΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2019

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH BIOLOGICAL ACTIVITY

MASTER THESIS

CD-g-C_3N_4 AS PHOTOSENSITIZER FOR ENE AND ELECTRON TRANSFER REACTIONS

ENCAPSULATION OF A REDUCING ENZYME IN BIOPOLYMER NANOPARTICLES: STUDY OF CATALYTICAL ACTIVITY OF THE NEW NANOREACTOR

CHATZOUDIS APOSTOLOS

Master Thesis Supervisor: SMONOU IOULIA

HERAKLION 2019

Εξεταστική Επιτροπή

Σμόνου Ιουλία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα),
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βελώνια Καλλιόπη

Επίκουρη Καθηγήτρια,
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας - Βιοκατάλυσης, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά την χρονική περίοδο 2017-2019.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκε καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου Ιουλία Σμόνου, για την ανάθεση του θέματος και την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε στο εργαστήριό της. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τις πολύτιμες συμβουλές της, την βοήθειά της σε κάθε δυσκολία και για τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Εξίσου θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον Ομότιμο Καθηγητή Μιχάλη Ορφανόπουλο για την εμπιστοσύνη του, για τις πολύτιμες συμβουλές του, για την στήριξη που μου παρείχε και για όλα όσα μου δίδαξε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Επίσης, για τις γνώσεις που μου προσέφεραν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές που με δίδαξαν στο μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα, τον Καθηγητή Γεώργιο Βασιλικογιαννάκη, τον Καθηγητή Εμμανουήλ Στρατάκη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Απόστολο Σπύρο και τον Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη.

Ευχαριστώ πολύ την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Καλλιόπη Βελώνια για την εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε, για την ευκαιρία που μου έδωσε να διευρύνω τις γνώσεις μου επάνω στον τομέα της Χημείας και για όλες τις γνώσεις που μου προσέφερε σε όλη την ακαδημαϊκή πορεία μου. Ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα Αλέξη Θεοδώρου, από την επιστημονική ομάδα της κ. Βελώνια, για όλη την πολύτιμη βοήθεια και την στήριξη που μου παρείχε αλλά και για την άψογη συνεργασία μας κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του τομέα Οργανικής Χημείας και ιδιαιτέρως τον Μάριο Κυδωνάκη και τον Νικήτα Μαλλιαρό για τη βοήθειά τους. Ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου μας, τον υποψήφιο διδάκτορα Βασίλη Γιαννόπουλο και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μαργαρίτα Ζωίδη, Σοφία Μελαμπιανάκη και Νίκο Κατσουλάκη. Θερμά ευχαριστώ τις Καμέλα Μυρτολλάρη και Χρυσούλα Σαμιωτάκη για την όλη στήριξή τους και την επικοινωνία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Τέλος, από τα βάθη της καρδιάς μου ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου Θεόδωρο και Μαρίνα για την στήριξή τους και τις θυσίες που έκαναν για μένα ώστε να καταφέρω να εκπονήσω το μεταπτυχιακό αυτό δίπλωμα, αλλά και τους φίλους μου για την στήριξη και την υπομονή τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο:	**Απόστολος Χατζούδης**
Ημερομηνία Γέννησης:	24/01/1994
Τόπος Γέννησης:	Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα
Εθνικότητα:	Ελληνική
Διεύθυνση:	Πάτρας 26, Ηράκλειο Κρήτης
Κατάσταση:	Μεταπτυχιακός Φοιτητής στο Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
e-mail:	apchatzoudis@outlook.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

02/2017–Σήμερα	Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
02/2018-Σήμερα	Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία: α) « CD-C_3N_4 ως φωτοευαισθητοποιητής σε αντιδράσεις ενίου και μεταφοράς ηλεκτρονίου» β) «Ενθυλάκωση αναγωγικού ενζύμου σε νανοσωματίδια βιοπολυμερών: Μελέτη καταλυτικής δράσης του νέου νανοαντιδραστήρα» Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
09/2012–11/2016	Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης (7.95)

10/2015–10/2016 Πτυχιακή Ερευνητική Εργασία με Θέμα «Αυτοοργάνωση Πεπτιδίων Εμπνευσμένων από Φυσικές Αλληλουχίες Πρωτεϊνών».

ΕΜΠΕΙΡΙΑ

09/2018–12/2018 Βοηθός Προπτυχιακού Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας , Πανεπιστήμιο Κρήτης

09/2017–12/2017 Βοηθός Προπτυχιακού Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας , Πανεπιστήμιο Κρήτης

06/2015–09/2015 Πρακτική Άσκηση με Θέμα «Κατασκευή Τρισδιάστατων Μικροδομών με Επίδραση Λέιζερ» στο Ινστιτιαούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Άριστη Γνώση της Αγγλικής Γλώσσας, Proficiency of Edexcel
- Ελληνική, Μητρική Γλώσσα

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Βασικές Γνώσεις Η/Υ, Windows και Microsoft Office (Global Intermediate - Global Cert)
- Δίπλωμα Οδήγησης Β
- Εμπειρία σε:
    - ✓ Όργανο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR, Bruker)
    - ✓ Όργανο Αέριας Χρωματογραφίας (GC, Shimadzu)
    - ✓ Όργανο Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC, Shimadzu)
    - ✓ UV-Vis Φασματοφωτόμετρο
    - ✓ Τεχνικές Μικροσκοπίας

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Συμμετοχές σε Επιστημονικές Δημοσιεύσεις:

  Kokotidou C., Jonnalagadda S.V.R., Orr A. A., Seoane -Blanco M., Apostolidou C.P., van Raaij M.J., Kotzabasaki M., **Chatzoudis A.**, Jakubowski J.M., Mossou E., Forsyth V.T., Mitchell E.P., Bowler M. W., Llamas-Saiz A.L., Tamamis P., Mitraki A., "A novel amyloid designable scaffold and potential inhibitor inspired by GAIIG of amyloid beta and the HIV-1 V3 loop", *FEBS letters* **2018**, *592*, 1777-1788. *doi:10.1002/1873-3468.13096*

  Chatzoudis, A.; Giannopoulos, V.; Hollman, F.; Smonou I., "Surface-Doped Graphitic Carbon Nitride Catalyzed Photooxidation of Olefins and Dienes: Chemical Evidence for Electron Transfer and Singlet Oxygen Mechanisms", *Catalysts* **2019**, *9(8)*, 639-650. *doi:10.3390/catal9080639*

- Προφορική παρουσίαση στο 21° Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών, Μάιος 2019, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα
  «CD-g-C_3N_4 CD-g-C_3N_4 ως φωτοευαισθητοποιητής σε αντιδράσεις ενίου και μεταφοράς ηλεκτρονίου», Χατζούδης Α.; Σμόνου Ι.

- Αναρτημένη παρουσίαση (poster) στο 6° Πανελλήνιο Συνέδριο Πράσινης Χημείας, Οκτώβριος 2019, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα
  «Encapsulation of a Reducing Enzyme in Biopolymer Nanoparticles: Study of Catalytical Activity of the New Nanoreactor», Χατζούδης , Α.; Θεοδώρου, Α.; Βελώνια, Κ.; Σμόνου, Ι.

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

Name:	**Apostolos**
Surname:	**Chatzoudis**
Date/ Place of Birth:	January 24, 1994 / Heraklion, Crete, Greece
Nationality:	Greek
Address:	26 Patras Street, Heraklion, Crete, Greece
Status:	Postgraduate student, Department of Chemistry, University of Crete
e-mail:	apchatzoudis@outlook.com

EDUCATION

02/2017 – present	MSc in Postgraduate Program of "Isolation and Synthesis of Natural Products with Biological Activity", Department of Chemistry, University of Crete.
02/2018 – present	MSc Diploma Thesis: a) "CD-C_3N_4 as photosensitizer for ene reaction and electron transfer reaction", b) "Encapsulation of reducing enzyme in biopolymer nanoparticles: Study of catalytic activity of the new nano-reactor". Supervisor Associate Professor I. Smonou Department of Chemistry, University of Crete
09/2012 – 11/2016	BSc in Materials Science and Technology, University of Crete (7.95/10)
10/2015 – 10/2016	Graduate Diploma Thesis: "Self-assembly of peptides inspired from natural protein sequences", Supervisor

Professor A. Mitraki, Department of Materials Science and Technology, University of Crete .

EXPERIENCE

09/2018 – 12/2018	Assistant in Undergraduate Organic Chemistry Laboratory I, Department of Chemistry, University of Crete.
09/2017 – 12/2017	Assistant in Undergraduate Analytical Chemistry Laboratory II, Department of Chemistry, University of Crete.
06/2015 – 09/2015	Practical Internship «Construction of Three-Dimensional Microstructures by Laser Effect» at the Institute of Electronic Structure & Laser, Foundation of Research and Technology, Heraklion, Greece

LANGUAGES

- English, Certificate Proficiency of Edexcel (C1)
- Greek, Mother Tongue

SKILLS

- Basic Level in Windows and Microsoft Office (Global Intermediate - Global Cert)
- Driving License B
- Experience in:
    - ✓ NMR Bruker instrument
    - ✓ Shimadzu Gas Chromatography instrument
    - ✓ Shimadzu High Performance Liquid Chromatography instrument

- ✓ UV-Vis Spectrophotometer
- ✓ Microscopy techniques

ADDITIONAL INFORMATION

- Participations in Scientific Publications:

  Kokotidou C., Jonnalagadda S. V. R., Orr A. A., Seoane -Blanco M., Apostolidou C.P., van Raaij M. J., Kotzabasaki M., **Chatzoudis A.**, Jakubowski J. M., Mossou E.,Forsyth V. T., Mitchell E. P., Bowler M. W., Llamas-Saiz A. L., Tamamis P. , Mitraki A., A novel amyloid designable scaffold and potential inhibitor inspired by GAIIG of amyloid beta and the HIV-1 V3 loop, *FEBS Letters* **2018**, *592(11)*, 1777-1788. *doi:10.1002/1873-3468.13096*

  Chatzoudis, A.; Giannopoulos, V.; Hollman, F.; Smonou I., Surface-Doped Graphitic Carbon Nitride Catalyzed Photooxidation of Olefins and Dienes: Chemical Evidence for Electron Transfer and Singlet Oxygen Mechanisms, *Catalysts* **2019**, *9(8)*, 639-650. *doi:10.3390/catal9080639*

- Oral Presentation in 21th Chemistry Postgraduates Conference, May 2019, University of Crete, Greece
  "CD-g-C_3N_4 as photosensitizer for ene reaction and electron transfer reaction", Chatzoudis A.; Smonou I.

- Poster Presentation in 6th Panhellenic Symposium of Green Chemistry, October 2019, National and Kapodistrian University of Athens, Greece
  «Encapsulation of a Reducing Enzyme in Biopolymer Nanoparticles: Study of Catalytical Activity of the New Nanoreactor», Chatzoudis A.; Theodorou, A.; Velonia K.; Smonou I.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται μια νέα φωτοκαταλυτική δραστικότητα του γραφιτικού νιτριδίου του άνθρακα με πρόσμιξη νανοσωματιδίων άνθρακα (CD-C_3N_4) σε αλκένια και διένια. Αποδεικνύεται ότι ο CD-C_3N_4 φωτοευαισθητοποιεί την οξείδωση των ακόρεστων υποστρωμάτων σε διάφορους διαλύτες σύμφωνα με δύο ανταγωνιστικούς μηχανισμούς: τη μεταφορά ενέργειας μέσω του οξυγόνου απλής κατάστασης ($^1O_2$) και/ή τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω υπεροξειδίου ($O_2•^-$). Το οξυγόνο απλής κατάστασης, που προέρχεται από την διαδικασία φωτοευαισθητοποίησης του CD-C_3N_4, αντιδρά με τα αλκένια και σχηματίζει αλλυλικά υπεροξείδια (προϊόντα ενίου) ενώ με τα διένια, ενδοπεροξείδια. Όταν λειτουργεί ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίου, σχηματίζονται προϊόντα διάσπασης, που προέρχονται από τις αντίστοιχες διοξετάνες. Ποιός από τους δύο μηχανισμούς θα επικρατήσει εξαρτάται από την πολικότητα του διαλύτη και το εκάστοτε υπόστρωμα. Ο φωτοκαταλύτης παραμένει σταθερός κάτω από τις συνθήκες φωτοοξείδωσης, αντίθετα με τους συμβατικούς φωτοευαισθητοποιητές, ενώ οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι ετερογενείς αφού ο CD-C_3N_4 είναι στερεός, ξεπερνώντας συνήθη προβλήματα διαλυτότητας.

Λέξεις κλειδιά: φωτοκαταλύτης, φωτοευαισθητοποιητής, γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα, οξυγόνο απλής κατάστασης, μηχανισμός φωτοοξείδωσης, προϊόντα ενίου

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζεται η ενθυλάκωση του αναγωγικού ενζύμου Kred112 σε νανοσωματίδια αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυστυρενίου τα οποία συντίθενται με ελεγχόμενο ριζικό πολυμερισμό μεταφοράς ατόμου. Μελετάται η καταλυτική δράση του νανοαντιδραστήρα που περιέχει το αναγωγικό ένζυμο σε υδατικό διάλυμα, στην αντίδραση αναγωγής ενός α,β-ακόρεστου κετο εστέρα ως πρότυπου υποστρώματος. Τα προϊόντα της καταλυώμενης από το ενθυλακωμένο ένζυμο αναγωγής συγκρίνονται χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές μεθόδους, με αυτά της βιοαναγωγής με ελεύθερο ένζυμο. Παρατηρείται μία μη αναμενόμενη αναγωγή του διπλού δεσμού του υποστρώματος. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα

έδειξαν διαφορετική καταλυτική συμπεριφορά του νανοαντιδραστήρα στη συγκεκριμένη αντίδραση αναγωγής.

Λέξεις κλειδιά: βιοκατάλυση, κετορεδουκτάση, Kred112, αναγωγή, ενθυλάκωση, νανοαντιδραστήρας, αμφίφιλο συζυγές ποωτεΐνης-πολυμερούς

ABSTRACT

The first chapter presents a new photocatalytic reactivity of carbon-nanodot-doped graphitic carbon nitride (CD-C_3N_4) with alkenes and dienes. It is shown that CD-C_3N_4 photosensitizes the oxidation of unsaturated substrates in a variety of solvents according to two competing mechanisms: the energy transfer via singlet oxygen ($^1O_2$) and/or the electron transfer via superoxide ($O_2^{\bullet -}$). The singlet oxygen, derived by the CD-C_3N_4 photosensitized process, reacts with alkenes to form allylic hydroperoxides (ene products) whereas with dienes, endoperoxides. When the electron transfer mechanism operates, cleavage products are formed, derived from the corresponding dioxetanes. Which of the two mechanisms will prevail depends on solvent polarity and the particular substrate. The photocatalyst remains stable under the photooxidation conditions, unlike the most conventional photosensitizers, while the heterogeneous nature of CD-C_3N_4 overcomes usual solubility problems.

Keywords: photocatalyst, photosensitizer, graphitic carbon nitride, singlet oxygen, photooxidation mechanism, ene products

The second chapter presents the encapsulation of the reducing enzyme Kred112 into protein-polysyrene nanoparticles which are synthesized via a controlled atom transfer radical polymerization. The catalytic activity of the nanoreactor, which contains the reducing enzyme, is studied in aqueous solution in the reduction of an α,β-unsaturated keto ester. The products of the catalyzed by the encapsulated enzyme reduction are compared to those from the bioreduction by the free, native enzyme, using chromatographic methods. An unexpected reduction of the substrate's double bond is observed. These preliminary results showed different catalytic behavior of the nanoreactor in the particular reduction system.

Keywords: biocatalysis, ketoreductase Kred112, reduction, encapsulation, nanoreactor, amphiphilic biopolymer

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Εξεταστική Επιτροπή ……..……..…….…I

Ευχαριστίες……..……..……..……..……..…….……II

Βιογραφικό Σημείωμα ……..……..……IV

Curririculum Vitae ……..……..…….……..VII

Περίληψη ……..……..……X

Περιεχόμενα

Abstract ……..…….……XII

Συντομογραφίες ……..……..……..…XV

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. CD-C_3N_4 ΩΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΥ

1.1 Εισαγωγή……02

1.1.1. Σκοπός αυτής της εργασίας……02

1.1.2. Φωτοοξειδώσεις παρουσία O_2……02

1.1.3. Το οξυγόνο απλής κατάστασης $^1O_2$……...06

1.1.4. Αντιδράσεις $^1O_2$ – Τύπου ΙΙ Φωτοοξειδώσεις……...10

1.1.5. Φωτοκαταλύτης CD-C_3N_4……..……....14

1.2 Συζήτηση και Αποτελέσματα.....17

1.2.1. Παρασκευή του καταλύτη CD-C_3N_4……..17

1.2.2. Φωτοευαισθητοποιούμενη παραγωγή του $^1O_2$ από CD-C_3N_4……..17

1.2.3. Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου από CD-C_3N_4…….....23

1.2.4. Επαναχρησιμοποίηση του CD-C_3N_4…….……30

1.3. Συμπεράσματα …….....31

1.4. Πειραματικό Μέρος…….....32

1.5. Παράρτημα Α……..……..…….....39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΝΑΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

2.1 Εισαγωγή ……..58
2.1.1. Σκοπός της εργασίας……..……...…...…....58
2.1.2. Βιοκατάλυση…….……..58
2.1.3. Ένζυμα…….…….....60
2.1.4. Κετορεδουκτάσες…….…….…63
2.1.5. Ακινητοποιημένα Ένζυμα…….…...66
2.1.6. Ενθυλάκωση Ενζύμων ……68
2.2. Συζήτηση και Αποτελέσματα …….....70
2.2.1. 2.2.1. Κλασική ενζυμική αναγωγή με NADPH-εξαρτώμενη κετορεδουκτάση …….……..73
2.2.2. Σύνθεση Αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυστυρενίου – Σχηματισμός Νανοαντιδραστήρα …….....74
2.2.3. Κατάλυση με τη Χρήση του Ενθυλακωμένου Ενζύμου….…....77
2.3. Συμπεράσματα……82
2.4 Πειραματικό Μέρος……83
2.5 Παράρτημα Β……..87

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……93

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CD-C_3N_4: Carbon-nanodot-Doped Graphitic Carbon Nitride

ISC: Intersystem Crossing, Διασυστημική Διασταύρωση

SENS or Sens: Sensitizer/Photosensitizer, Φωτοευαισθητοποιητής

HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital

LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital

$^1O_2$: Sinlget Oxygen, Οξυγόνο Απλής Κατάστασης

TLC: Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

NMR: Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

GC: Gas Chromatography, Αέρια Χρωματογραφία

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

GDH: Glucose Dehydrogenase, Αφυδρογονάση της Γλυκόζης

Kred112: Ketoreductase 112, Κετορεδουκτάση 112

NADPH: Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Ανηγμένο Νικοτιναμίδιο Αδένινο Φωσφορικό Δινουκλεοτίδιο

MWCO: Molecular Weight Cut Off

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

CD-C_3N_4 ΩΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΟΥ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. Σκοπός αυτής της εργασίας

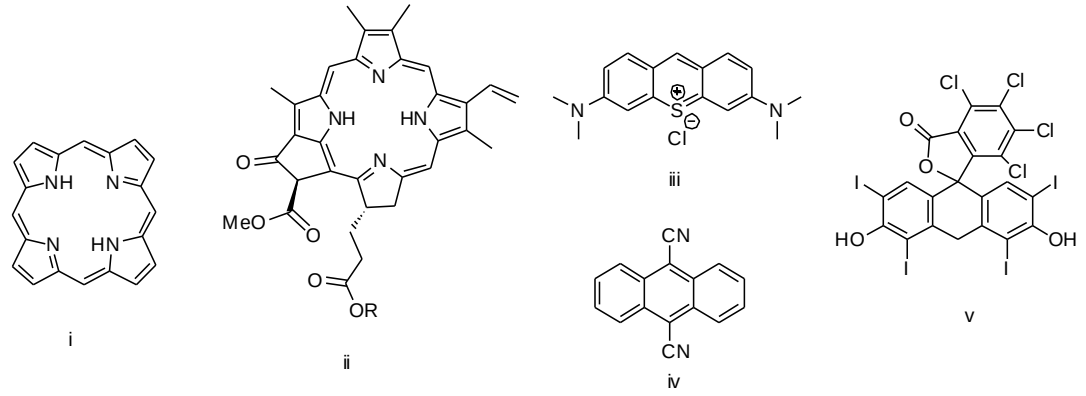
Ο σκοπός της εργασίας στο παρόν κεφάλαιο είναι η μελέτη των φωτοκαταλυτικών οξειδώσεων του εμπλουτισμένου με νανοσωματίδια άνθρακα γραφιτικού νιτριδίου του άνθρακα (CD-C_3N_4) παρουσία μοριακού οξυγόνου ($^3O_2$) και ορατού φωτός σε διαλύματα οργανικών υποστρωμάτων.

1.1.2. Φωτοοξειδώσεις παρουσία O_2

Η αξιοποίηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, από ραδιοκύματα έως ακτίνες-Χ, έχει συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην τεχνολογική πρόοδο. Η αφθονότερη μορφή αυτής της ενέργειας, το ορατό φως, αξιοποιείται καθημερινά, όχι μόνο σε τεχνολογικό επίπεδο, αλλά κυρίως στην ύπαρξη ζωής. Εκτός από in vivo μεταχείρισή του, έχει παίξει σημαντικό ρόλο και στην ανάπτυξη στις εφαρμογές της σύγχρονης χημείας.

Οι οξειδώσεις οργανικών υποστρωμάτων με ατμοσφαιρικό οξυγόνο παρουσία ορατού φωτός, αποτελούν έναν φθηνό, γρήγορο και «πράσινο» τρόπο με τον οποίο μπορούν να παρασκευαστούν οξυγονωμένα οργανικά μόρια που εν δυνάμει είναι φάρμακα ή/και φυσικά προϊόντα.[1] Τέτοιου τύπου αντιδράσεις άρχισαν να μελετώνται πιο προσεκτικά τη δεκαετία του 1930, με τη βοήθεια φυσικών οργανικών χρωστικών (Kautsky, Bruijin 1931),[2] (Gaffron 1935).[3] Μετά από πολλές μελέτες έγινε αντιληπτό ότι, εκτός από τις ενώσεις που αυτοοξειδώνονται με την απορρόφηση φωτός, η αξιοποίηση της ενέργειας του φωτός μπορούσε να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικότερα με την βοήθεια ενώσεων, γνωστών σήμερα ως φωτοευαισθητοποιητές. Οι φωτοευαισθητοποιητές (photosensitizers) έχουν την ικανότητα να απορροφούν στο ορατό (ή και στο υπεριώδες) και να μεταβιβάζουν την ενέργεια του φωτός προς το οξυγόνο ή/και προς το υπόστρωμα, με τέτοιο τρόπο, ώστε να πραγματοποιείται αντίδραση οξείδωσης. Τέτοιες ενώσεις είναι κάποιες χρωστικές, όπως η χλωροφύλλη για την φωτοσύνθεση, οι πορφυρίνες και άλλες οργανικές ενώσεις που συνήθως περιέχουν εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα (Σχήμα 1.1). Τα εκτεταμένα απεντοπισμένα π-συστήματα μειώνουν την ενέργεια των HOMO τροχιακών (highest occupied molecular orbitals) του μορίου και έτσι η

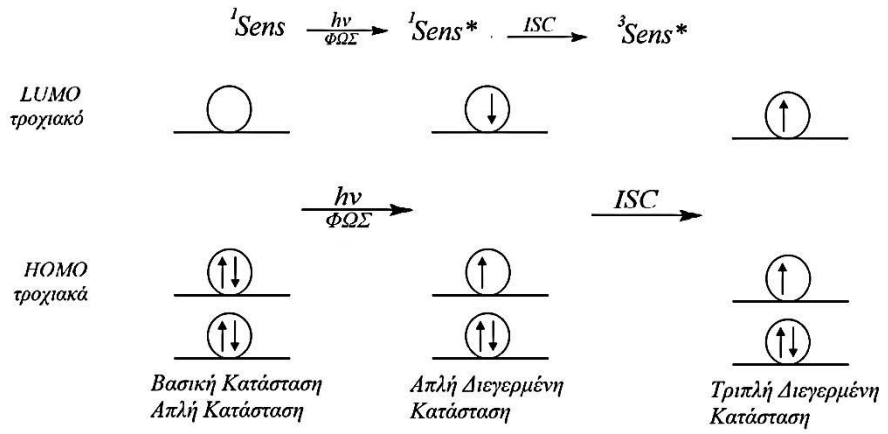
απορρόφηση φωτός οδηγεί τις ενώσεις αυτές σε μια διεγερμένη κατάσταση, μια κατάσταση αυξημένης ενέργειας.



Σχήμα 1.1 Γνωστοί φωτοευσθητοποιητές: i) η βασική δομή μιας πορφυρίνης, ii) η βασική δομή μιας χλωροφύλλης, iii) χρωστική, μπλε του μεθυλενίου, iv) 9,10-Δικυανοανθρακένιο v) χρωστική, ερυθρό της Βεγγάλης.

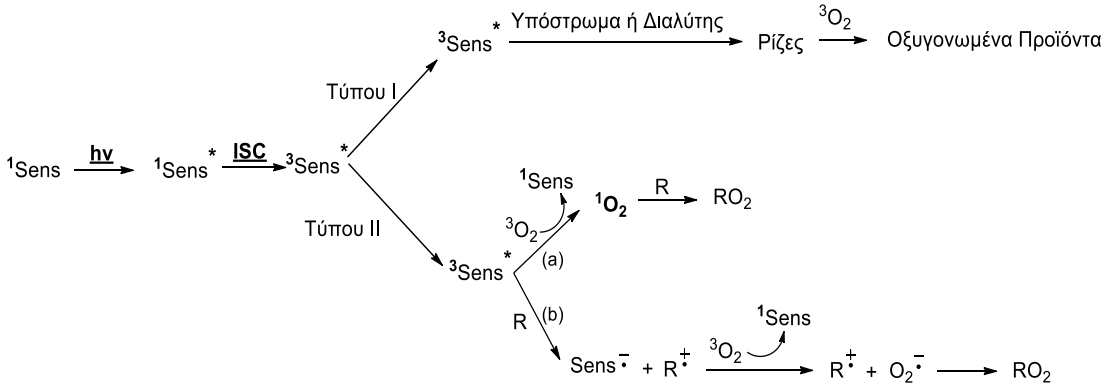
Υπό κανονικές συνθήκες ένας φωτοευαισθητοποιητής, από ενεργειακή άποψη, βρίσκεται στη βασική του κατάσταση, σε μια απλή κατάσταση (^{1}Sens) αφού η πολλαπλότητα spin είναι S=1. Η απορρόφηση φωτός προκαλεί την μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από την HOMO στη LUMO (lowest unoccupied molecular orbital). Όσο πιο μικρή είναι η διαφορά μεταξύ HOMO και LUMO τόσο πιο εύκολα γίνεται αυτή η μεταβολή. Το spin του ηλεκτρονίου δεν μεταβάλλεται, όπως συμβαίνει συνήθως σε εκτεταμένα π-συζυγιακά συστήματα, επομένως ο φωτοευαισθητοποιητής μεταβαίνει σε μια διεγερμένη απλή κατάσταση (^{1}Sens*) (Σχήμα 1.2). Αυτή η κατάσταση έχει μικρό χρόνο ζωής. Το σύστημα μεταβαίνει αυθόρμητα σε μια διεγερμένη κατάσταση, χαμηλότερης ενέργειας, μέσω μιας μεταβολής του spin του ηλεκτρονίου που βρίσκεται στη LUMO, χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, γνωστή ως διασυστημική διασταύρωση (intersystem crossing, ISC). Αυτό οδηγεί το μόριο σε μια τριπλή διεγερμένη κατάσταση (^{3}Sens*), αφού η πολλαπλότητα αλλάζει σε S=3, η οποία είναι και η υπεύθυνη για τις φωτοοξειδώσεις (Σχήμα 1.2). Ο άμεσος σχηματισμός της τριπλής διεγερμένης από την βασική κατάσταση είναι λιγότερο πιθανός, αφού μια τέτοιου τύπου διέγερση απαιτεί μια κβαντομηχανικά απαγορευμένη μετάβαση του spin.

.



Σχήμα 1.2 Παράδειγμα ηλεκτρονιακών μεταβάσεων σε π μοριακά τροχιακά ενός φωτοευαισθητοποιητή.

Το 1968 οι Gollnick και Schenck πρότειναν μηχανισμούς για τις φωτοοξειδώσεις παρουσία ενός φωτοευαισθητοποιητή και τις κατηγοριοποίησαν σε Τύπο I και Τύπο II.[4, 5]



Σχήμα 1.3 Αναπαράσταση φωτοοευαισθητοποιούμενων οξειδώσεων.[5]

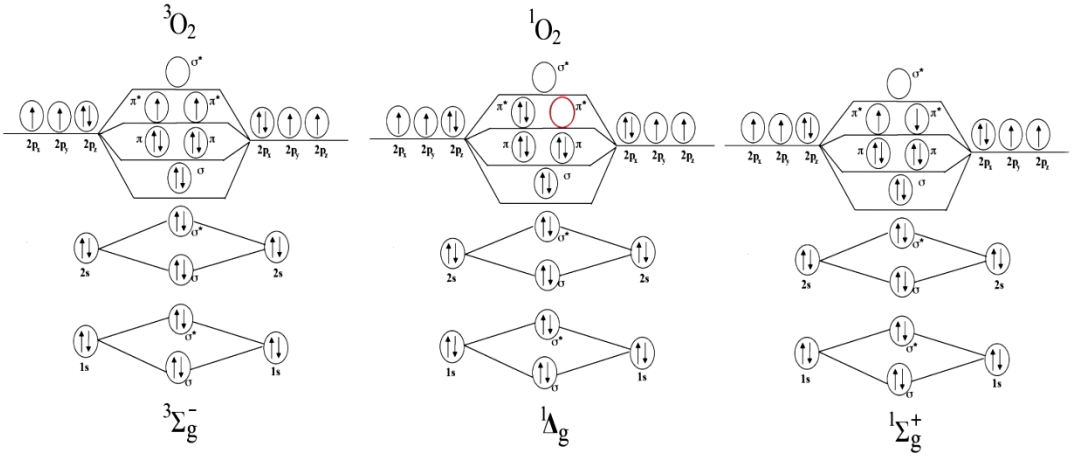
Ο Τύπου I μηχανισμός περιλαμβάνει αντιδράσεις ριζών. Σε αυτή την κατηγορία πραγματοποιείται και η απόσπαση υδρογόνου (hydrogen abstraction), όπου ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής αποσπά μια ρίζα υδρογόνου από το υπόστρωμα και παρουσία οξυγόνου, μέσω μηχανισμού ριζών, σχηματίζονται προϊόντα οξείδωσης. Ο Τύπου II μηχανισμός μπορεί να ακολουθήσει δυο μονοπάτια. Στη μια περίπτωση (Σχήμα 1.3 (b)) γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίου από το υπόστρωμα προς τον διεγερμένο ευαισθητοποιητή και σχηματίζεται μια κατιονική ρίζα (radical cation), ενώ ο φωτοευαισθητοποιητής ως ανιονική ρίζα

(radical anion) αντιδρά με το οξυγόνο, και επιστέφει στη βασική του κατάσταση. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδιακού ανιόντος (superoxide anion) που αντιδρά με τη σειρά του με την κατιονική ρίζα στο υπόστρωμα, δίνοντας οξυγονωμένες ενώσεις. Τύπου ΙΙ μηχανισμός επίσης πραγματοποιείται όταν το οξυγόνο λαμβάνει, μετά από σύγκρουση, την ενέργεια που περιέχεται στην διεγερμένη κατάσταση του ευαισθητοποιητή και τον αποδιεγείρει. Στη φάση αυτή το ίδιο το οξυγόνο διεγείρεται και μεταβαίνει σε οξυγόνο απλής κατάστασης (singlet oxygen) (Σχήμα 1.3 (a)), μια δραστική μορφή του μοριακού οξυγόνου, ικανή να δώσει αντιδράσεις οξείδωσης, όπως αποδείχθηκε από τον Foote το 1964.[6] Το πιο μονοπάτι θα επικρατήσει τελικά (Τύπος Ι ή Τύπος ΙΙ) εξαρτάται κυρίως από την ταυτότητα του φωτοευαισθητοποιητή και το υπόστρωμα, αλλά και από άλλους παράγοντες που επηρεάζουν μια αντίδραση, όπως η πολικότητα του διαλύτη, η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις. Στην πραγματικότητα, υπάρχει ανταγωνισμός των δύο αυτών μηχανισμών και το ποιος από τους δυο θα επικρατήσει εξαρτάται από τις συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Ο συνδυασμός φωτός, ευαισθητοποιητή και οξυγόνου καλείται φωτοδυναμικό φαινόμενο (photodynamic effect) και έχει τοξική δράση στα κύτταρα, ενώ καταστρέφει τα υλικά και τα τρόφιμα. Στο φαινόμενο αυτό βασίζεται η φωτοδυναμική θεραπεία (φωτοχημειοθεραπεία) η οποία εφαρμόζεται στην στοχευμένη νέκρωση των καρκινικών κυττάρων. Το είδος του φωτοευαισθητοποιητή παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη θεραπεία.[7]

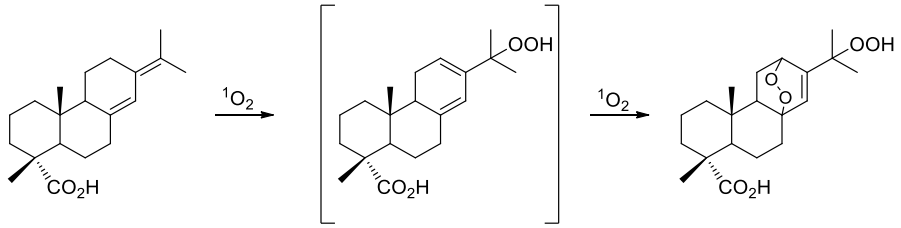
1.1.3. Το οξυγόνο απλής κατάστασης $^1O_2$

Οι επιστημονικές μελέτες επάνω στο μοριακό οξυγόνο τις δεκαετίες 1920 και 1930 απέδειξαν ότι το μόριο αυτό έχει ως βασική κατάσταση την τριπλή (triplet, $^3O_2$),[8] αφού διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σθένους σε κάθε ένα από τα δύο αντιδεσμικά τροχιακά του, με spin παράλληλο, ιδιότητα που του αποδίδει παραμαγνητική φύση (Σχήμα 1.4). Η απορρόφηση κατάλληλης μορφής και μεγέθους ενέργειας οδηγεί στη μετάβαση ενός εκ των δύο ηλεκτρονίων στο αντιδεσμικό τροχιακό του άλλου, σχηματίζοντας ένα ζεύγος ηλεκτρονίων (με αντίθετο spin) σε ένα αντιδεσμικό τροχιακό, αφήνοντας το άλλο τροχιακό κενό. Αυτή η κατάσταση απέχει ενεργειακά 22.5 kcal (94.1 kJ) από την βασική και είναι εκείνη στην οποία αναφερόμαστε ως απλή κατάσταση του οξυγόνου (singlet oxygen) και συμβολίζεται ως $^1O_2$ ή φασματοσκοπικά $^1\Delta_g$. Περισσότερη ενέργεια, για την ακρίβεια 37.5 kcal (176,9 kJ) επιπλέον από τη βασική, οδηγεί στην $^1\Sigma_g^+$ μια διεγερμένη κατάσταση παρόμοια με τη βασική, με ειδοποιό διαφορά το αντίθετο spin των ηλεκτρονίων που καταλαμβάνουν τα δυο εκφυλισμένα αντιδεσμικά τροχιακά. Η τελευταία αυτή κατάσταση θεωρείται εξίσου απλή, όμως έχει λιγότερο χρόνο ζωής από την $^1\Delta_g$, ενώ η κατάληψη του κενού τροχιακού της $^1\Delta_g$ από ένα ηλεκτρόνιο αφαιρεί την δραστικότητα, στην οποία αναφερόμαστε, από το μόριο (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4 Διάγραμμα Μοριακών Τροχιακών όπου απεικονίζονται η βασική τριπλή κατάσταση του οξυγόνου και οι δύο απλές διεγερμένες καταστάσεις.

Ουσιαστικά, η δραστικότητα του $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) οφείλεται στο κενό αυτό αντιδεσμικό τροχιακό, το οποίο είναι διαθέσιμο πλέον για να καταληφθεί από ηλεκτρόνια μιας προς οξείδωση ηλεκτρονιακά πλούσιας ένωσης. Τέτοιου είδους ενώσεις είναι για παράδειγμα οργανικά υποστρώματα με ηλεκτρονιακά πλούσιους διπλούς δεσμούς, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο παράδειγμα του Σχήματος 1.5.



Σχήμα 1.5 Οξείδωση του νεοαβιετικού οξέος με οξυγόνο απλής κατάστασης.Τύπου ΙΙ φωτοοξείδωση παρουσία φωτοευαισθητοποιητή.[4]

Η δημιουργία του οξυγόνου απλής κατάστασης πραγματοποιείται μέσω της διέγερσης του οξυγόνου τριπλής κατάστασης. Αυτό, μπορεί να γίνει χημικά, όπως με την αντίδραση του υποχλωριώδους νατρίου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Σχήμα 1.6), αλλά κυρίως φωτοχημικά.[9]

$$NaOCl + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + NaCl + H_2O$$

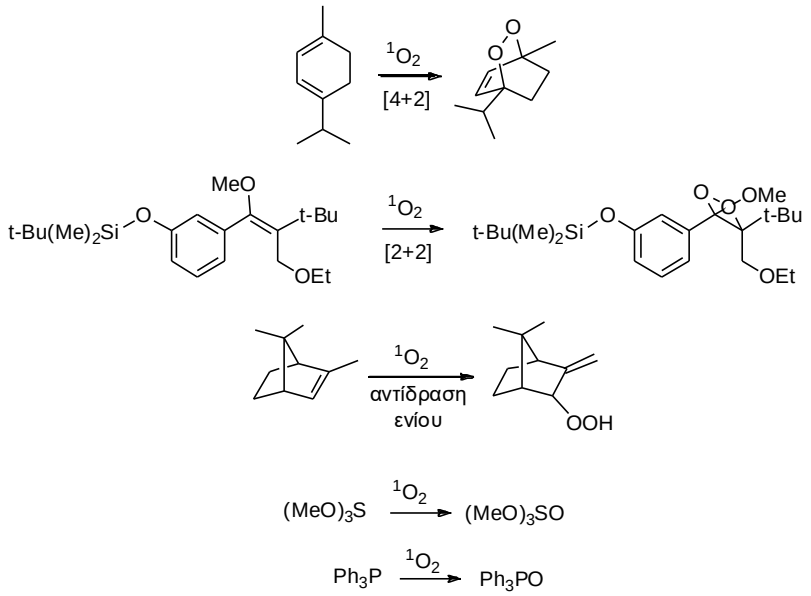
$$(RO)_3PO_3 \longrightarrow (RO)_3PO + {}^1O_2$$

Σχήμα 1.6 Χημική παραγωγή οξυγόνου απλής κατάστασης.[9,10]

Η φωτοχημική παραγωγή του $^1O_2$ έχει αποσαφηνιστεί (Foote 1965). Όπως αναφέρθηκε και στη προηγούμενη ενότητα, στις Τύπου ΙΙ φωτοοξειδώσεις, ένας φωτοευαισθητοποιητής είναι ικανός να δώσει προϊόντα οξείδωσης υπό ορατό φως και ατμόσφαιρα οξυγόνου με μόνο δραστικό ενδιάμεσο το οξυγόνο απλής κατάστασης, χωρίς το σχηματισμό ενδιαμέσων ευαισθητοποιητή-οξυγόνου και χωρίς ο ευαισθητοποιητής να επηρεάζει στερικά το οξυγόνο.[11]

Παρότι το ίδιο το $^1O_2$ δεν είναι μορφή που φέρει δραστική ρίζα (free radical), εντούτοις εντάσσεται στην οικογένεια των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου, (Reactive Oxygen Species ή ROS), εξαιτίας αυτής της ιδιότητας που αναφέρθηκε παραπάνω. Η δραστικότητα που παρουσιάζει το $^1O_2$ με τις ολεφίνες έχει αξιοποιηθεί σήμερα στον τομέα της οργανικής σύνθεσης,[12] αφού σε ένα απλό

στάδιο μπορούν να σχηματιστούν οξυγονωμένες ενώσεις. Υπό κατάλληλες συνθήκες, το $^1O_2$ έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σαν αντιδραστήριο για ποικίλου τύπου αντιδράσεις, όπως αντίδραση ενίου (ene reaction),[13] [4+2] κυκλοπροσθήκη,[14] [2+2] κυκλοπροσθήκη,[15] αντιδράσεις με σουλφίδια[16] αλλά και με ενώσεις τρισθενούς φωσφόρου (Σχήμα 1.7). Οι πιο αξιοσημείωτες και χρησιμότερες αντιδράσεις από αυτές είναι η [4+2] κυκλοπροσθήκη αλλά και η αντίδραση ενίου.



Σχήμα 1.7 Παραδείγματα οξειδώσεων με οξυγόνο απλής κατάστασης.[17]

Το οξυγόνο απλής κατάστασης μπορεί να αποδιεγερθεί και να επιστρέψει στη βασική του κατάσταση με τέτοιου είδους αντιδράσεις (χημική αποδιέγερση). Εκτός από τον τρόπο αυτό, το $^1O_2$ μπορεί να επιστρέψει στην βασική του κατάσταση με φυσική αποδιέγερση, όπως με την εκπομπή ακτινοβολίας, ή μέσω ενός μορίου αποσβέστη (quencher) χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

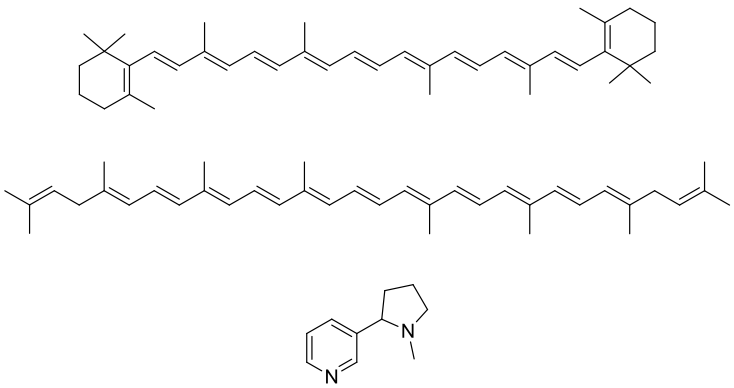
Οι αποσβέστες του $^1O_2$ είναι συνήθως αλκένια με εκτεταμένα συζυγιακά συστήματα ή τριτοταγείς αμίνες. Τα π-συστήματα μπορούν να απορροφήσουν την υπερβάλλουσα ενέργεια, όπως σημειώθηκε προηγουμένως, ενώ οι τριτοταγείς αμίνες, έχουν χαμηλές ενέργειες ιοντισμού και σχηματίζουν ενδιάμεσα σύμπλοκα μεταφοράς φορτίου. Το β-καροτένιο, το λυκοπένιο[18] και άλλα καρετονοειδή φυσικά προϊόντα με έντονα χρώματα προστατεύουν τους οργανισμούς από τα δραστικά είδη οξυγόνου και αποτελούν εξαιρετικούς αποσβέστες $^1O_2$ χωρίς να αντιδρούν με αυτό (Σχήμα 1.8). Στην πράξη, ένα καλός

αποσβέστης αποδιεγείρει το $^1O_2$ σε χρόνο μικρότερο από τον χρόνο ζωής του στον κάθε διαλύτη, και χωρίς να αντιδρά με αυτό.

i

ii

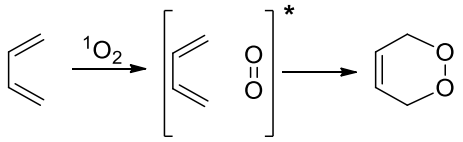
iii



Σχήμα 1.8 Φυσικοί αποσβέστες: i) β-καροτένιο ii) all-trans-λυκοπένιο iii) νικοτίνη (τριτοταγής αμίνη).

1.1.4. Αντιδράσεις $^1O_2$ – Τύπου ΙΙ Φωτοοξειδώσεις

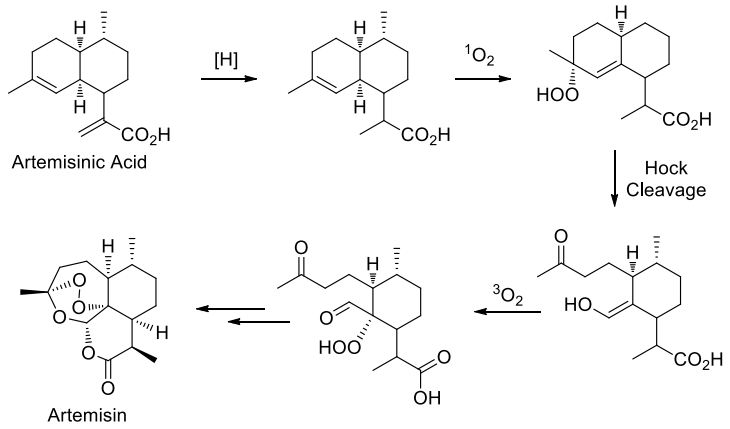
Η αντίδραση τύπου [4+2] είναι ανάλογη με την κυκλοπροσθήκη Diels-Alder, με το $^1O_2$ να έχει το ρόλο του διενόφιλου, ενώ το προϊόν που σχηματίζεται είναι ένα ενδοϋπεροξείδιο. Αρχικά είχαν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για αυτή την αντίδραση, με τους σύγχρονους μηχανισμούς[19] να αποτελούν τους πιο δημοφιλείς. Η επικρατέστερη απάντηση δόθηκε τελικά από τον Clennan, ο οποίος μελέτησε την κινητική της κυκλοπροσθήκης με υποκατεστημένα φουράνια[20] και πρότεινε έναν αντιστρεπτό μηχανισμό με ένα ενεργοποιημένο σύμπλοκο σαν ενδιάμεσο (Σχήμα 1.9).[21] Βέβαια, ο μηχανισμός μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να είναι σταδιακός με διπολικό ή δίριζο ενδιάμεσο,[22] κάτι που εξαρτάται κυρίως από το υπόστρωμα αλλά και τον διαλύτη.



Σχήμα 1.9 Αντιστρεπτός μηχανισμός ενεργοποιημένου συμπλόκου [4+2] κυκλοπροσθήκης με το $^1O_2$

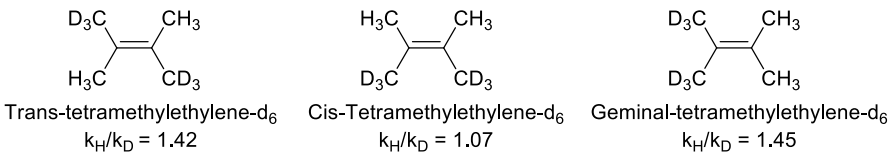
Στην περίπτωση της [2+2] κυκλοπροσθήκης δεν υπάρχουν σαφείς απαντήσεις σε ότι αφορά το μηχανισμό. Οι περισσότερες υπολογιστικές, αλλά κυρίως πειραματικές μελέτες, κλίνουν όμως, σε σταδιακό διπολικό ή ριζικό μηχανισμό, αφού παρατηρήθηκε από τα προϊόντα της αντίδρασης ότι ο διαλύτης επιδρά σημαντικά ενώ παράλληλα παρουσιάζονται συντακτικοί και στερεοχημικοί ισομερισμοί .[23,24,25,26]

Η αντίδραση ενίου (ene reaction) είναι από τις πιο μελετημένες αντιδράσεις του $^1O_2$ εξαιτίας των πολλών χρήσιμων εφαρμογών που έχουν συνθετικά. Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης με υποστρώματα που περιέχουν διπλούς δεσμούς είναι τα αλλυλικά υπεροξείδια, ενώ με απλή και γρήγορη αναγωγή αυτών με τριφαίνυλο φωσφίνη κ.α. αποκτούνται οι αντίστοιχες αλλυλικές αλκοόλες. Στεροειδή, τερπενοειδή και άλλα φυσικά προϊόντα περιέχουν αλλυλικά υπεροξείδια ή αλλυλικές αλκοόλες,[27] αλλά και ενδιάμεσα στάδια που περιέχουν αλλυλικά υπεροξείδια αποτελούν ενώσεις «κλειδιά» για τη σύνθεση τέτοιων οργανικών μορίων.



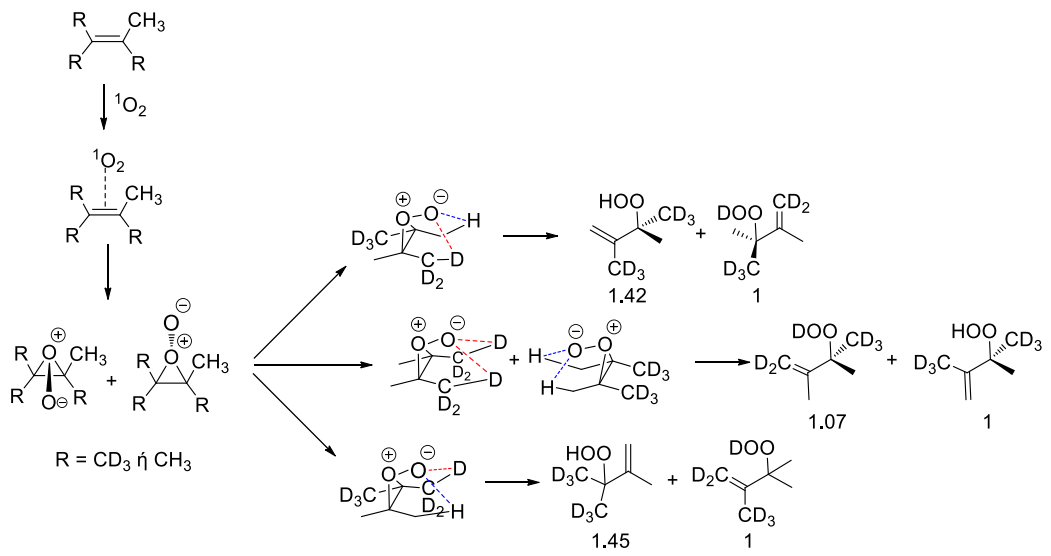
Σχήμα 1.10 Ημισυνθετική πορεία της αρτεμισίνης με χρήση $^1O_2$.[28]

Όπως και στις προηγούμενες δύο περιπτώσεις, υπήρξε παρόμοια σύγχυση για τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση ενίου. Οι υποθέσεις για σύγχρονο μηχανισμό και διπολικό ή δίριζο μηχανισμό διαλευκάνθηκαν το 1979 όταν πραγματοποιήθηκαν πρωτοταγή κινητικά ισοτοπικά φαινόμενα στο τετραμέθυλο αιθυλένιο-d_6 (TME-d_6) από την ομάδα του Stephenson.[13] Το gem-TME-d_6 και το trans-TME-d_6 έδωσαν ένα ισοτοπικό φαινόμενο k_H/k_D λίγο μεγαλύτερο από 1.4 ενώ το cis-TME-d_6 παρουσίασε αμελητέο ισοτοπικό φαινόμενο. Σε περίπτωση λοιπόν διπολικού ή δίριζου μηχανισμού τα cis και trans ισομερή του TME-d_6 θα έπρεπε να δώσουν ίδιο ισοτοπικό φαινόμενο, ενώ σε έναν σύγχρονο μηχανισμό και τα τρία ισομερή του TME-d_6 θα έδιναν ίδιο ισοτοπικό φαινόμενο.

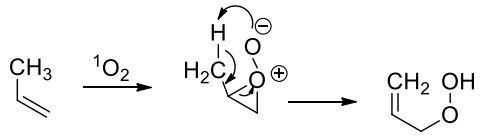


Σχήμα 1.11 Κινητικά Ισοτοπικά Φαινόμενα στο TME-d_6.

Τα αποτελέσματα αυτά, καθώς και περισσότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αργότερα σε επιπλέον υποστρώματα[13,29,30,31] απέδειξαν ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης ενίου περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο στάδιο, με σχηματισμού ενός υπερεποξειδίου και είναι μη αντιστρεπτός (Σχήμα 1.12).



Σχήμα 1.12 Το ενδιάμεσο της αντίδρασης ενίου που καθορίζει και το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο.[32]



Σχήμα 1.13 Γενικός μηχανισμός αντίδρασης ενίου

Ένας τέτοιος μηχανισμός, όπως παρατηρείται, είναι δυνατόν να παρουσιάσει τοποεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα ανάλογα με το εκάστοτε υπόστρωμα. Η δομή του εκάστοτε υποστρώματος είναι δυνατόν να επηρεάσει την μεταβατική κατάσταση προς το σχηματισμό του υπερεποξειδίου, με αποτέλεσμα την κινητική διαφοροποίηση και το σχηματισμό διαφορετικών αλλυλικών υπεροξειδιακών προϊόντων σε διαφορετική αναλογία, όπως στο παράδειγμα με το TME-d_6.

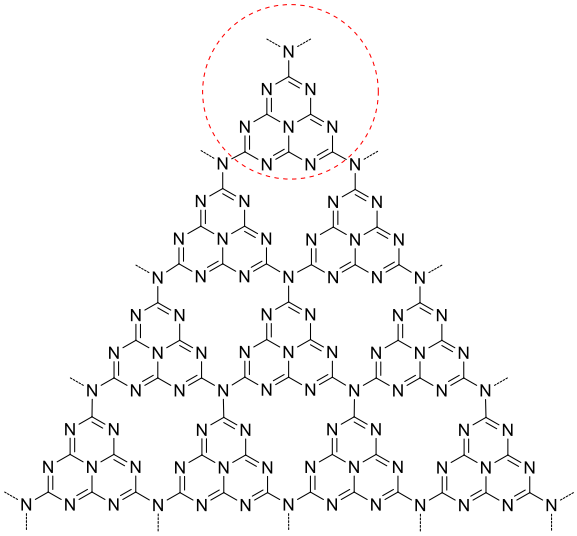
Στην τοποεκλεκτικότητα μπορεί να παρατηρηθούν cis-φαινόμενα (cis-effects) όπου η πιο υποκατεστημένη πλευρά είναι και η πιο δραστική πλευρά του διπλού δεσμού, λόγω της σταθεροποίησης της μεταβατικής κατάστασης από δύο αλλυλικά υδρογόνα· παρατηρούνται όμως και anti cis-φαινόμενα (anti cis-effects), όπου συμβαίνει το αντίθετο εξαιτίας μεγάλων ογκωδών ομάδων που δρουν στερεοχημικά στην μεταβατική κατάσταση. Ο στερεοχημικός παράγοντας επηρεάζει περισσότερο τον σχηματισμό προϊόντων όταν στο σκελετό του μορίου υπάρχουν μεγάλες ογκώδεις ομάδες (large group non-bonded effect). Επιρροή

μπορεί να εμφανίσουν και οι ηλεκτρονιακοί παράγοντες (stereoelectronic effect), όπως απώσεις και έλξεις λόγω του αρνητικά φορτισμένου οξυγόνου του υπερεποξειδίου. Αυτό συμβαίνει συνήθως με ηλεκτρονιοδεκτικές ομάδες που βρίσκονται σε αλλυλική η βινυλική θέση. Ακόμη, ο διαλύτης μπορεί να επιδράσει στην τοποεκλεκτικότητα, ανάλογα με την πολικότητά του, κυρίως λόγω μεγάλων διαφοροποιήσεων στις διπολικές ροπές των μεταβατικών καταστάσεων.[31,32]

Η στερεοεκλεκτικότητα μπορεί να επηρεαστεί, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, από στερεοχημικούς ή ηλεκτρονιακούς παράγοντες, ή και τα δύο ταυτόχρονα ανάλογα με την σταθερότητα της μεταβατικής κατάστασης.[32,33]

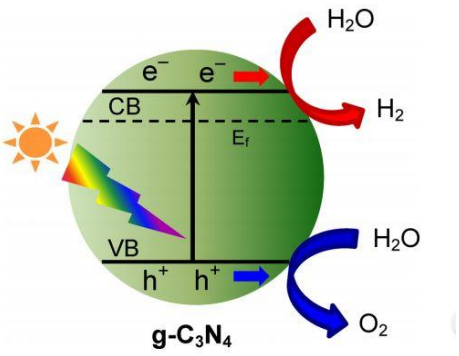
1.1.5. Φωτοκαταλύτης CD-C_3N_4

Το γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα, graphitic carbon nitride (g-C_3N_4), βρίσκεται τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, λόγω των χρήσιμων καταλυτικών ιδιότητων που παρουσιάζει.[34,35] Είναι ένα πολυμερικό υλικό αποτελούμενο από τα στοιχεία του άνθρακα και του αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένας οργανικός ημιαγωγός κατασκευασμένος μέσω μονάδων tri-s-τριαζίνης με επίπεδη δομή, παρόμοια με εκείνη του γραφίτη (Σχήμα 1.14). Παρόλο που η δομή του δεν απαρτίζεται από στοιχεία μετάλλων, το g-C_3N_4 εμφανίζει έναν ετερογενή φωτοκαταλυτικό και μη τοξικό χαρακτήρα, με ευοίωνες φωτοχημικές ιδιότητες,[36,39] ενώ παράλληλα παρουσιάζει χημική και θερμική σταθερότητα.



Σχήμα 1.14 Πολυμερικό g-C_3N_4. Η δομή εντός του κύκλου αντιπροσωπεύει μια μονάδα tri-s-τριαζίνη.

Από τη στιγμή της σύνθεσης αυτού του υλικού σε μεγάλες ποσότητες, δημοσιεύτηκε[37] ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών σχετικά με τις φωτοχημικές του ιδιότητες και την φωτοκαταλυτική του δράση. Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, το g-C_3N_4 έχει την δυνατότητα να διασπά το νερό για την παραγωγή υδρογόνου, υπό ορατό φως, με απόδοση 26,5%,[38] ενώ εσχάτως αποδείχθηκε πως το εμπλουτισμένο g-C_3N_4 με νανοσωματίδια άνθρακα (γνωστό ως CD-C_3N_4), πραγματοποίησε τον διαχωρισμό του νερού μέσω ενός μηχανισμού δύο ηλεκτρονίων.[39]

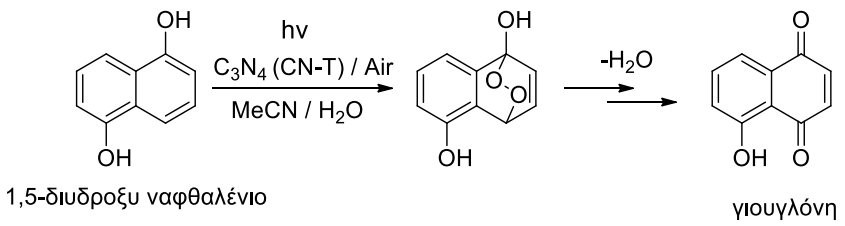


Σχήμα 1.15 Σχηματική αναπαράσταση φωτοκαταλυτικού διαχωρισμού νερού υπό ακτινοβόληση με ορατό φως.[35]

Οι εγγενείς του αυτές ιδιότητες περιλαμβάνουν κι ένα σχετικά ιδανικό ενεργειακό χάσμα για την απορρόφηση του ορατού φωτός, ώθησαν πολλές ερευνητικές ομάδες να βελτιώσουν τη φωτοκαταλυτική του δραστηριότητα με την προσθήκη προσμίξεων στην επιφάνειά του, όπως για παράδειγμα με προσμίξεις μετάλλων[40,41,42] ή προσμίξεις πολυμερικών στοιχείων άνθρακα και λοιπών.[43]

Παρότι οι περισσότερες μελέτες αφορούν τη φωτοχημική δραστικότητα και την ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων του g-C_3N_4, υπάρχουν περιορισμένα παραδείγματα εφαρμογών του σε οργανικές αντιδράσεις, όπως η φωτο-ακεταλοποίηση αλδεϋδών και κετονών,[44] αντιδράσεις Friedel-Crafts,[45] οξείδωση αλκοολών,[46] οξείδωση σουλφιδίων προς σουλφοξείδια αλλά και οξειδώσεις σε δεσμούς C-H του βενζολικού δακτυλίου,[47] οι οποίες πραγματοποιούνται με το ίδιο το g-C_3N_4 ή πιο συνηθισμένα με τροποποιημένο g-C_3N_4.

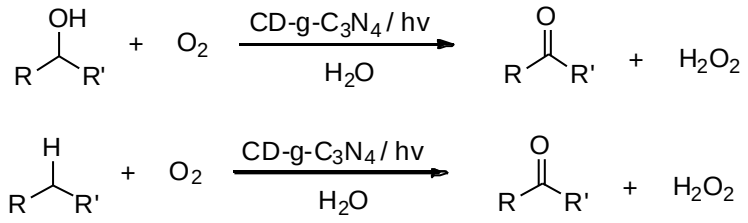
Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πρόσφατα ορισμένα παραδείγματα φωτοοξειδώσεων με τον καταλύτη αυτό καθώς και φυσικοχημικές μελέτες παραγωγής οξυγόνου απλής κατάστασης, σε τροποποιημένο καταλύτη g-C_3N_4, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.16.[48]



Σχήμα 1.16 Φωτοοξείδωση του 1,5-διυδροξυ ναφθαλενίου με $^1O_2$ μέσω CD-C_3N_4.[48]

Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική μας ομάδα σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του F. Hollmann στο Πανεπιστήμιο TU Delft έδειξαν ότι το απλό, μη μεταλλικό CD-C_3N_4 αποτελεί κατάλληλο φωτοκαταλύτη για οξείδωση πρωτοταγών και δευτεροταγών αλκοολών προς αλδεΰδες και κετόνες αντίστοιχα, υπό ορατό, ή ηλιακό φως και ατμόσφαιρα οξυγόνου, σε μίγμα ύδατος και αλκοόλης (Σχήμα 1.17). Υπό τις ίδιες συνθήκες ο CD-C_3N_4 αποδείχτηκε ότι καταλύει επίσης αποτελεσματικά τις απευθείας οξειδώσεις αλκανίων προς κετόνες ή αλδεΰδες. Ακόμη αποδείχθηκε ότι ο φωτοκαταλύτης είχε την δυνατότητα να επαναχρησιμοποιηθεί τουλάχιστον 5 φορές.[49]

Η μελέτη αυτή αποτελεί μια προσπάθεια σχεδιασμού μιας περιβαλλοντικά φιλικής διεργασίας οξείδωσης με χρήση του απλού αυτού καταλύτη.



Σχήμα 1.17 Φωτοκαταλυόμενες από το CD-C_3N_4 οξειδώσεις.[49]

Σε συνέχεια της πρόσφατης έρευνάς μας με τον καταλύτη CD-C_3N_4,[49] στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των φωτοκαταλυτικών οξειδώσεων του εμπλουτισμένου με νανοσωματίδια άνθρακα γραφιτικού νιτριδίου του άνθρακα (CD-C_3N_4) παρουσία μοριακού οξυγόνου ($^3O_2$) και ορατού φωτός σε διαλύματα ακόρεστων υδρογονανθράκων.

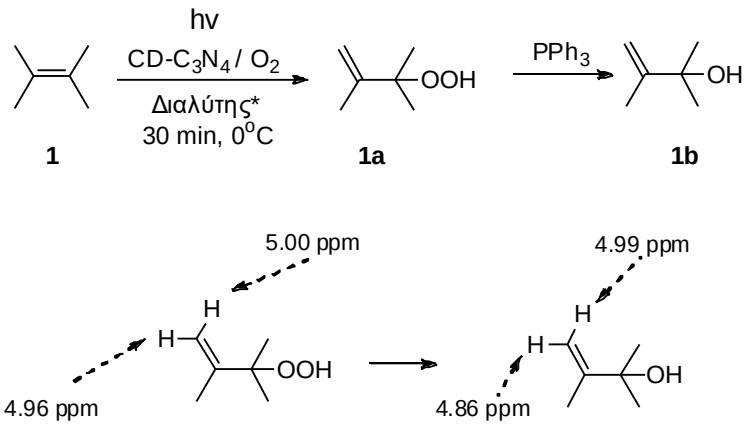
1.2. Συζήτηση και Αποτελέσματα

1.2.1 Παρασκευή του καταλύτη CD-C_3N_4

Ο φωτοκαταλύτης CD-C_3N_4 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα παρασκευάστηκε μέσω απλής διαπύρωσης της ουρίας στους 600 ^oC. Η προσθήκη των νανοσωματιδίων άνθρακα πραγματοποιήθηκε ύστερα από θερμική αποσύνθεση της σουκρόζης σε υδατικό αμμωνιακό διάλυμα και με την εναπόθεση του διαλύματος αυτού στη σκόνη ουρίας πριν την διαπύρωση του μίγματος. Η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός του φωτοκαταλύτη CD-C_3N_4 έλαβε χώρα στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου TU Delft, από την ομάδα του καθηγητή Frank Hollmann, με γνωστή διαδικασία από τη βιβλιογραφία.[49,50]

1.2.2. Φωτοευαισθητοποιούμενη παραγωγή του $^1O_2$ από CD-C_3N_4

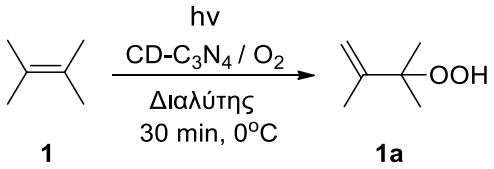
Αρχικά, έπρεπε να εξακριβωθεί εάν ο CD-C_3N_4 δρα σαν φωτοευαισθητοποιητής σε αντιδράσεις φωτοοξείδωσης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο τετραμέθυλο αιθυλένιο **1** (Σχήμα 1.18). Οι φωτοευαισθητοποιημένες οξειδώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλο δοκιμαστικό σωλήνα των 4 mL που περιείχε 0.09 M διάλυματος 2,3-διμεθυλοβουτ-2-ενίου (**1**) σε μια ποικιλία διαλυτών με 4 mg / mL του αδιάλυτου φωτοκαταλύτη CD-C_3N_4. Ενώ διοχετεύεται οξυγόνο στους 0°C, το διάλυμα ακτινοβολείται για περίοδο 30 λεπτών. Ένας λαμπτήρας 300 W xenon χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ορατού φωτός. Η αντίδραση φωτοοξείδωσης ακολουθήθηκε από GC και/ή ^{1}H-NMR ανάλυση μετά από διήθηση από celite. Η πρώτη αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Ο αρχικός έλεγχος έγινε με TLC όπου παρατηρήθηκε μέσα σε λίγα min ο σχηματισμός ενός προϊόντος. Όπως έδειξε στη συνέχεια η φασματοσκοπία ^{1}H-NMR, το προϊόν αυτό ήταν το αλλυλικό υπεροξείδιο **1a** με τα χαρακτηριστικά πρωτόνια του διπλού δεσμού να διακρίνονται κοντά στα 5 ppm ($CDCl_3$). Η αντίστοιχη αλκοόλη λαμβάνεται μετά από απλή αναγωγή με τριφαίνυλο φωσφίνη.



Σχήμα 1.18 Σχηματισμός αλλυλικού υπεροξειδίου μετά από φωτοοξείδωση με καταλύτη CD-C_3N_4 και η αντίστοιχη αλκοόλη μετά από αναγωγή με τριφαίνυλο φωσφίνη.[51]

Η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε επίσης με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (TPP) αλλά και με ερυθρό της Βεγγάλης (RB), ενώσεις που είναι γνωστοί φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι παράγουν $^1O_2$ και αντιδράσεις Τύπου ΙΙ. Το ίδιο προϊόν (**1b**) σχηματίστηκε και με τη χρήση των δύο αυτών τυπικών φωτοκαταλυτών.

Στο επόμενο βήμα, παρακολουθήθηκε ο σχηματισμός του υπεροξειδικού προϊόντος **1a** του τετραμέθυλο αιθυλενίου (**1**) σε 30 min φωτοοξείδωσης σε διαφορετικούς διαλύτες. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης σε 15 και 30 min. Η ανίχνευσή του **1a** έγινε με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) και με τη βοήθεια εσωτερικού προτύπου 2-μεθοξυαιθυλαιθέρα (diglyme).



Σχήμα 1.19 Φωτοοξείδωση του **1** με φωτοευαισθητοποιητή CD-C_3N_4.

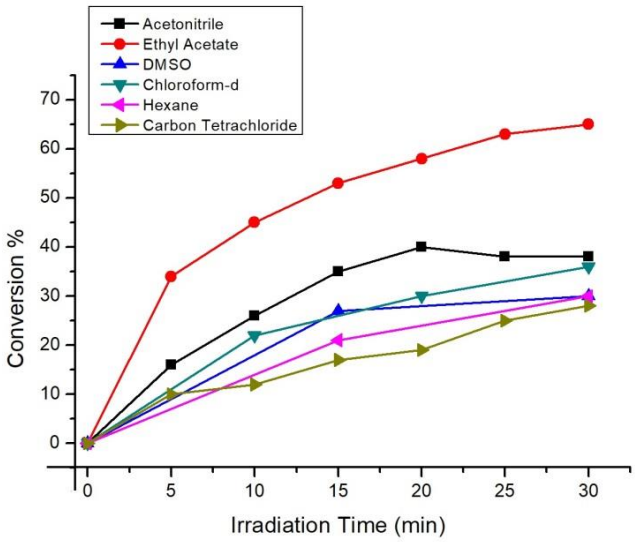
Πίνακας 1.1 Σχηματισμός του **1a** σε διαφορετικούς διαλύτες σε 2 χρόνους με χρήση CD-C_3N_4 ως φωτοκαταλύτη.

Διαλύτης	**1a**[α] % 15 min	**1a**[α] % 30 min
CH_3CN	35	38
EtOAc	53	65
DMSO	27[β]	30[β]
$CDCl_3$	26	36
C_6H_{14}	21	30
CCl_4	17	28

[α] Προσδιορίστηκε με GC ανάλυση παρουσία 10% diglyme
[β] Προσδιορίστηκε ως **1b** με GC ανάλυση παρουσία 10% diglyme

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα το ποσοστό σχηματισμού του **1a** είναι το μεγαλύτερο ενώ σε τετραχλωράνθρακα το μικρότερο. Η πολικότητα του διαλύτη φαίνεται να επηρεάζει την πορεία αυτής της αντίδρασης με τον ενδιάμεσης πολικότητας διαλύτη να δείχνει μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής.

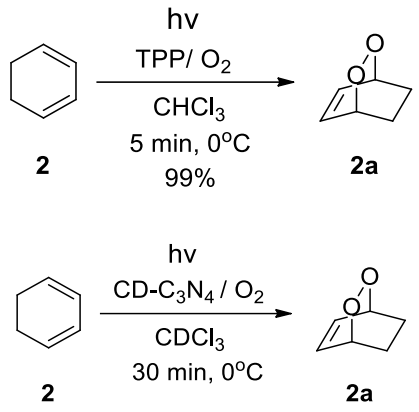
Η κινητική της παραπάνω φωτοοξείδωσης με τον CD-C_3N_4 εξετάστηκε στους παραπάνω διαλύτες με χρήση περισσότερων δειγμάτων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθήθηκε εύκολα με GC ανάλυση. Θεωρώντας ότι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η συγκέντρωση του οξυγόνου παραμένει σταθερή και ότι υπάρχει μια εξάρτηση πρώτης τάξης της ταχύτητας της αντίδρασης, μπορεί να εφαρμοστεί η ακόλουθη εξίσωση: $kt = -ln\ (1 - x)$. Όπου k, t και x είναι η σταθερά της ταχύτητας, ο χρόνος ακτινοβόλησης και τη μετατροπή του τετραμεθυλοαιθυλενίου, αντίστοιχα. Τελικά, δεν βρέθηκε επαρκής γραμμική συσχέτιση, αλλά παρακάτω παρουσιάζεται ένα απλό διάγραμμα μετατροπής του **1** σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβόλησης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1 Διάγραμμα μετατροπής και χρόνου ακτινοβόλησης της ευαισθητοποιημένης φωτοξειδώσεως από τον CD-C_3N_4.[51]

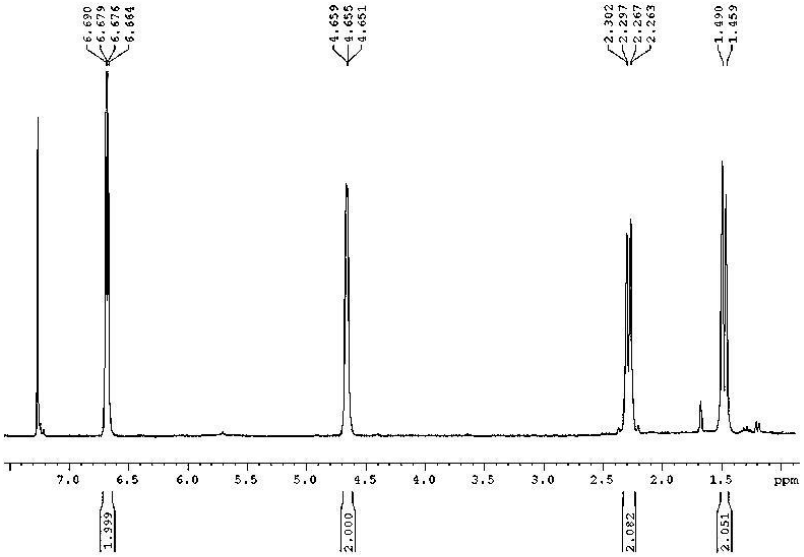
Η γραφική παράσταση αυτή δείχνει ότι ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος **1a** (στην περίπτωση διαλύτη DMSO παρακολουθείται το προϊόν **1b**) εξαρτάται από την πολικότητα του διαλύτη, π.χ., σε οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) η μετατροπή είναι πιο ευνοϊκή σε σχέση με τον τετραχλωράνθρακα (CCl_4) κατά ένα παράγοντα, περίπου 2, στο ρυθμό.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι προκύπτει οξυγόνο απλής κατάστασης στις παραπάνω αντιδράσεις, θα αναμενόταν, παρουσία του CD-C_3N_4 σε μια αντίδραση με ένα συζυγιακό διένιο να παραχθούν προϊόντα [4+2] κυκλοπροσθήκης. Έτσι πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια η φωτοοξείδωση του 1,3-κυκλοεξαδιένιου, υπόστρωμα **2**. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε αρχικά με την TPP ώστε να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο το προϊόν [4+2] κυκλοπροσθήκης **2a**. Το ίδιο προϊόν σχηματίστηκε και με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας του CD-C_3N_4 σε χλωροφόρμιο και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο και οξικό αιθυλεστέρα.



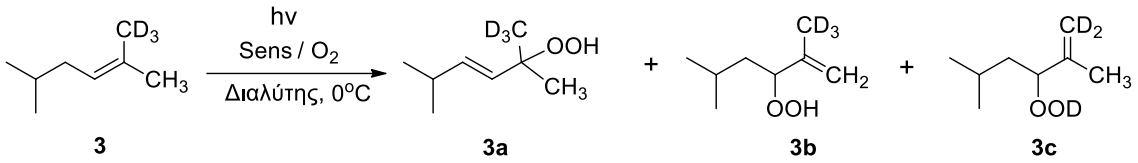
Σχήμα 1.20 Φωτοοξείδωση ελέγχου με TPP και φωτοοοξείδωση του 1,3-κυκλοεξαδιενίου σε $CDCl_3$ με CD-C_3N_4 ως φωτοκαταλύτη.

Το κυκλικό ενδοπεροξείδιο **2a** της παραπάνω αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 17% στο $CDCl_3$ και στο EtOAc, ενώ με 11% σε CH_3CN στα 30 min με τον καταλύτη CD-C_3N_4.



Εικόνα 1.2 ^{1}H-NMR της **2a**.

Μια επιπλέον απόδειξη παραγωγής $^1O_2$ από τον CD-C_3N_4 λαμβάνεται από την αντίδραση φωτοοξείδωσης του τοποειδικά δευτεριωμένου αλκενίου **3.** Και σε αυτά τα πειράματα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των προϊόντων φωτοοξείδωσης με τον γνωστό φωτοευαισθητοποιητή TPP.



Σχήμα 1.21 Φωτοοξείδωση του **3** με φωτοευαισθητοποιητή CD-C_3N_4.

Πίνακας 1.2 Τοποεκλεκτικότητα κατά την φωτοοξείδωση του **3.**

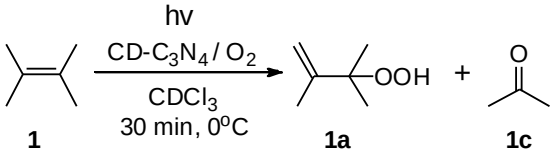
Φωτοκαταλύτης / Διαλύτης / Χρόνος	Τοποεκλεκτικότητα[α]			
	3a%	**3b** %	**3c** %	Μετατροπή[α] %
i) TPP / $CDCl_3$ / 5 min.	56	31	13	100
ii) CD-C_3N_4 / $CDCl_3$ / 30 min.	58	29	13	34
iii) CD-C_3N_4 / CD_3CN / 30 min.	54	36	10	20

[α] Προσδιορίστηκε με ^{1}H-NMR ανάλυση.

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.2, η τοποεκλεκτικότητα κατά την φωτοοξείδωση με ευαισθητοποιητή τον CD-C_3N_4 (Αντιδράσεις ii και iii, Πίνακας 1.2) είναι παρόμοια με εκείνη της TPP (Αντιδράση i, Πίνακας 1.2). Η τοποεκλεκτικότητα προσδιορίστηκε με ανάλυση ^{1}H-NMR. Τα προϊόντα **3a** και **3b** είναι τα κύρια όπως αναμέναμε από το cis-effect (η πιο υποκατεστημένη πλευρά είναι και η πιο δραστική).[29c,] ενώ η ομάδα E-μέθυλο είναι αρκετά μη δραστική.[51] Τα παραπάνω αποτελέσματα εκλεκτικότητας, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα πειράματα και τις βιβλιογραφικές αναφορές, αποτελούν ισχυρές ενδείξεις παραγωγής οξυγόνου απλής κατάστασης, με συνέπεια την πραγματοποίηση των αντιδράσεων ενίου και [4+2] κυκλοπροσθήκης, ανάλογα με το υπόστρωμα.

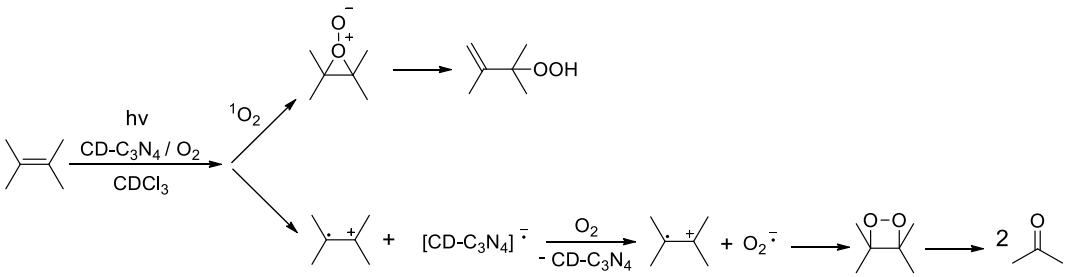
1.2.3. Αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου από CD-C_3N_4

Στην αντίδραση φωτοοξείδωσης του τετραμέθυλο αιθυλενίου (υπόστρωμα **1**) με διαλύτη το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο υπήρξε δυνατότητα παρακολούθησης του προϊόντος in situ μετά από 30 λεπτά ακτινοβόλησης. Από τα φάσματα πρωτονίου της αντίδρασης παρατηρήθηκε σήμα με μια απλή κορυφή στα 2.17 ppm. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί στην ακετόνη και φαίνεται ότι αυτή παράγεται ταυτόχρονα με το υπεροξείδιο **1a** (Σχήμα 1.20). Ο εντοπισμός της ακετόνης δεν ήταν δυνατός στα προηγούμενα πειράματα φωτοοξείδωσης του TME (Κεφάλαιο 1.1.2.) μέσω ^{1}H-NMR, αφού η ένωση αυτή εξατμιζόταν κατά την συμπύκνωση υπό ελατωμένη πίεση που απαιτείται πριν την προσθήκη $CDCl_3$. Ακόμη, χωρίς τη συμπύκνωση, δεν ήταν εύκολος ο εντοπισμός της ακετόνης με GC ανάλυση, αφού η ίδια η ένωση αυτή αποτελεί ένα διαλύτη χαμηλού μοριακού βάρους το σήμα του οποίου επικαλυπτόταν από το σήμα του εκάστοτε διαλύτη της αντίδρασης.



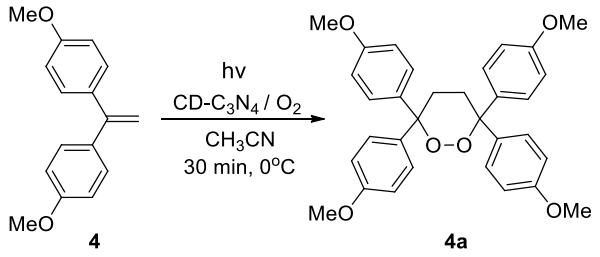
Σχήμα 1.22 Ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου (**1a**) και ακετόνης (**1c**) από την φωτοοξείδωση του TME παρουσία CD-C_3N_4.

Το ενδεχόμενο η ακετόνη να προέρχεται από τον καθαρισμό των υαλικών αποκλείστηκε με επαναληπτικές αντιδράσεις. Υποθέσαμε τότε, ότι είναι λογικό αυτή να παράγεται από οξείδωση, προερχόμενη από έναν μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου με ενδιάμεση κατιονική ρίζα - υπεροξειδικό ανιόν και σχηματισμό ενός ενδοπεροξειδίου (Σχήμα 1.23).



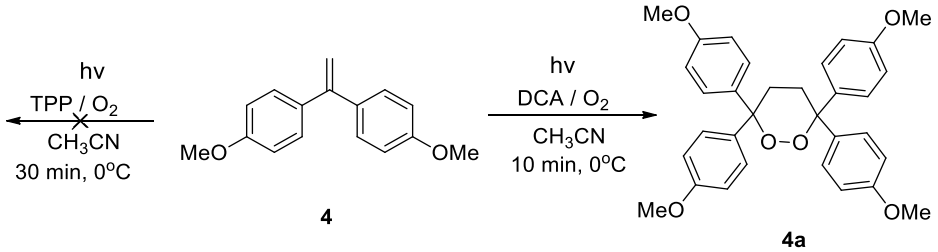
Σχήμα 1.23 Πιθανός μηχανισμός παραγωγής των δύο προϊόντων **1a** και **1c** από την φωτοοξείδωση του TME παρουσία CD-C_3N_4.

Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση της μεταφοράς ηλεκτρονίου μελετήθηκε το υπόστρωμα **4** το οποίο είναι ένα ηλεκτρονιακά πλούσιο αλκένιο που δεν διαθέτει αλλυλικά υδρογόνα και επομένως δεν μπορεί να πραγματοποιήσει αντίδραση ενίου.

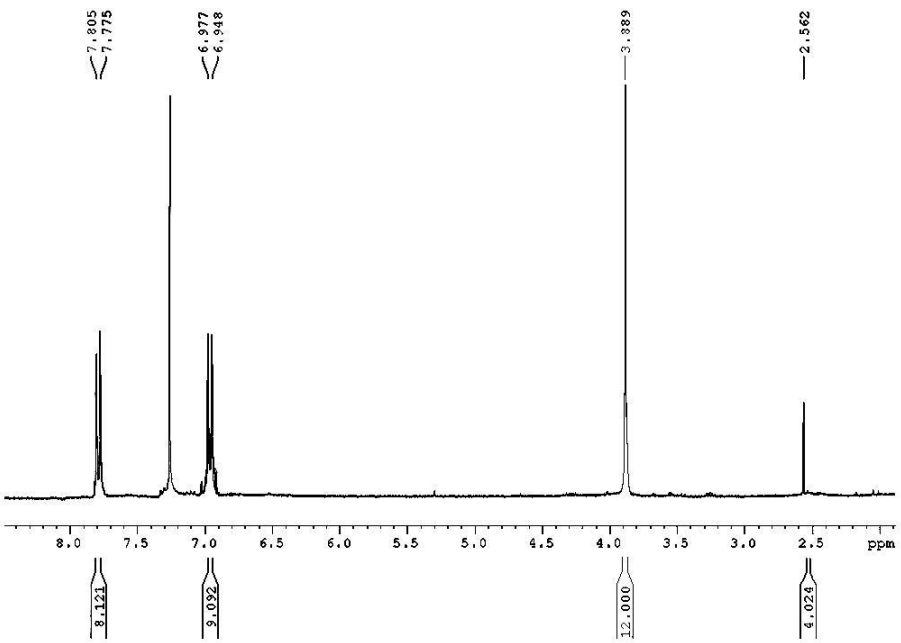


Σχήμα 1.24 Φωτοοξείδωση του υποστρώματος **4** με CD-C_3N_4.

Μετά την φωτοοξείδωση του 1,1-δισ(p-ανισυλο)αιθυλένιου (**4**) σε πολικό οργανικό διαλύτη, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του κυκλικού υπεροξειδίου **4a**, αποτέλεσμα που δείχνει ότι ακολουθείται ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίου, μέσω κυκλοπροσθήκης δύο φωτοχημικά παραγόμενων κατιοντικών ριζών του **4** και ενός υπεροξειδιακού ανιόντος. Το **4a** απομονώθηκε με απόδοση 24% ύστερα από 30 min ακτινοβόλησης. Το ίδιο προϊόν **4a** σχηματίζεται και με τη χρήση 9,10-δικυανοανθρακενίου (DCA), γνωστού φωτοευαισθητοποιητή για τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου,[52] ενώ η ίδια αντίδραση με τετραφαίνυλο-πορφυρίνη (TPP) δεν πραγματοποιείται.

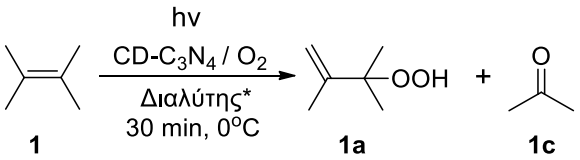


Σχήμα 1.25 Φωτοοξείδωση του **4** καταλυόμενη από τους γνωστούς φωτοευαισθητοποιητές DCA και TPP.



Εικόνα 1.3 ^{1}H-NMR της **4a**.

Το επόμενο βήμα, είναι ο επανέλεγχος της αντίδρασης με το υπόστρωμα **1**. Είναι αναπόφευκτη η σύγκριση του ποσοστού παραγωγής των δύο αυτών προϊόντων φωτοοξείδωσης, τα οποία αμφότερα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της Τύπου ΙΙ οδού, προερχόμενα όμως από διαφορετικά επιμέρους μονοπάτια. Η πορεία της φωτοοξείδωσης του υποστρώματος **1** σε διαφορετικούς διαλύτες, παρακολουθήθηκε με φασματοσκοπία ^{1}H-NMR ή/και με αέρια χρωματογραφία.



Σχήμα 1.26 Φωτοοξείδωση του **1** με φωτοευαισθητοποιητή CD-C_3N_4.

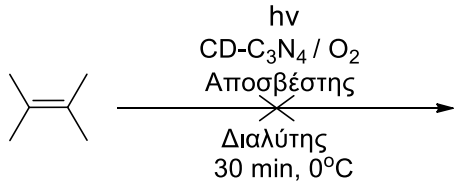
Πίνακας 1.3 Φωτοοξείδωση του ΤΜΕ με φωτοκαταλύτη CD-C_3N_4 σε διάφορους διαλύτες.

Καταχώρηση[α]	Διαλύτης	Υπεροξείδιο **1a** %	Ακετόνη **1c** % (ενδοπεροξείδιο)	Μετατροπή %
1	EtOAc	96	3	21
2	CCl_4	84	16	25
3	CH_3Cl	88	12	23
3	CH_2Cl_2	89	12	11
4	C_6H_6	95	5	15
5	$C_4H_{10}O$	87	13	11
6	C_6H_{14}	94	6	20
7	CD_3CN	87	13	23
8	$CDCl_3$	80	20	23
9	CD_2Cl_2	90	10	16
10	CD_3CD_2OD	87	13	47
11	CD_3OD	75	25	45
12	D_2O	82	18	46
13	NEAT	96	3	10

[α]Καταχωρήσεις 1 - 7 προσδιορίστηκαν με ^{1}H-NMR ανάλυση. Καταχωρήσεις 10 - 13 προσδιορίστηκαν με GC ανάλυση. Καταχωρήσεις 8 - 9 προσδιορίστηκαν με ανάλυση ^{1}H-NMR και GC.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 1.3, σε όλες τις φωτοοξειδώσεις τα ποσοστά του παραγόμενου υπεροξειδίου **1a** είναι πολύ μεγαλύτερα από του αντίστοιχου **1c**. Αυτό σημαίνει ότι η αντίδραση ενίου υπερτερεί σε σχέση με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Προσθήκη 1% mole DABCO και 1,3,5-τριμεθοξυβενζολίου στην παραπάνω αντίδραση εμποδίζει το σχηματισμό των προϊόντων οξείδωσης (Πίνακας 1.4), καθώς οι αποσβέστες δρουν πιθανώς επάνω στην διεγερμένη – φωτοευαιθητοποιημένη κατάσταση του CD-C_3N_4. Το DABCO (1,4-διαζαδίκυκλο[2.2.2]οκτάνιο) είναι μια τριτοταγής αμίνη γνωστή βιβλιογραφικά για την απόσβεση του $^1O_2$,[53] ενώ το 1,3,5-τριμεθοξυβενζόλιο καταστέλλει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το αλκένιο στον ευαισθητοποιητή.[54]



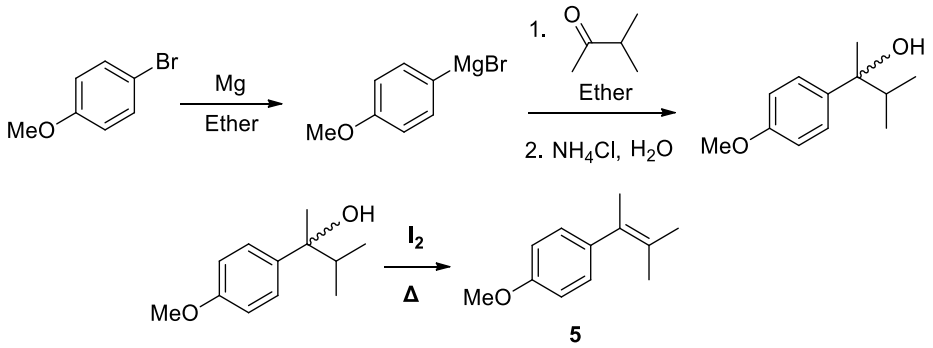
Σχήμα 1.27 Προσθήκη αποσβέστη στην αντίδραση φωτοοξείδωσης.

Πίνακας 1.4 Φωτοοξείδωση του ΤΜΕ με CD-C_3N_4 και προσθήκη 1% αποσβέστη.

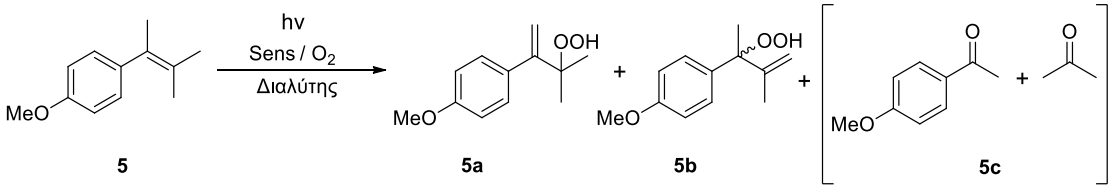
Αποσβέστης	Διαλύτης	**1a** % [α]	**1b** % [α]	Μετατροπή %[α]
DABCO	EtOAc	ίχνη	0	<1
DABCO	$CDCl_3$	0	0	0
1,3,5-Τριμεθοξυβενζόλιο	CD_3CN	0	0	

[α]Προσδιορίστηκε με GC ανάλυση

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων του καταλύτη CD-C_3N_4, παρασκευάστηκε το ηλεκτρονιακά πλούσιο 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-μεθυλοβουτ-2-ένιο (υπόστρωμα **5**). Αυτό το υπόστρωμα εκτός από δέκτης $^1O_2$, είναι επίσης ένας καλός δότης ηλεκτρονίων. Το **5** παρασκευάστηκε μέσω μιας αντίδρασης Grignard και έπειτα αφυδάτωση με ιώδιο. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η φωτοοξείδωσή του σε πολικούς και μη πολικούς οργανικούς διαλύτες.



Σχήμα 1.28 Παρασκευή του αλκενίου **5**.



Σχήμα 1.29 Φωτοοξειδώσεις του υποστρώματος **5.**

Πίνακας 1.5 Φωτοοξειδώσεις με γνωστούς ευαισθητοποιητές και φωτοοξειδώσεις με CD-C_3N_4.

Καταχώρηση[β]	Φωτοευαισθητοποιητής	Διαλύτης	**5a** %[α]	**5b** %[α]	**5c** %[α]	Μετατροπή[α] %
1	-	$CDCl_3$	ίχνη	ίχνη	-	<1
2	TPP	CCl_4	76	24	-	100
3	RB	$CDCl_3$	70	30	-	100
4	MB	CH_3CN	66	34	-	100
5	DCA	CD_3CN	61	27	12	87
6	CD-C_3N_4	$CDCl_3$	53	31	16	80
7	CD-C_3N_4	CD_3CN	58	27	15	70
8	CD-C_3N_4	C_6H_6	53	31	16	67
9	CD-C_3N_4	EtOAc	53	29	18	65
10	CD-C_3N_4	EtOH	-	-	100	100
11	CD-C_3N_4 ΣΤΟ ΣΚΟΤΑΔΙ	$CDCl_3$	-	-	-	-

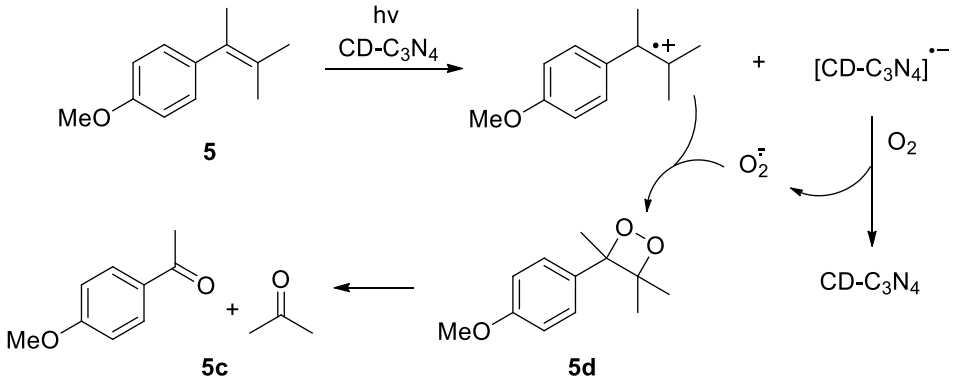
[α]Προσδιορισμός με ^{1}H-NMR ανάλυση,

[β]Καταχωρήσεις 1 και 6 – 11, 30 min ακτινοβόλησης, Καταχωρήσεις 2 – 5, 5 min ακτινοβόλησης

Για λόγους σύγκρισης, στην αντίδραση του Σχήματος 1.29, εκτός του CD-C_3N_4, χρησιμοποιήθηκαν ακόμη τέσσερις ευαισθητοποιητές (Καταχωρήσεις 2-5, Πίνακας 1.5), όπως το Ερυθρό της Βεγγάλης (RB), η TPP και το Μπλε του Μεθυλενίου (MB), ικανοί φωτοευαισθητοποιητές που σχηματίζουν οξυγόνο απλής κατάστασης. Το DCA είναι μια φτωχή σε ηλεκτρόνια ένωση που ευαισθητοποιεί την φωτοοξείδωση τόσο με $^1O_2$ όσο και με μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου κάτι που εξαρτάται από το εκάστοτε υπόστρωμα και την πολικότητα του διαλύτη.[54]

Η ακτινοβόληση του **5** παρουσία TPP, RB ή MB παρείχε τα αλλυλικά υπεροξείδια **5a** και **5b** σε αναλογία περίπου 7:3. Αυτά τα υπεροξείδια είναι τυπικά προϊόντα $^1O_2$, των οποίων ο λόγος 7:3 είναι ανεξάρτητος της πολικότητας του διαλύτη ή της para-υποκατάστασης του αρωματικού δακτυλίου.[55] Η φωτοοξείδωση του **5** με DCA σε ακετονιτρίλιο (Καταχώρηση 5, Πίνακας 1.5) έδωσε εκτός από τα προϊόντα ενίου **5a** και **5b** και σημαντική ποσότητα para-μεθόξυ-ακετοφαινόνης (**5c**). Σε αυτή την περίπτωση, τα αποτελέσματα υποστηρίζονται τόσο από μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου όσο και από

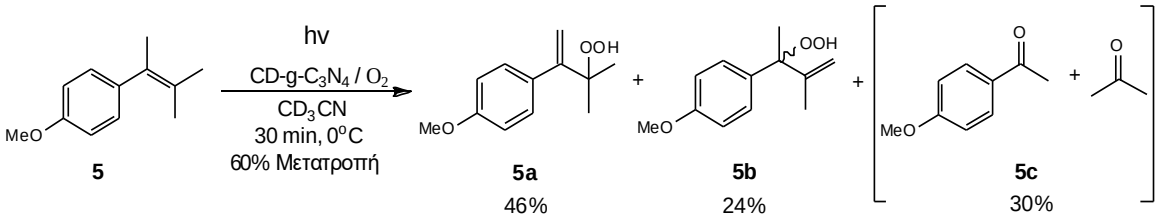
μηχανισμό $^1O_2$. Το ίδιο συνέβη και στην καταλυόμενη από CD-C_3N_4 φωτοξείδωση (Καταχώρηση 7, Πίνακας 1.5). Η φωτοευαισθητοποίηση του **5** σε μη πρωτικούς διαλύτες, εκτός από τα αλλυλικά υπεροξείδια **5a** και **5b**, απέδωσε επίσης και σημαντικές ποσότητες **5c** (15-18%). Αυτά τα αποτελέσματα είναι επίσης παρόμοια με εκείνα παλαιότερης μελέτης φωτοοξείδωσης του διφαίνυλοαιθυλενίου με φωτοευαισθητοποιητή το DCA.[54] Η **5c** πιθανότατα παράγεται ύστερα από τη διάσπαση του διοξετανίου **5d** (Σχήμα 1.29) μέσω του ενδιάμεσου ανιόντος υπεροξειδίου που προκύπτει από έναν μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός ανιόντος υπεροξειδίου και όχι ρίζας υδροξυλίου έχει προσφάτως τεκμηριωθεί.[54] Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι τα πειράματα ελέγχου με το CD-C_3N_4 είτε στο σκοτάδι (Καταχώρηση 11, Πίνακας 1.5) είτε χωρίς τον φωτοκαταλύτη υπό συνθήκες ακτινοβολίας (Καταχώρηση 1, Πίνακας 1.5) δεν έδειξαν ανιχνεύσιμα προϊόντα οξείδωσης ή μόνο μικρά ίχνη που παρατηρήθηκαν με ^{1}H-NMR. Είναι ενδιαφέρον ότι όταν αυτή η αντίδραση διεξήχθη σε αιθανόλη (Καταχώρηση 10, Πίνακας 1.5), τα προϊόντα διάσπασης **5c** ελήφθησαν αποκλειστικά σε μετατροπή 100%. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι υπό αυτές τις συνθήκες, η μεταφορά ηλεκτρονίου είναι ο μόνος μηχανισμός (Σχήμα 1.30). Ωστόσο, δεν είναι σαφές προς στο παρόν γιατί η ακτινοβόληση του CD-C_3N_4 σε αιθανόλη, προωθεί τον μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου που οδηγεί αποκλειστικά σε προϊόντα διάσπασης. Πιθανότατα, μεταξύ πολλών άλλων άγνωστων λόγων, ο πολικός πρωτικός διαλύτης σταθεροποιεί ευνοϊκά το ζεύγος ριζικών ιόντων (Σχήμα 1.30) ευνοώντας δραματικά το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίου, παράγοντας αποκλειστικά το ανιόν υπεροξειδίου ως δραστικό ενδιάμεσο.



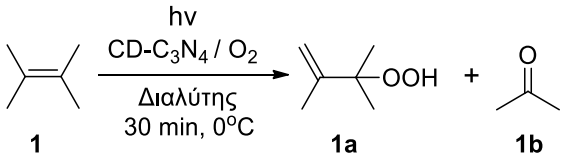
Σχήμα 1.30 Μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίου. Φωτοοξείδωση του **5** παρουσία CD-C_3N_4.[51]

1.2.4 Επαναχρησιμοποίηση του CD-C_3N_4

Εφόσον πραγματοποιείται μια ετερογενής φωτοκατάλυση, υπάρχει δυνατότητα ο καταλύτης να επαναχρησιμοποιηθεί μετά από την έκπλυση και τον καθαρισμό του. Παρακάτω παρουσιάζονται φωτοοξειδώσεις με δεύτερη χρήση του CD-C_3N_4.



Σχήμα 1.31 Φωτοοξείδωση του αλκενίου **5** με δεύτερη χρήση του CD-C_3N_4.



Σχήμα 1.32 Φωτοοξείδωση του TME με CD-C3N4.

Πίνακας 1.6 Επαναληπτικές φωτοοξειδώσεις του TME με CD-C_3N_4.

Χρήση	Διαλύτης	**1a** %	**1b** %	Μετατροπή %
$2^{η}$	EtOAc^{α}	88	12	10
$2^{η}$	$CDCl_3^{β}$	50	50	10
$3^{η}$	$CDCl_3^{β}$	32	68	10

^{α}Προσδιορίστηκε με GC ανάλυση, ^{β}Προσδιορίστηκε με ^{1}H-NMR ανάλυση

Αυτές οι αντιδράσεις δείχνουν ότι ο CD-C_3N_4 είναι δυνατόν να επαναχρησιμοποιηθεί, αλλά το ποσοστό μετατροπής είναι μειωμένο, ανάλογα με το υπόστρωμα, καθώς επίσης και η προτίμηση του μονοπατιού της μεταφοράς ηλεκτρονίου αυξάνεται.

1.3. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι ο φωτοκαταλύτης CD-C_3N_4 ευαισθητοποιεί αποτελεσματικά την φωτοοξείδωση ακόρεστων ενώσεων. Σε απλά αλκένια και διένια, λειτουργεί ο μηχανισμός Τύπου ΙΙ με το οξυγόνο απλής κατάστασης, παράγοντας τα αλλυλικά υδροϋπεροξείδια και τα ενδοπεροξείδια αντίστοιχα. Στα άρυλο αλκένια, που αποτελούν κατάλληλα μόρια ηλεκτρονιοδότες, μπορούν να λειτουργήσουν και οι δύο μηχανισμοί: τύπου ενίου με $^1O_2$ ή / και μεταφοράς ηλεκτρονίου. Το ποιός από αυτούς τους ανταγωνιστικούς μηχανισμούς θα επικρατήσει εξαρτάται από τη φύση του υποστρώματος και από τους πρωτικούς - μη πρωτικούς διαλύτες. Τέλος, ο εύκολα τροποποιημένος CD-C_3N_4 σε μεγάλη ποσότητα, παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

i) Φωτοκαταλύει την οξείδωση ποικιλίας αλκενίων και διενίων.

ii) Η αντίδραση είναι ετερογενής και με μια απλή διήθηση με celite αφαιρείται ο καταλύτης ο οποίος μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί τουλάχιστον τρεις φορές.

iii) Η ετερογενής φύση του παρόντος φωτοκαταλύτη υπερνικά τα προβλήματα διαλυτότητας.

iv) Ο καταλύτης παρουσιάζει σταθερότητα υπό τις συνθήκες της φωτοοξείδωσης σε αντίθεση με τους περισσότερους συμβατικούς φωτοευαισθητοποιητές.

v) Επίσης ο ίδιος ο καταλύτης CD-C_3N_4 συντίθεται από απλά αντιδραστήρια, όπως ουρία, σουκρόζη και νερό και παρασκευάζεται με φιλικά προς το περιβάλλον μέσα.

1.4. Πειραματικό Μέρος

1.4.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από την Sigma-Aldrich και Fluka. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν επίσης αγοραστεί από τη Sigma-Aldrich χωρίς περαιτέρω καθαρισμό εκτός από το δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο και το διμέθυλο σουλφοξείδιο (DMSO) τα οποία πριν τη χρήση τους ξηράνθηκαν με molecular sieves 4 Å. Στην περίπτωση της σύνθεσης του υποστρώματος **5** ο διαιθυλαιθέρας είχε προξηρανθεί και με Na και στη συνέχεια αποστάχθηκε παρουσία βενζοφαινόνης, υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Τα υποστρώματα **3** και **4** είχαν συντεθεί με μεθόδους από παλαιότερα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας.[56]

Ο καταλύτης CD-C_3N_4 προμηθεύτηκε από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου TU Delft, από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Frank Hollmann με την οποία συνεργάζεται η ερευνητική μας ομάδα.

1.4.2. Όργανα και Διατάξεις

Ο προσδιορισμός της δομής των μορίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με φασματόμετρο NMR Bruker σε 300 MHz (DPX-300) για ^{1}H-NMR και 500 MHz (Avance 500) για ^{13}C-NMR. Σημείο αναφοράς είναι το τετραμέθυλο σιλάνιο (TMS) και ο διαλύτης στις περισσότερες περιπτώσεις είναι $CDCl_3$ (singlet 7.26 ppm για ^{1}H και triplet 77.00 ppm για ^{13}C). Σε ορισμένες περιπτώσεις σε ^{1}H-NMR, όπου απαιτούταν από το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες CD_3CN (multiplet 1.94 ppm), D_2O (br. singlet 4.79 ppm), CD_3OD (br. singlet 3.31 ppm) και CD_3CD_2OD (br. singlet 5.28 ppm, br. singlet 3.56 ppm, br. singlet 1.10 ppm).

Η πορεία των φωτοοξειδωτικών αντιδράσεων στο υπόστρωμα **1** παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία, στο χρωματογράφο GC Shimadzu 2014 με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η απλή HP-5 capillary column (30m×0.32mm×0,25μm, 5% diphenyl – 95% dimethylpolysiloxane, Nonpolar).

Ο καθαρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης (flash column chromatography)[57] με υλικό πλήρωσης silica gel 60 0.040 – 0.063 mm (230-400 mesh ASTM). Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F_{254} EMD Millipore.

1.4.3. Γενική Μέθοδος Φωτοοξείδωσης

Σε ένα κατάλληλο δοκιμαστικό σωλήνα των 4 mL αρχικά προστέθηκαν 0.5-2.0 mL διαλύτη και ο καταλύτης CD-g-C3N4 σε συγκέντρωση 4 mg / mL. Στη συνέχεια, προστέθηκε η προς οξείδωση ένωση, χρησιμοποιώντας μια σύριγγα των 25 μl. Οι αντίστοιχες ποσότητες ήταν: 93 mM τετραμεθυλαιθυλενίου (**1**), $12 \cdot 10^{-3}$ mM (E)-2-(1,1,1-τριδευτεριομεθυλο)-5-μεθυλεξ-2-ενίου (**3**), 130 mM του 1,3-κυκλοεξαδιενίου (**2**) και 110 mM 1-μεθοξυ-4-(3-μεθυλοβουτ-2-εν-2-υλο) βενζολίου (**4**). Επίσης, οι φωτοευαισθητοποιητές TTP, MB, DCA ή RB χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ελέγχου σε καταλυτικές ποσότητες (0,5-1,0 mg). Στα πειράματα στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι αποσβεστήρες 1,4-διαζαδικυκλο[2.2.2]οκτανίου (DABCO) ή 1,3,5-τριμεθοξυβενζόλιο, προστέθηκαν σε ποσότητα 1% mole σε αναλογία με την οξειδωτική ουσία. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κατόπιν τοποθετήθηκε σε λουτρό πάγου σε δοχείο πυρέξ, σε απόσταση περίπου 10 cm από την πηγή ορατού φωτός (λαμπτήρας Xenon μεταβλητής έντασης, Cermax 300 W). Το οξυγόνο μεταφέρθηκε στο εσωτερικό του δοκιμαστικού σωλήνα με σύριγγα υπό ήπια και συνεχή ροή. Η αντίδραση συνήθως αφήνεται για 30 min, ή 60 λεπτά. Στο τέλος, ο καταλύτης CD-C_3N_4 απομακρύνθηκε με απλή διήθηση από στρώμα celite και βαμβάκι. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένοι διαλύτες, αυτοί δεν συμπυκνώθηκαν και η μετατροπή προσδιορίστηκε με ανάλυση ^{1H}-NMR. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις με μη δευτεριωμένους διαλύτες, είτε εξατμίστηκαν υπό ελαττωμένη πίεση και η μετατροπή προσδιορίστηκε με ανάλυση ^{1}H-NMR χρησιμοποιώντας $CDCl_3$, είτε η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία.

- <u>3-υδροπερόξυ-2,3-διμέθυλοβουτ-1-ένιο (**1a**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 5.00 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz,), 4.96 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz,), 1.81 (s, 3H), 1.36 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_2Cl_2, 300 MHz) δ: 4.99 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz,), 4.95 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 1.81 (s, 3H), 1.35 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3CN, 300 MHz) δ: 4.92 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 4.88 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 1.78 (s, 3H), 1.29 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3CD_2OD, 300 MHz) δ: 4.90 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 4.83 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 1.79 (s, 3H), 1.31 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3OD, 300 MHz) δ: 4.93 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 4.86 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 1.80 (s, 3H), 1.32 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (D_2O, 300 MHz) δ: 5.03 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 5.00 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 1.80 (s, 3H), 1.35 (s, 6H) ppm

- <u>ακετόνη (**1c**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 2.17 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_2Cl_2, 300 MHz) δ: 2.13 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3CN, 300 MHz) δ: 2.09 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3CD_2OD, 300 MHz) δ: 2.15 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3OD, 300 MHz) δ: 2.16 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (D_2O, 300 MHz) δ: 2.22 (s, 6H) ppm

- <u>2,3-διμέθυλοβουτ-3-εν-2-όλη (**1b**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 4.99 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz,) 4.76 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz), 1.80 (s, 3H), 1.34 (s, 6H) ppm

- <u>2,3-διοξαδίκυκλο[2.2.2]οκτ-5-ένιο (**2α**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 6.68 (dd, 2H, *J* = 4.3 Hz, 3.3 Hz), 4.65 (m, 2H), 2.28 (m, 2H), 1.48 (m, 2H) ppm

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 132.16, 70.83, 21.56 ppm

- <u>(E)-1,1,1-τριδευτέριο-2-υδροπερόξυ-2,5-διμέθυλοεξ-3-ένιο (**3a**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 5.69 (dd, 1H, *J* = 16.0 Hz, 6.5 Hz), 5.47 (d, 1H, *J* = 16.0Hz), 2.32 (m, 1H), 1.33 (s, 3H), 1.01 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz) ppm

- <u>3-υδροπεροξυ-5-μεθυλο-2-(τριδευτέριομεθυλο)εξ-1-ένιο (**3b**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 5.03 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.41 (t, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.46 (dd, 2H, *J* = 14.0 Hz, 6.8 Hz), 0.92 (d, 6H, *J* = 6.8Hz) ppm

- <u>1,1-διδευτέριο-3-δευτεριοπεροξυ-2,5-διμέθυλοεξ-1-ένιο (**3c**)</u>

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 4.41 (t, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.68 (dd, 2H, *J* = 13.6 Hz, 6.8 Hz), 1.74 (s, 3H), 0.94 (d, 6H, *J* = 6.8Hz) ppm

- 3,3,6,6-τετρακις(4-μεθοξυφαίνυλο)-1,2-διοξάνιο (**4α**)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.79 (d, 8H, *J* = 8.8Hz), 6.96 (d, 8H, *J* = 9.0Hz), 3.89 (s, 12H), 2.56 (s, 4H) ppm

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 162.80, 132.20, 130.73, 113.42, 68.12, 55.44, 38.69 ppm

- 1-(3-υδροπεροξυ-3-μεθυλοβουτ-1-εν-2-υλ)-4-μεθοξυβενζόλιο (**5a**)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.32 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 5.39 (d, 1H, *J* = 1.1Hz), 5.22 (d, 1H, *J* = 1.1Hz), 3.82 (s, 3H), 1.43 (s, 6H) ppm

^{1}H-NMR (CD_3CN, 300 MHz) δ: 7.33 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 5.35 (d, 1H, *J* = 1.1Hz), 5.10 (d, 1H, *J* = 1.1Hz), 3.78 (s, 3H), 1.32 (s, 6H) ppm

- 1-(2-υδροπεροξυ-3-μεθυλοβουτ-1-εν-2-υλ)-4-μεθοξυβενζόλιο (**5b**)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.22 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 5.09 (d, 1H, J=1.1Hz), 5.07 (d, 1H, J = 1Hz), 3.79 (s, 3H), 1.78 (s, 6H), 1.78 ppm

^{1}H-NMR (CD_3CN, 300 MHz) δ: 7.19 (d, 2H, *J*=8.8Hz), 6.88 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 5.06 (d, 1H, *J* = 1.1Hz), 5.03 (d, 1H, *J* = 1.1Hz), 3.86 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.61 (s, 3H) ppm

1.4.4. Σύνθεση Υποστρωμάτων

Σύνθεση 2-(1,1,1τριδευτεριομεθυλο)-5-μεθυλεξ-2-3νίου (**3**)

Το αλκένιο **3** παρασκευάσθηκε με την ακόλουθη μέθοδο: Η αντίδραση Wittig του σταθεροποιημένου προπιονικού μεθυλεστέρα (τριφαινυλοφωσφορανυλιδενίου) (1.64 g, 4.7 mmol) με 2-μεθυλοβουτανάλη (0.39 g, 4.5 mmol) σε ξηρό CH_2Cl_2 (10 mL) σε θερμοκρασία δωματίου και overnight, έδωσε τη διαμόρφωση E του αντίστοιχου εστέρα σε ισομερική καθαρότητα 94-96%. και με απόδοση 80% (0.56 g). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 6.76 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.02 (m, 2H), 1.75 (s, 3H), 1,72 (m, 1H) , 0.89 (d, 6H, *J* = 7.0 Hz) ppm.

Η αναγωγή του παραπάνω εστέρα (0,7 g, 4,4 mmol) με $LiAlD_4$ (0,126 g, 3 mmol) σε διαιθυλαιθέρα, στους 0°C, έδωσε την αντίστοιχη διδευτέριο αλλυλική αλκοόλη, σε απόδοση 90% (0,52 g). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 5.43 (td, 1H, *J* = 7.0, 1.5 Hz), 1.91 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 1.66 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 0.89 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz) ppm.

Στη συνέχεια, αυτή η αλλυλική αλκοόλη (0.5 g, 3.8 mmol) αντέδρασε με Br_2 (0.76 g, 4.75 mmol) και Ph_3P (1.19 g, 4.55 mmol) σε 10 mL ξηρού διχλωρομεθανίου. Η απομονωμένη απόδοση του αλλυλικού βρωμιδίου ήταν 50,6% (0,372 g, 1,92 mmol). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 5.62 (td, 1H, *J* = 7.0, 1.5 Hz), 1.91 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz) 1.74 (s, 3H), 1.65 (m, 1H), 0.89 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz) ppm.

Τέλος, η αναγωγή του παραπάνω αλλυλικού βρωμιδίου (295 mg, 1.52 mmol) σε ξηρό diglyme (2 mL) με $LiAlD_4$ (23.8 mg, 0.57 mmol) αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Ακολούθησε απόσβεση με δύο σταγόνες νερό. Τέλος, το μείγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 150°C για 1,5 ώρα και 75 mg του αλκενίου **3** αποστάχθηκαν από το diglyme. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 5.13 (t, 1H, *J* = 12.0 Hz) 1.85 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 1.56 (s, 3H), 1.55 (m, 1H), 0.86 (d, 6H, *J* = 11.0 Hz) ppm.

Σύνθεση του 1,1-δι(4-ανισυλο)αιθυλενίου (**4**)

Το αλκένιο **4** παρασκευάστηκε με την ακόλουθη μέθοδο: σε διάλυμα δισ-(4-μεθοξυφαινυλο)μεθανόνης (0.87 g, 3.6 mmol) σε ξηρό THF (40 mL) προστέθηκε MeLi (2 mL) στους 0°C. Μετά από 24 ώρες το μίγμα της αντίδρασης αποσβέστηκε με λίγες σταγόνες νερού. Το μίγμα της αντίδρασης οξυνίστηκε με 3M HCl και εκπλύθηκε με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl και H_2O. Μετά από ξήρανση της οργανικής στιβάδας και εξάτμιση του διαλύτη, απομονώθηκαν 0.76 g (87%) του αλκενίου **4**. ^{1}H-NMR (CDCl3, 500 MHz) δ: 7.28 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz), 6.87 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz), 5.29 (s, 2H), 3.83 (s, 6H), ppm.

Σύνθεση του 1-μεθόξυ-4-(3 μεθυλοβουτ-1-εν-2-υλ)-4-μεθοξυβενζόλιο (**6**)

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα, εφοδιασμένη με προσθετική και υπό ξηρή ατμόσφαιρα αζώτου, 220 mg ρινισμώτων Mg (9.00 mmol) διαλύθηκαν αρχικά σε 10 mL ξηρό διαιθυλαιθέρα. Στη συνέχεια, η 4-βρωμοανισόλη (0.8 mL, 6.50 mmol) αρχικά διαλύεται σε επιπλέον ξηρό διαιθυλαιθέρα (4 mL) και το διάλυμα προστέθηκε στάγδην, ενώ το μίγμα αναδευόταν. Προκειμένου να ξεκινήσει η αντίδραση, 1 κοκκίο ιωδίου προστέθηκε στο μίγμα. Η αντίδραση τότε θερμάνθηκε στους 35 ° C (reflux) για περίπου 45 min. Η αντίδραση στη συνέχεια ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε στάγδην η 3-μεθυλ-2-βουτανόνη (0,7 mL, 6,50 mmol). Μετά την προσθήκη της κετόνης, η αντίδραση θερμάνθηκε πάλι σε reflux (35 ° C) για 30 min. Έπειτα το μίγμα της αντίδρασης αποσβέστηκε με απεσταγμένο νερό (20 mL) και μετά από προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl (4 mL) το μίγμα εκχυλίστηκε 2 φορές με διαιθυλαιθέρα (15 mL). Οι οργανικές στιβάδες ξηράνθηκαν με $MgSO_4$ και συμπυκνώθηκαν υπό κενό μέχρι ξηρότητας. Η παραγώμενη 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-μεθυλοβουταν-2-όλη καθαρίστηκε μετά από χρωματογραφία στήλης. (Πετρελαϊκός Αιθέρας / Οξικός αιθυλεστέρας v / v, 10/1), 250 mg. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.33 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 6.86 (d, 2H, *J* = 8.8Hz), 3.80 (s, 3H), 1.99 (m, 1H), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.82 (d, 3H, *J* = 6.8Hz) ppm

Έπειτα η 2- (4-μεθοξυφαινυλο)-3-μεθυλοβουταν-2-όλη (250 mg, 1,03 mmol) θερμάνθηκε με καθαρή καταλυτική ποσότητα I_2 (1/2 κόκκου) στους 120 ° C για 1

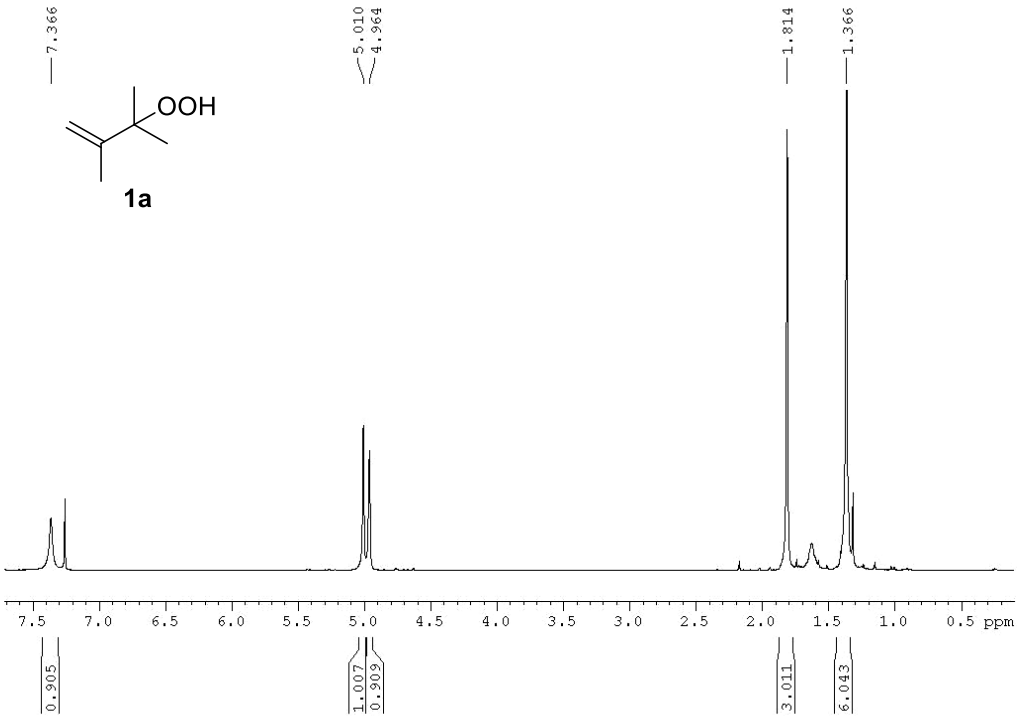
λεπτό. Στη συνέχεια, η αντίδραση ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου εκχυλίστηκε με διαιθυλαιθέρα (310 mL), απεσταγμένο νερό (10 mL) και κορεσμένο διάλυμα $Na_2S_2O_3$ (4 mL). Οι οργανικές στιβάδες ξηράνθηκαν με $MgSO_4$ και ο διαλύτης εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, υπό κενό.

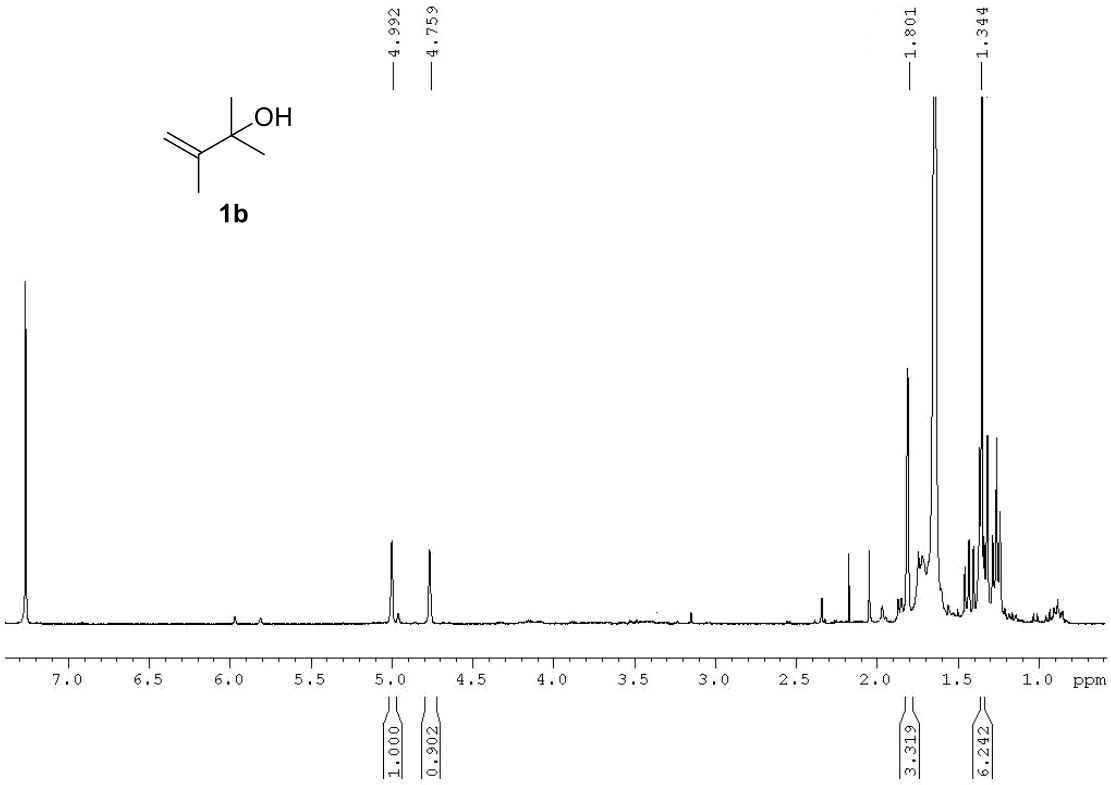
Το καθαρό 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-μεθυλοβουτ-2-ένιο (υπόστρωμα **6**) ελήφθη μετά από σύντομο καθαρισμό με λεπτό στρώμα από silica με Εξάνιο / Οξικό αιθυλεστέρα v/v, 50/1 με 20% συνολική απόδοση (230 mg). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.05 (d, 2H, *J* = 8.7Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.7Hz), 3.81 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.60 (s, 3H) ppm,

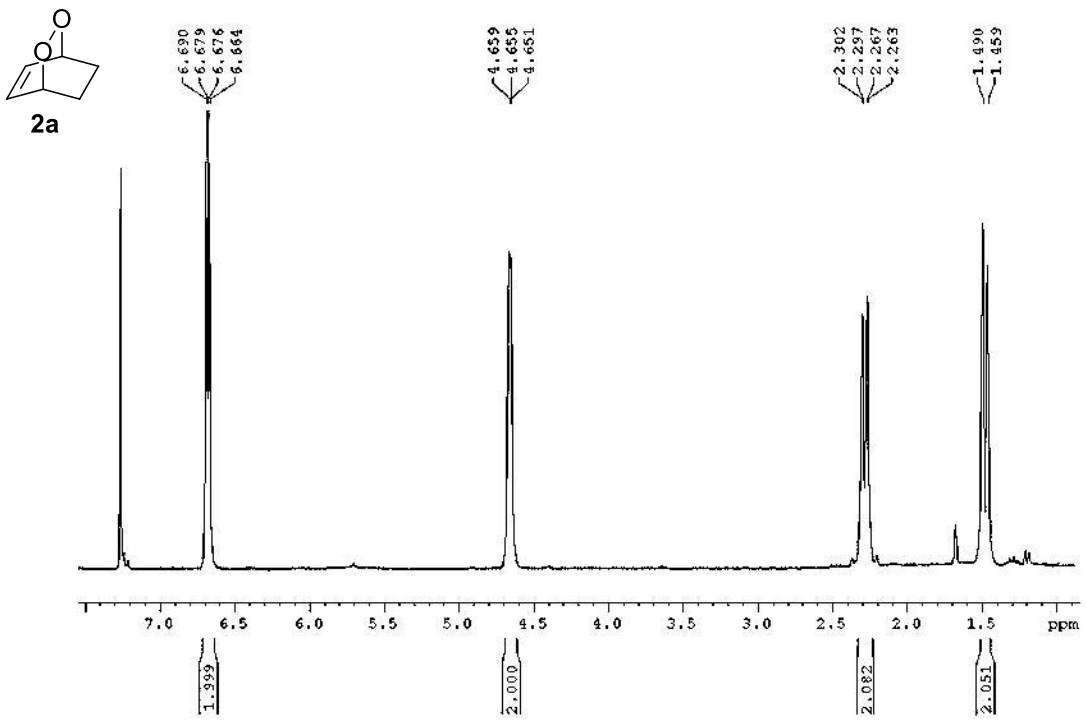
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 157.54, 137.68, 132.22, 129.40, 126.94, 113.26, 55.18, 22.07, 20.87, 20.57 ppm.

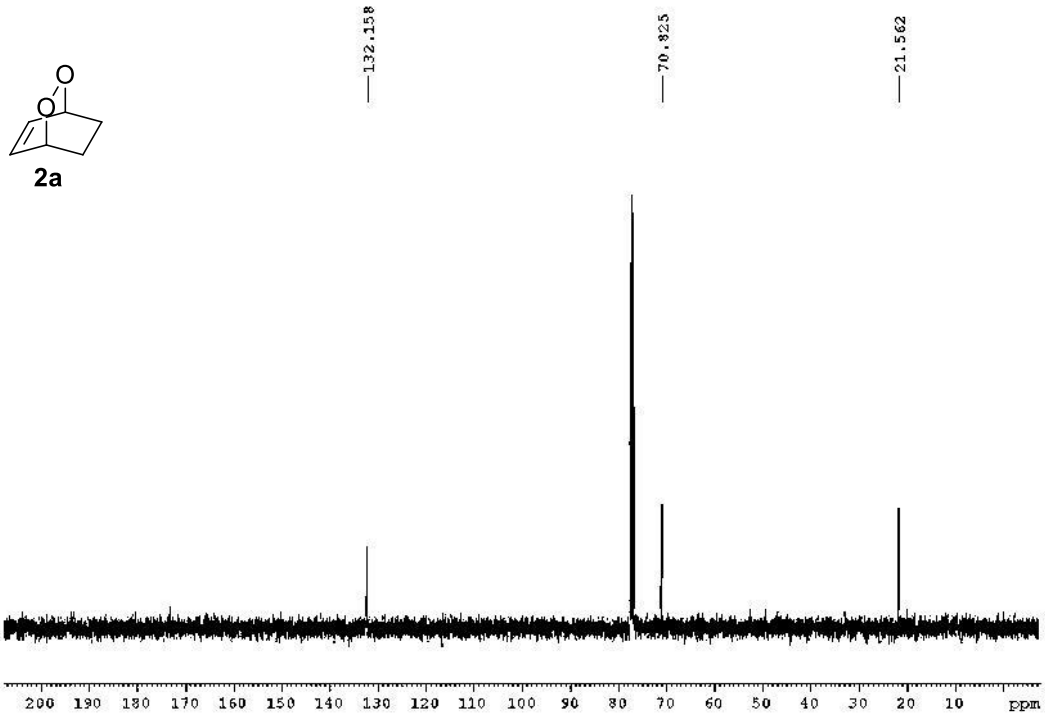
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

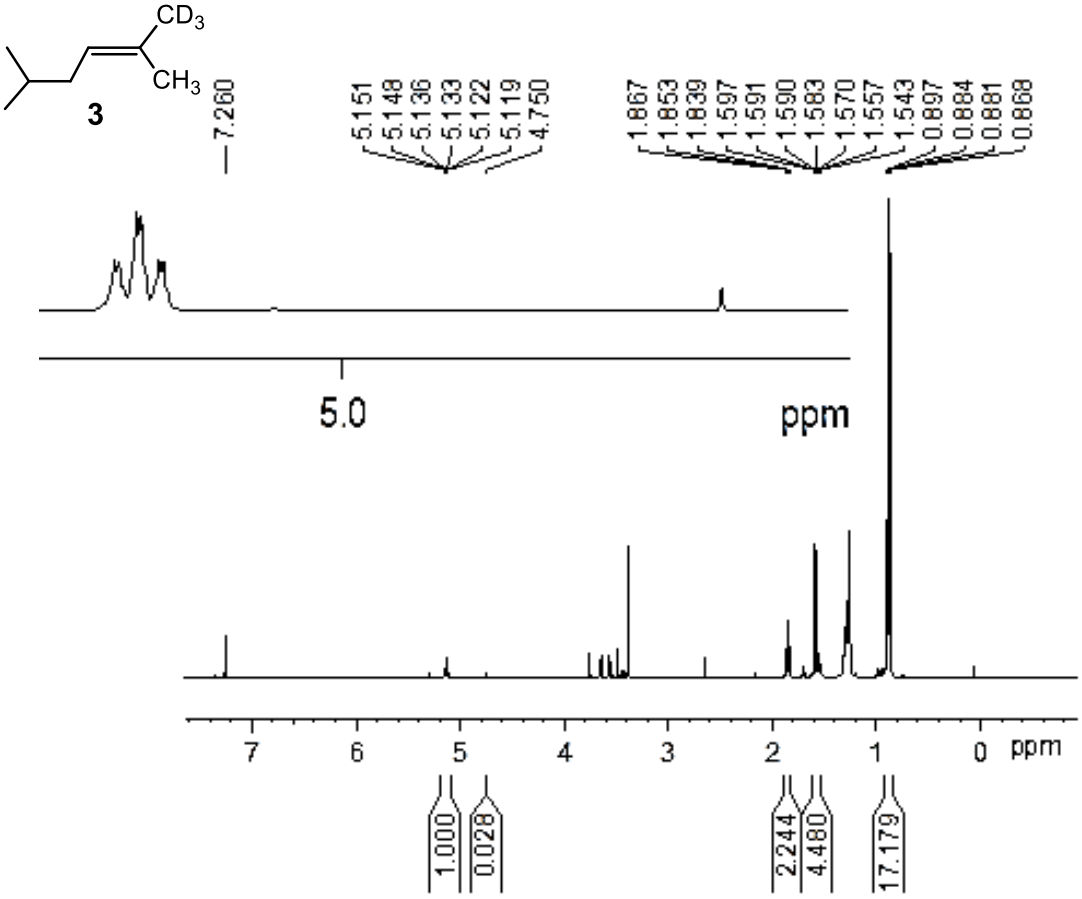
Φάσματα NMR

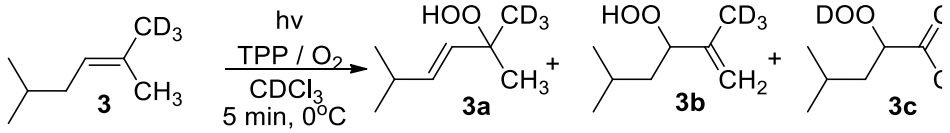

7.366
5.010
4.964
1.814
1.366
OOH
1a
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
0.905
1.007
0.909
3.011
6.043

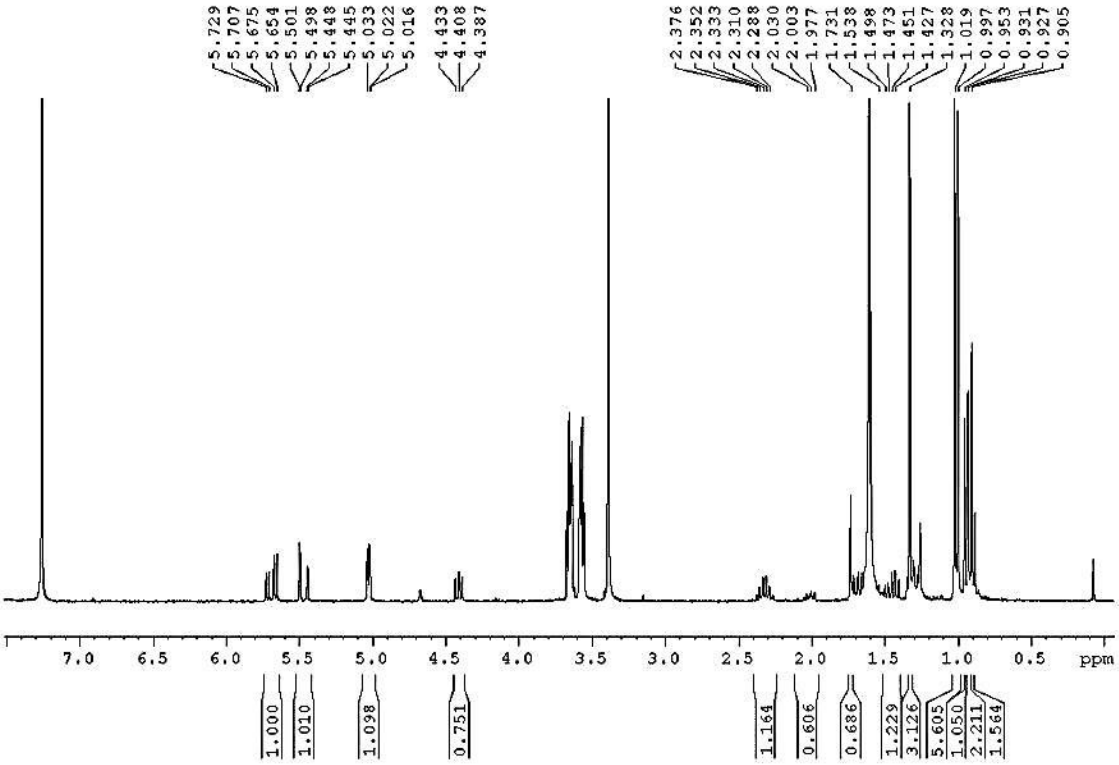

4.992
4.759
1.801
1.344
OH
1b
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.000
0.902
3.319
6.242


2a
6.690
6.679
6.676
6.664
4.659
4.655
4.651
2.302
2.297
2.267
2.263
1.490
1.459
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 ppm
1.999
2.000
2.082
2.051


2a
132.158
70.825
21.562
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm


CD3
CH3
3
7.260
5.151
5.148
5.136
5.133
5.122
5.119
4.750
1.867
1.853
1.839
1.597
1.591
1.590
1.583
1.570
1.557
1.543
0.897
0.884
0.881
0.868
5.0
ppm
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.000
0.028
2.244
4.480
17.179



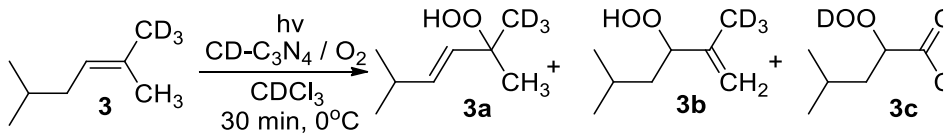


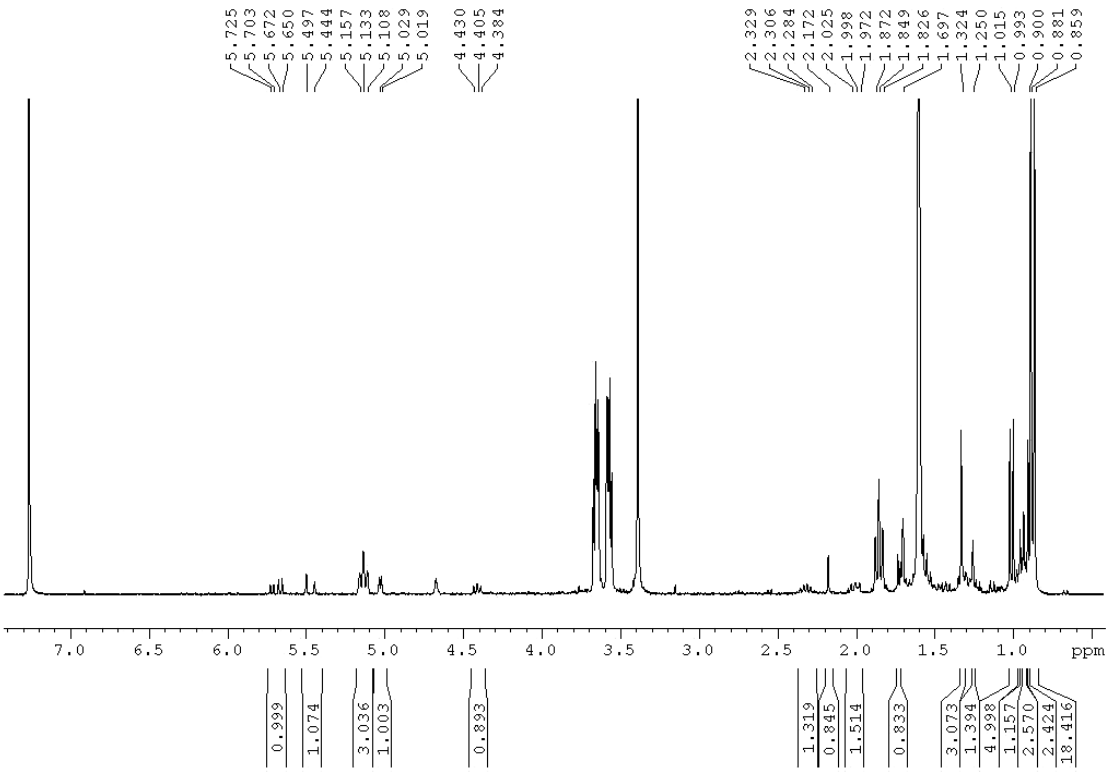
Υπολογισμοί εκλεκτικότητας (Πίνακας 1.2)

	δ ($CDCl_3$)
3a	5.69 (dd, 1H, J_1=16.0 Hz, J_2=6.5 Hz), 5.47 (d, 1H, J=16.0Hz) ppm
3b	5.03 (s, 1H), 5.02 (s, 1H) ppm
3c	1.73 (s, 3H) ppm

Ποσότητα ενώσεων = 3 + 3a + 3b +3c = 0 + 2.01 + 1.10+ (0.69×2/3) = 3.57 (100%)

Εκλεκτικότητα: 3a+3b+3c= 3.57 (100%).
Εκλεκτικότητα του 3a = (2.01/3.57) ×100 = 56%
Εκλεκτικότητα του 3b = (1.10/3.57) ×100 = 31%
Εκλεκτικότητα του 3b = (0.69×2/3/3.33) ×100 = 13%





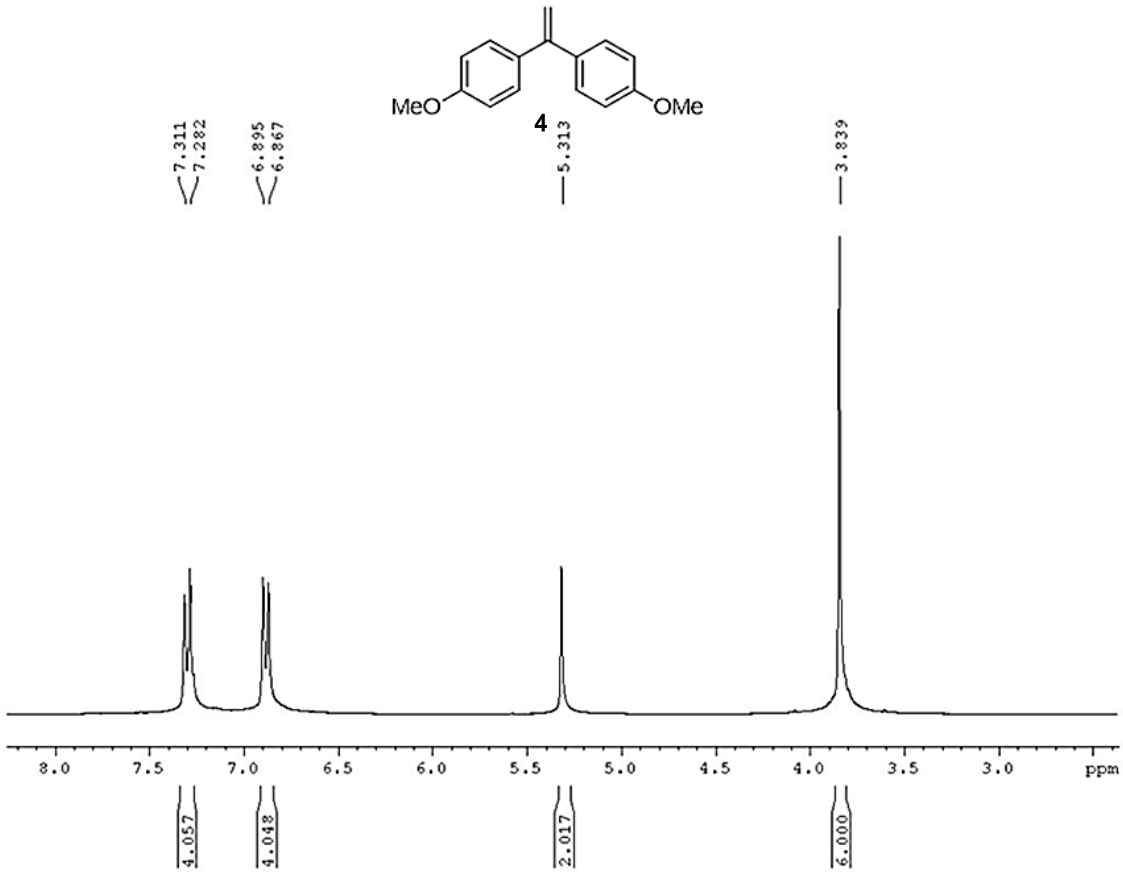
Υπολογισμοί εκλεκτικότητας (Πίνακας 1.2)

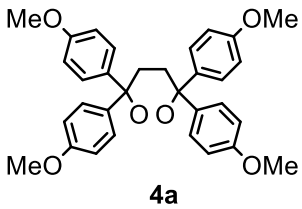
	δ ($CDCl_3$)
3a	5.69 (dd, 1H, J1=16.0 Hz, J2=6.5 Hz), 5.47 (d, 1H, J=16.0Hz) ppm
3b	5.03 (s, 1H), 5.02 (s, 1H) ppm and 4.41 (t, 1H) ppm
3c	4.41 (t, 1H) ppm

[4.41 (t, 1H) ppm]: 3b + 3c = 0.75

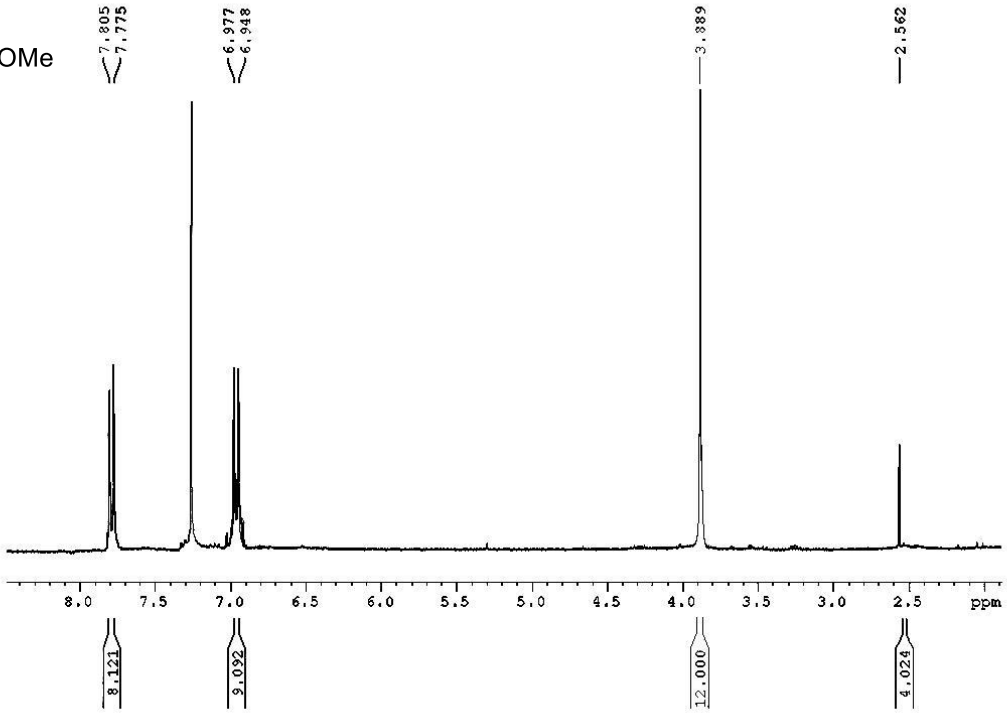
[5.03 (s, 1H), 5.02 (s, 1H) ppm]: 4b = 0.97/2=0.49 => [4.41 (t, 1H) ppm]: 2c = 0.75-0.49 = 0.26

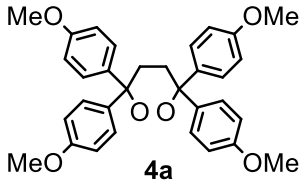
Εκλεκτικότητα = 3a + 3b +3c = 2.07 + 0.97 + (0.26×2) = 3.56 (100%)
Εκλεκτικότητα του 3a = (2.07/3.56) ×100 = 58%
Εκλεκτικότητα του 3b = (1.03/3.56) ×100 = 29%
Εκλεκτικότητα του 3c = (0.26×2/3.56) ×100 = 13%


MeO
OMe
4
7.311
7.282
6.895
6.867
5.313
3.839
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
ppm
4.057
4.048
2.017
6.000

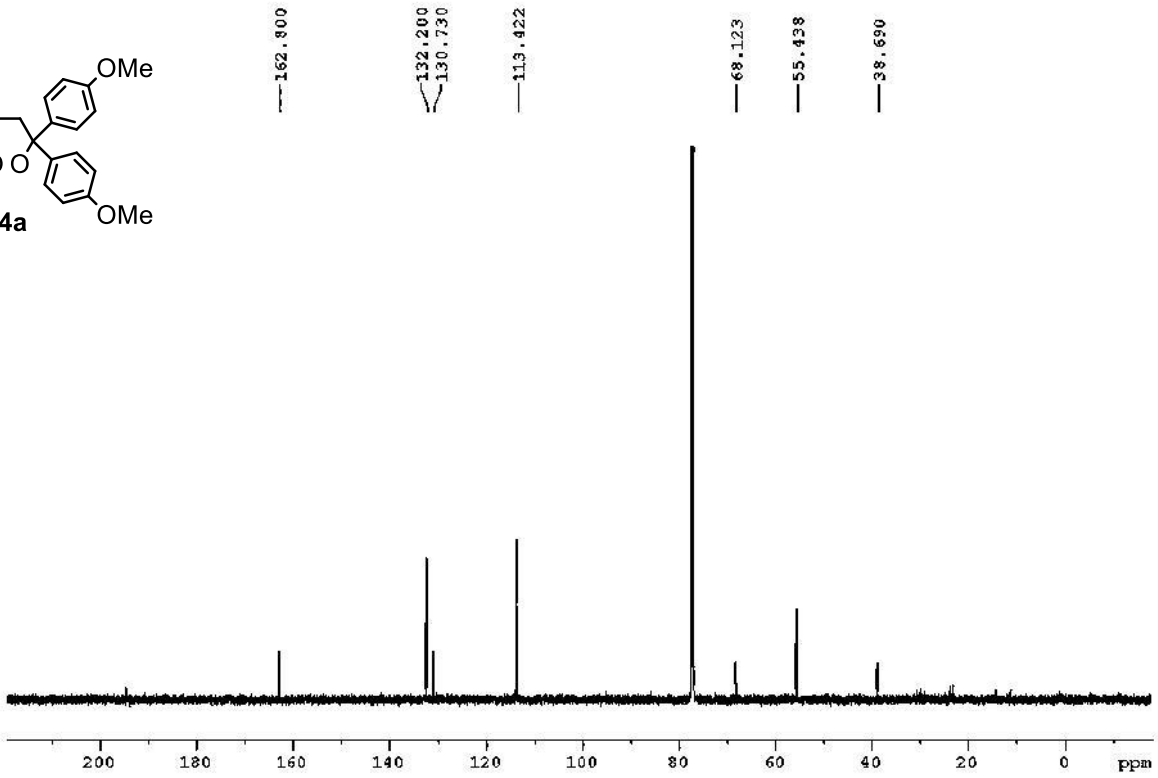

MeO
OMe
O O
MeO
OMe

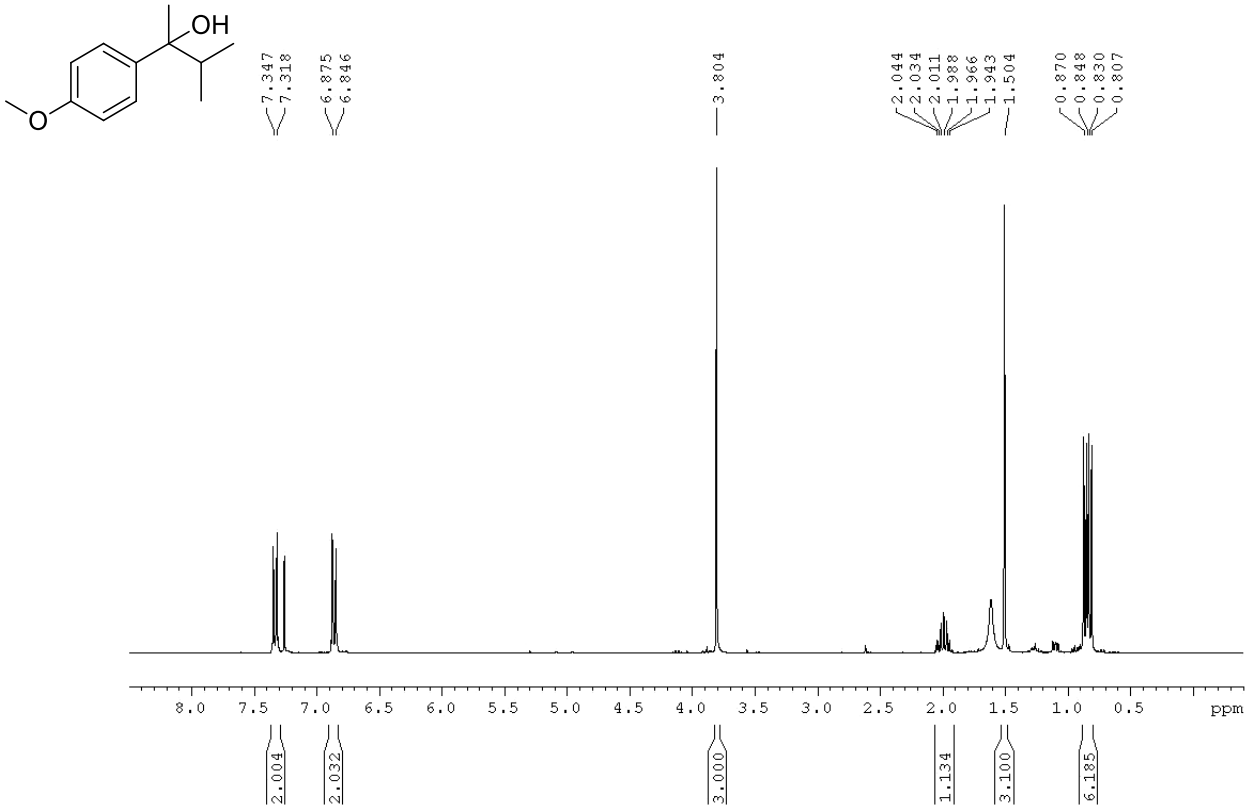
4a

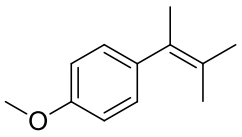

7.805
7.775
6.977
6.948
3.889
2.562
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm
8.121
9.092
12.000
4.024


MeO
OMe
O O
MeO
OMe

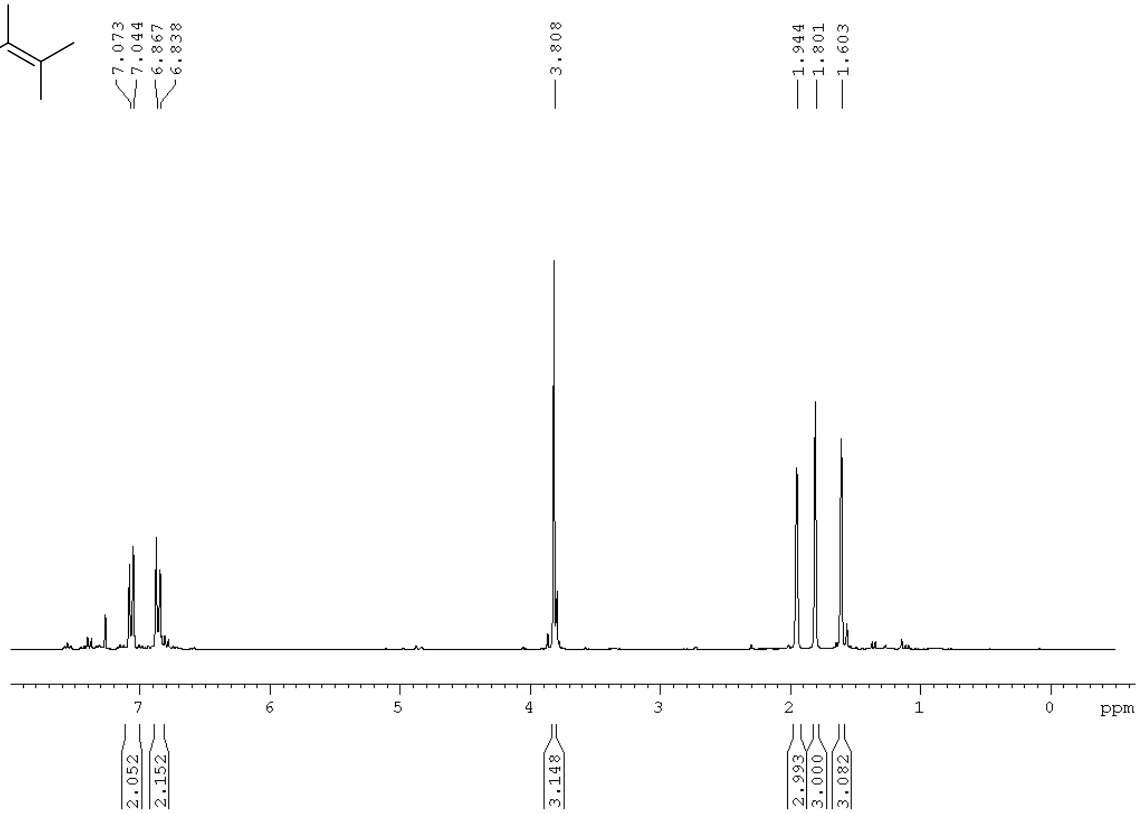
4a

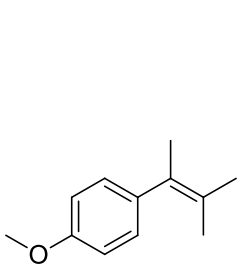

162.800
132.200
130.730
113.422
68.123
55.438
38.690
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm


OH
O
7.347
7.318
6.875
6.846
3.804
2.044
2.034
2.011
1.988
1.966
1.943
1.504
0.870
0.848
0.830
0.807
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
2.004
2.032
3.000
1.134
3.100
6.185

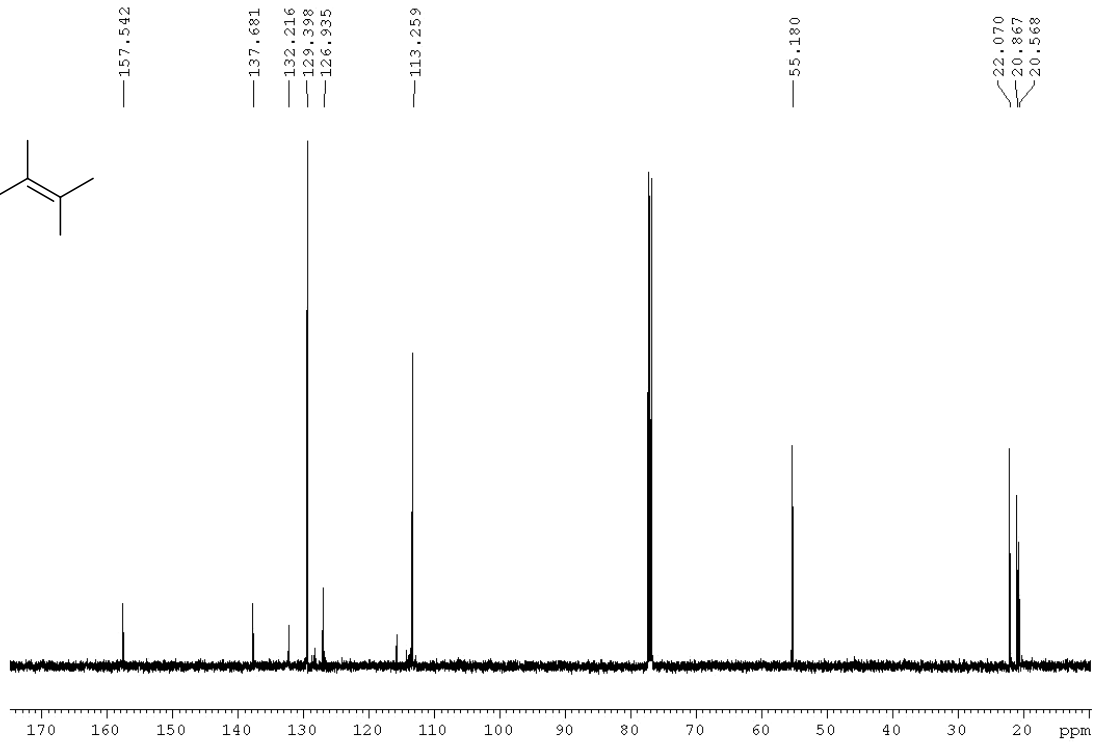


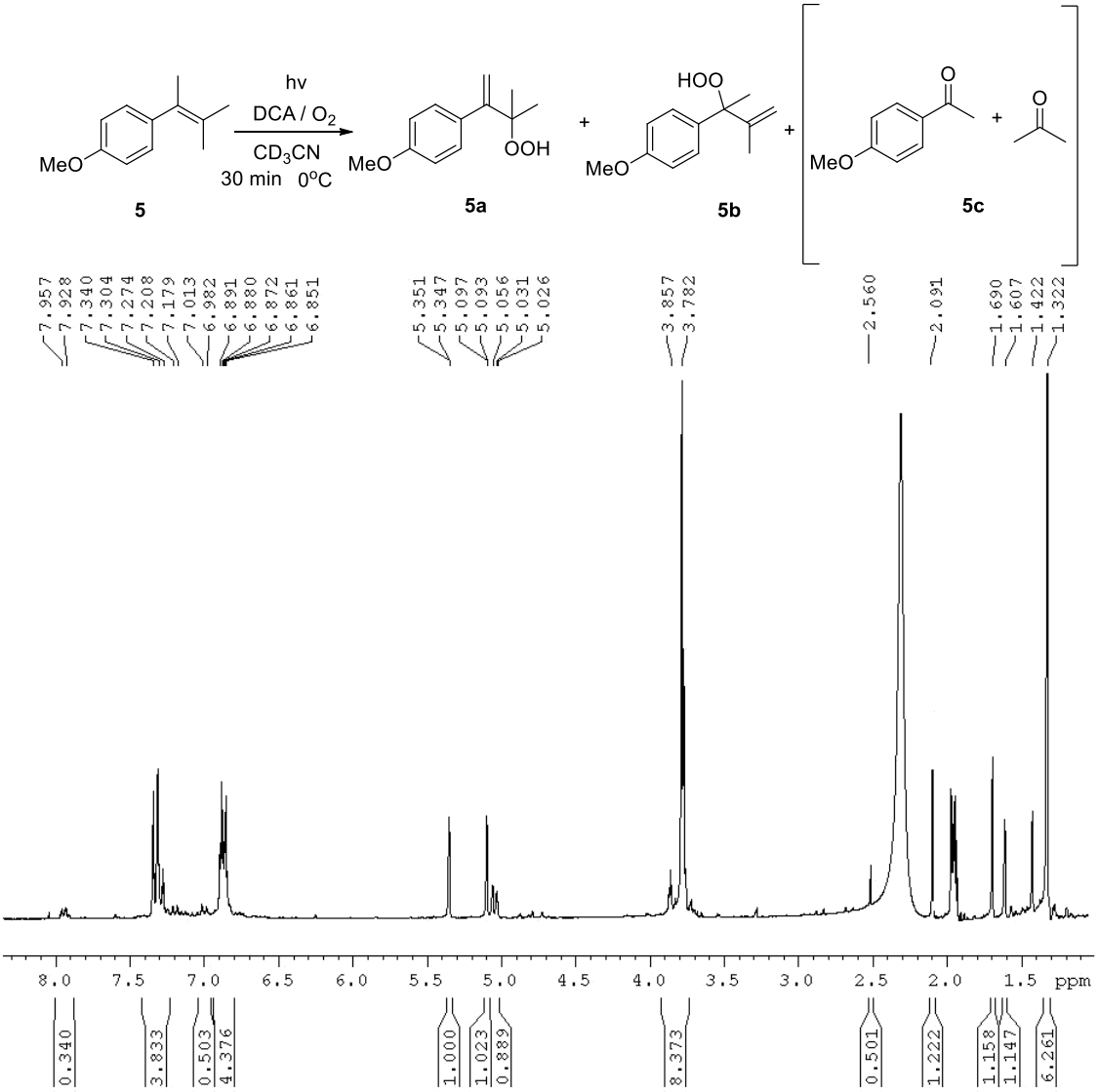
5


7.073
7.044
6.867
6.838
3.808
1.944
1.801
1.603
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.052
2.152
3.148
2.993
3.000
3.082



5


157.542
137.681
132.216
129.398
126.935
113.259
55.180
22.070
20.867
20.568
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

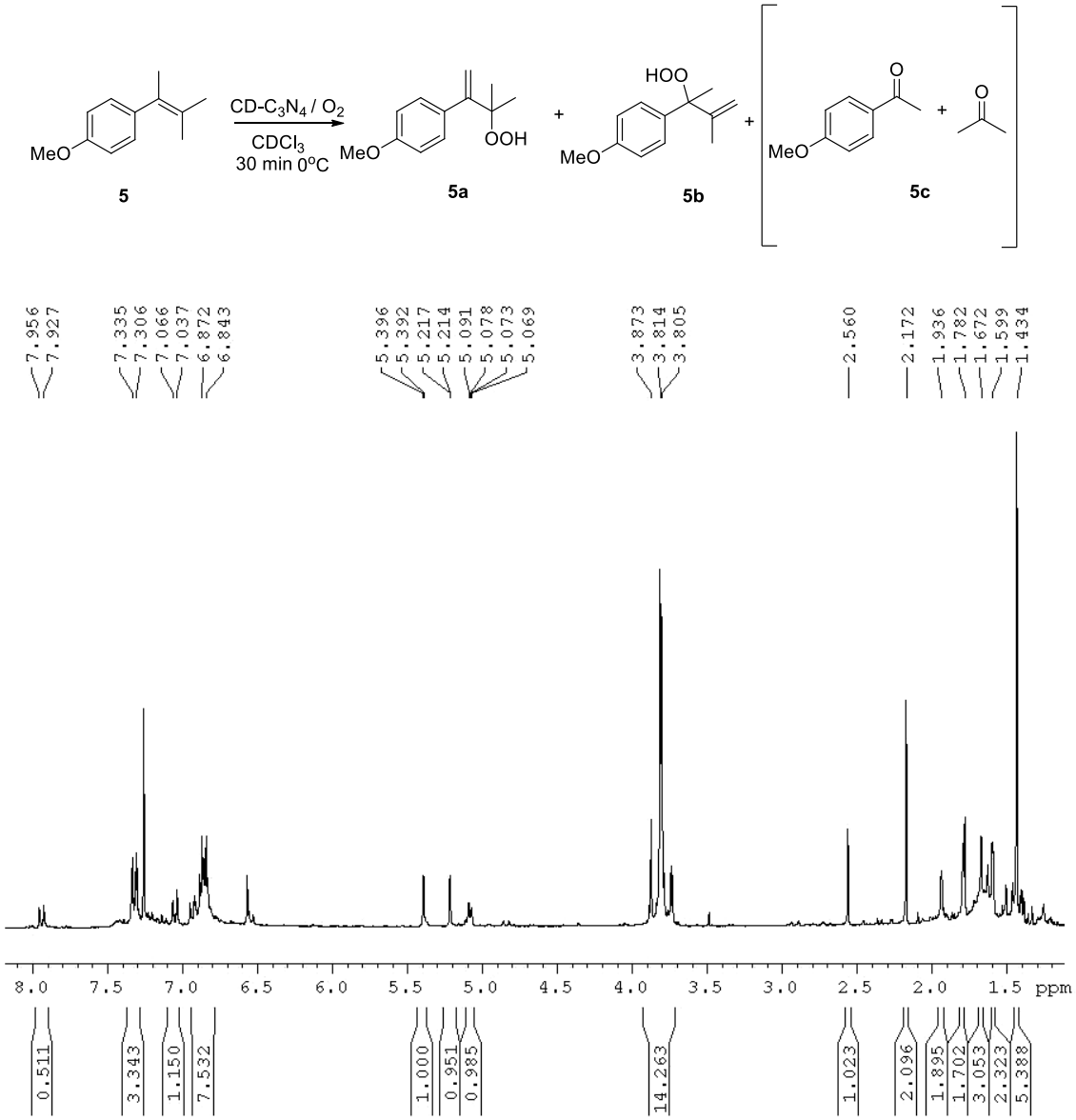


Υπολογισμός ποσοστού μετατροπής και εκλεκτικότητας (Πίνακας 1.5)

	δ (CD_3CN)
5a	5.35 (d, 1H, J=1.1Hz), 5.10 (d, 1H, J=1.1Hz) ppm
5b	5.06 (d, 1H, J=1.1Hz), 5.03 (d, 1H, J=1.1Hz) ppm
5c	2.51 (s, 3H) ppm and 2.09 (s, 6H) ppm
5	7.00 (d, 2H, J=8.7Hz) ppm

Συνολική ποσότητα ουσιών 5 + 5a + 5b +5c = 0.50 + 2.02 + 0.90 + (1.22/3) =
= 3.83 (100%)
Αντιδρόν στο τέλος = (0.50/3.83)×100 = 13%
Conversion = 100%–13% = 87%

Εκλεκτικότητα: 5a+5b+5c= 2.02 + 0.90 + (1.22/3) = 3.33 (100%).
Εκλεκτικότητα του 5a = (2.02/3.33) ×100 = 61%
Εκλεκτικότητα του 5b = (0.90 /3.33) ×100 = 27%
Εκλεκτικότητα του 5c = ([1.22/3]/3.33) ×100 = 12%



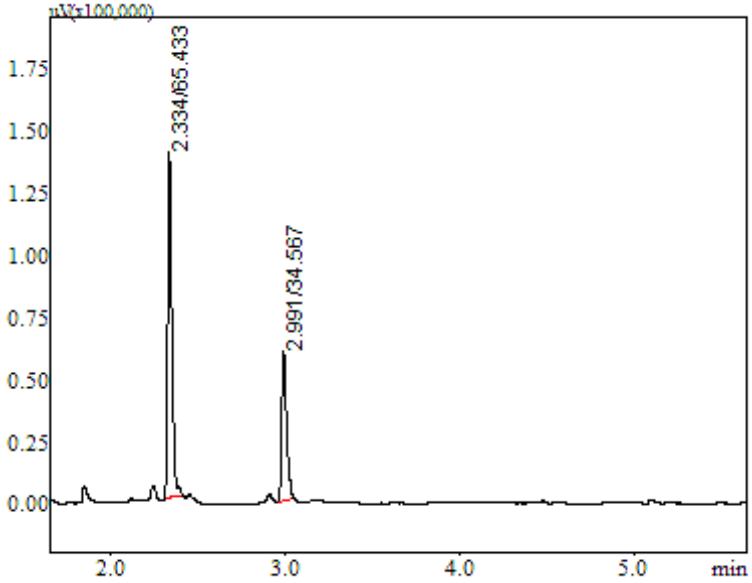
Οι υπολογισμοί έγιναν όπως με τα προηγούμενα παραδείγματα

GC

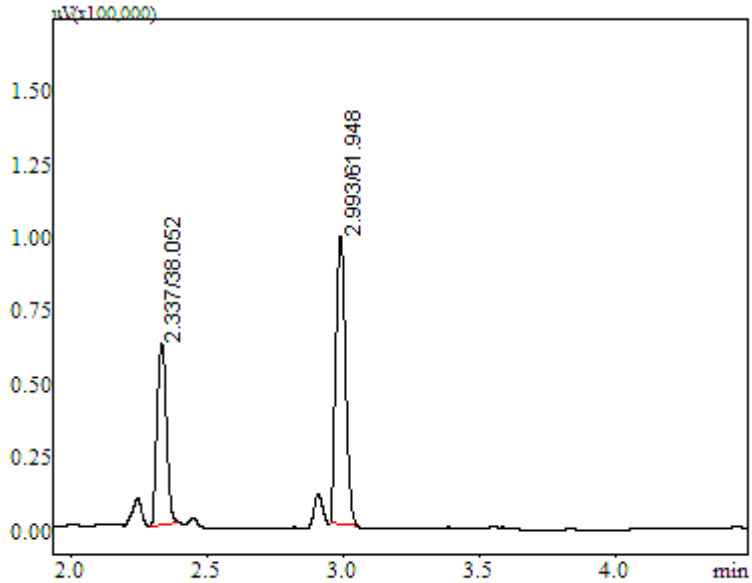
- Σχηματισμός της **1a** με εσωτερικό πρότυπο diglyme

(Αρχικά εκλούεται το υπεροξείδιο **1a** και στη συνέχεια το diglyme).

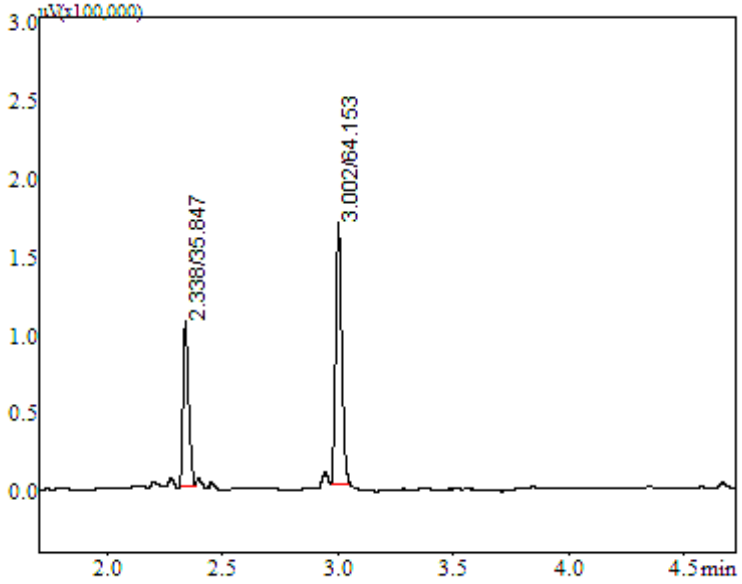
1a σε οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc)



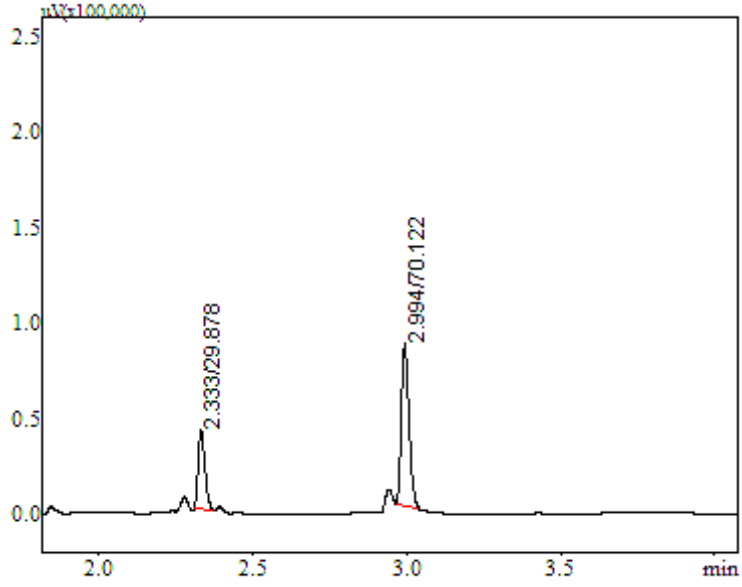
1a σε ακετονιτρίλιο (MeCN)



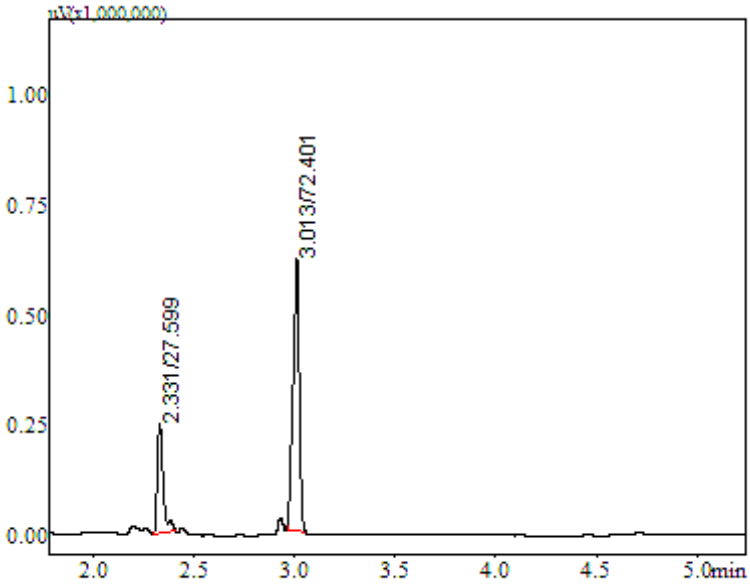
1a σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$)



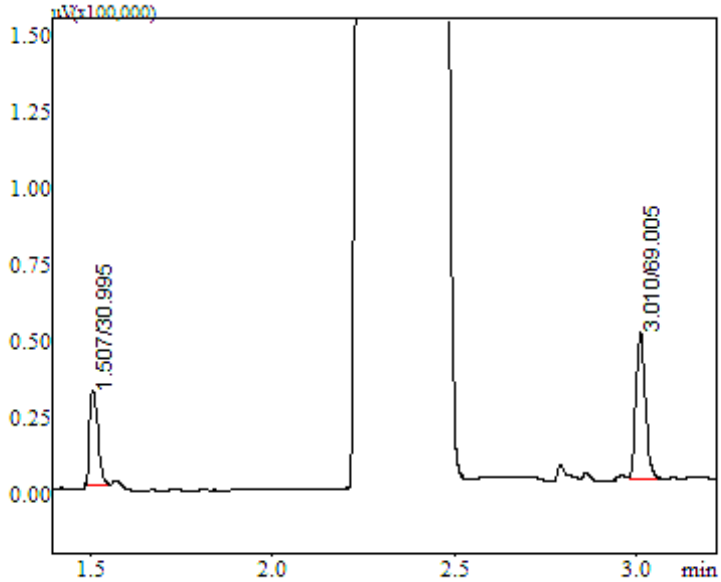
1a σε εξάνιο



1a σε τετραχλωράνθρακα (CCl_4)



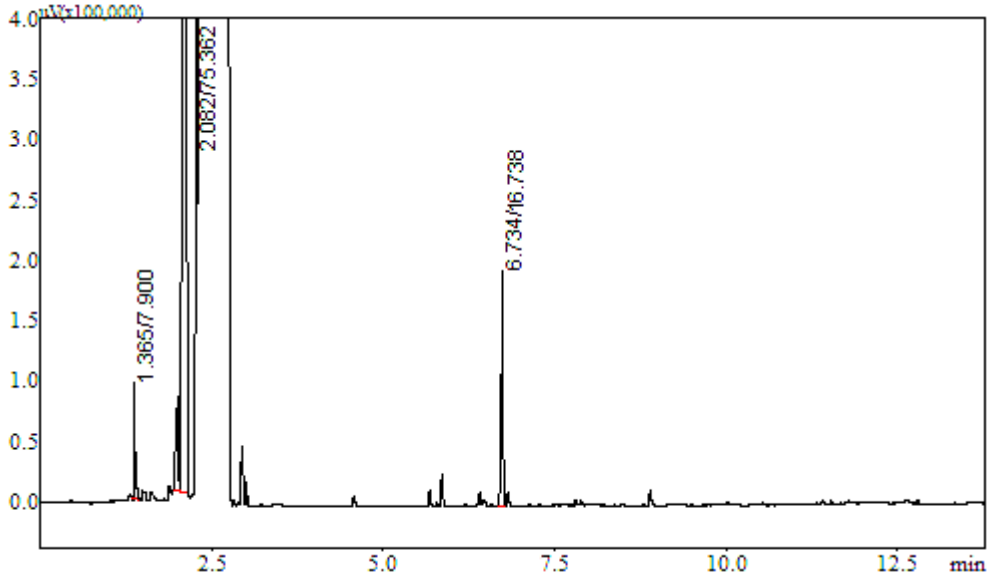
1b σε διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)



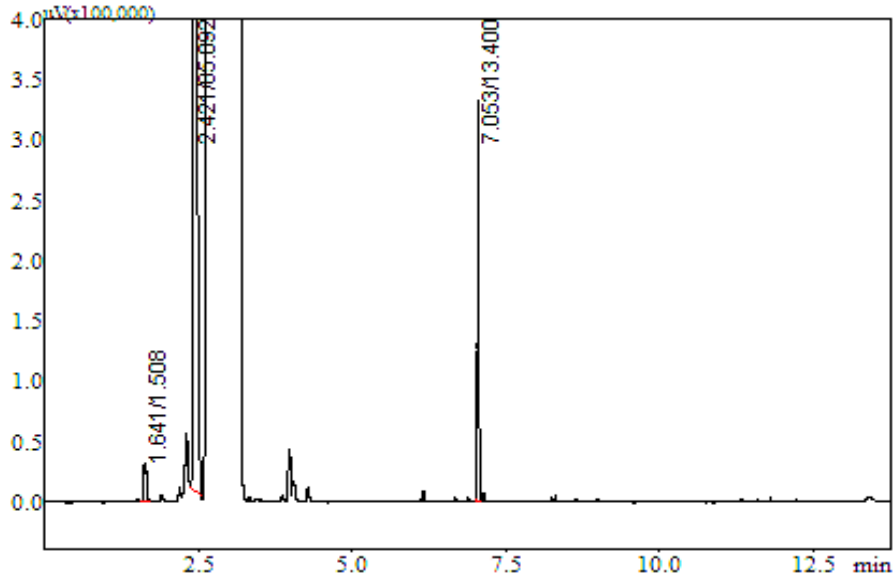
- Σύγκριση σχηματισμού **1a** με **1b**

(Αρχικά εκλούεται η ακετόνη **1c** στη συνέχεια το εναπομείναν **1** και τέλος το υπεροξείδιο **1a**)

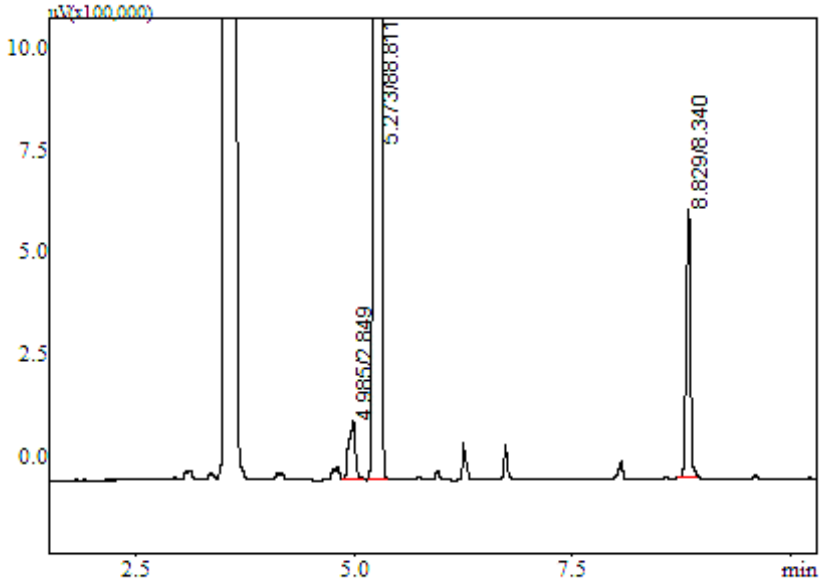
Σε τετραχλωράνθρακα (CCl_4)



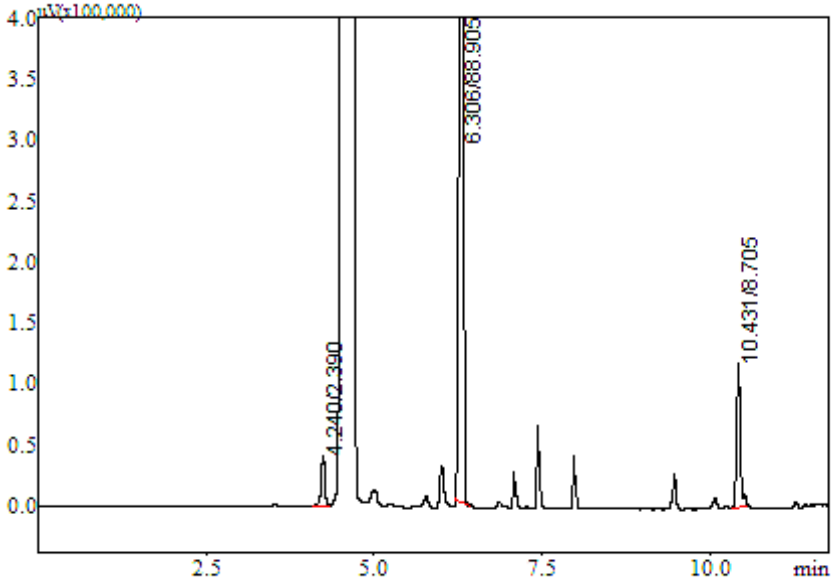
Σε βενζόλιο



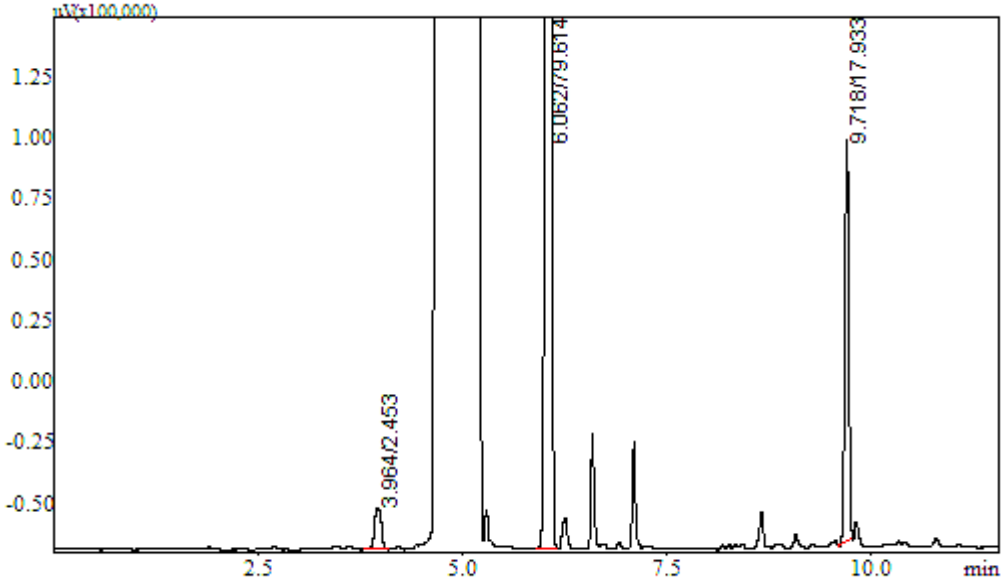
Σε διαιθυλαιθέρα



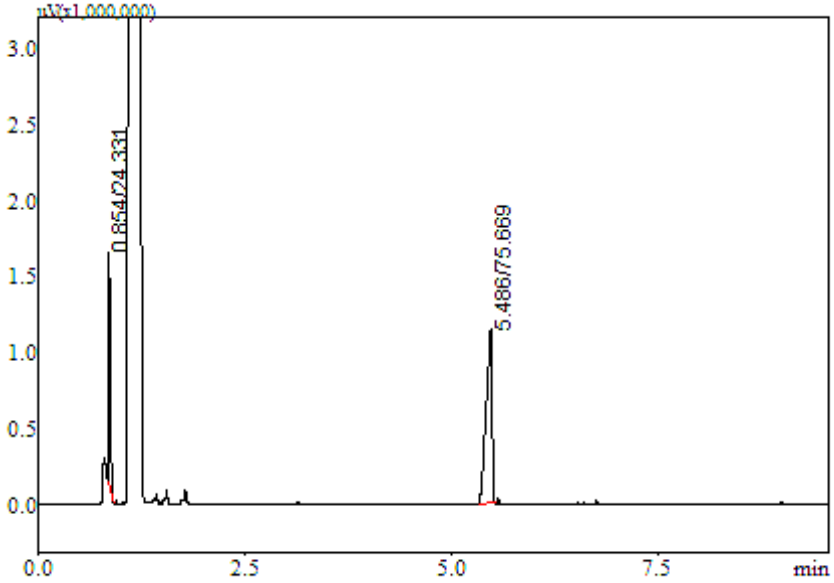
Σε διχλωρομεθάνιο



Σε εξάνιο



Σε χλωροφόρμιο



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΝΑΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

2.1. Εισαγωγή

2.1.1. Σκοπός της εργασίας

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιείται η μελέτη της καταλυτικής δράσης του ενθυλακωμένου αναγωγικού ενζύμου Kred112 σε νανοσωματίδια συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς, τα οποία συντέθηκαν μέσω ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού μεταφοράς ατόμου με την μέθοδο του εμβολιασμού μονομερών στυρενίου (grafting from) από κατάλληλο βιοεκκινητή. Η αντίδραση αναγωγής του ακόρεστου κέτο εστέρα (Ε)-3-οξο-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα χρησιμοποιήθηκε σαν μοντέλο για την απόδειξη της καταλυτικής ικανότητας του νανοαντιδραστήρα.

2.1.2. Βιοκατάλυση

Ο όρος βιοκατάλυση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και ορίζει τη χρήση ζωντανών (βιολογικών) συστημάτων ή μέρος αυτών για να επιταχύνουν (καταλύουν) χημικές αντιδράσεις. Στις βιοκαταλυτικές διεργασίες, οι φυσικοί καταλύτες, δηλαδή τα ένζυμα, εκτελούν χημικούς μετασχηματισμούς σε οργανικές ενώσεις. Στην πραγματικότητα η αξιοποίηση της βιοκατάλυσης γίνεται από την ανθρωπότητα από αρχαιοτάτων χρόνων (παραγωγή αλκοόλης, τυριού κτλ). Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο εξειδικευμένες χημικές ουσίες, όπως πρόσθετα τροφίμων, ακόμη και πρόδρομες ενώσεις για την σύνθεση πολυμερών σε μεγάλη κλίμακα παράγονται μέσω βιοκαταλυτικών διεργασιών. Το γεγονός αυτό καθιστά την Βιοτεχνολογία και την Βιοκατάλυση από τις πιο ανεπτυγμένες τεχνολογίες που εφαρμόζονται σε σημαντικούς τομείς όπως είναι η υγεία και το περιβάλλον.[58]

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσελκύσει η εφαρμογή της Βιοκατάλυσης στην Οργανική Σύνθεση. Στόχος των νέων τεχνολογιών που αναπτύσσονται στον τομέα της οργανικής χημείας είναι η σύνθεση πολύτιμων ενώσεων με υψηλή οπτική καθαρότητα και υψηλές χημικές αποδόσεις. Προϋπόθεση για την σύνθεση αυτών των ενώσεων είναι η χρήση μεθοδολογιών σύνθεσης που εκτός από απλές και αποδοτικές, θα πρέπει να είναι οικονομικά και περιβαλλοντικά αποδεκτές. Στην πραγματοποίηση αυτών των στόχων η Βιοκατάλυση

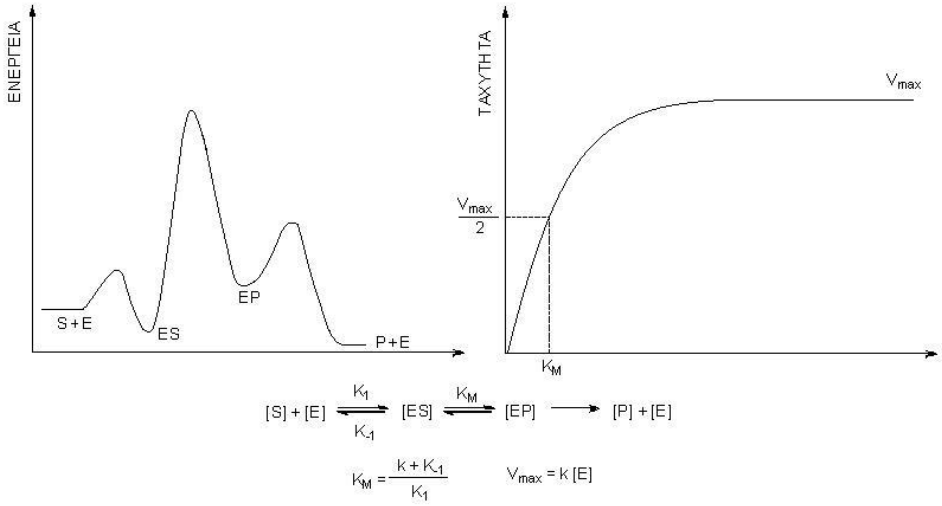
αντιπροσωπεύει μια καθοριστική εναλλακτική προσέγγιση. Η εφαρμογή της στην σύνθεση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας συμβάλλει ουσιαστικά στη μεταβολή των παραγωγικών προτύπων και στην υιοθέτηση των αρχών της Πράσινης Χημείας,[59] αφού οι βιοκαταλυτικές διεργασίες είναι εγγενώς καθαρές και φιλικές προς το περιβάλλον. Οι ήπιες συνθήκες (pH, θερμοκρασία, υδατικά διαλύμτα) και η αποφυγή τοξικών αντιδραστηρίων που αντικαθιστώνται με τη χρήση ενζύμων ή μικροοργανισμών, μειώνουν σημαντικά τη παραγωγή ρύπων και αποβλήτων, ενώ πολλές κλασικές χημικές μέθοδοι απλοποιούνται και αναβαθμίζονται από τεχνικής άποψης, αλλά και από άποψη χρόνου και κόστους. Επίσης, η Βιοκατάλυση επιτρέπει την σύνθεση οπτικά ενεργών φαρμακευτικών ενδιαμέσων και άλλων πολύτιμων ενώσεων. Η δυνατότητα σύνθεσης χειρόμορφων ενώσεων καθιστά την Βιοκατάλυση σπουδαίο εργαλείο στην μοντέρνα οργανική σύνθεση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα αυστηρά μέτρα που υιοθετήθηκαν από την Διεύθυνση Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, όπου εγκρίνονται μόνο φάρμακα που έχουν συντεθεί σε εναντιομερικώς καθαρή μορφή, επιβεβαιώνουν τον σημαντικό ρόλο της Βιοκατάλυσης στην σύνθεση φαρμάκων.[60]

Όλα αυτά καθιστούν την εφαρμογή της Βιοκατάλυσης πολύ απαραίτητη στην οργανική σύνθεση, ιδιαίτερα έπειτα από τις νέες κοινωνικοπολιτικές απαιτήσεις, οι οποίες στρέφονται σε φιλικότερες προς το περιβάλλον διεργασίες για την σύνθεση οργανικών ενώσεων υψηλής προσπθέμενης αξίας, αφού η χρήση των βιοκαταλυτών συμβάλλει όχι μόνο στην απλοποίηση των σταδίων μιας αντίδρασης αλλά και στην αποφυγή χρήσης σε μεγάλο βαθμό τοξικών αντιδραστηρίων και διαλυτών. Επιπλέον, τα προϊόντα που προκύπτουν από μια βιοκαταλυτική μετατροπή χαρακτηρίζονται για την υψηλή τους καθαρότητα και τις υψηλές χημικές αποδόσεις. Για όλους αυτούς τους λόγους, πραγματοποιούνται σημαντικές προσπάθειες από πολλές ερευνητικές ομάδες να αντικαταστήσουν ή να συμπληρώσουν κλασικές χημικές μεθόδους με βιοκαταλυτικές διεργασίες. Η αντικατάσταση όμως μιας συνθετικής πορείας από μια βιοκαταλυτική, προϋποθέτει το προϊόν που προκύπτει να είναι ίδιας η καλύτερης ποιότητας, ενώ το κόστος παραγωγής να είναι ελαττωμένο. Η χρήση των ενζύμων αρκετές φορές καλύπτει αυτές τις ανάγκες, γεγονός που καθιστά την Βιοκατάλυση σημαντική

εναλλακτική μέθοδο που εφαρμόζεται από τους σύγχρονους οργανικούς χημικούς.

2.1.3. Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι στην πλειοψηφία τους πρωτεΐνες με φυσική αποστολή την κατάλυση των οργανικών αντιδράσεων στους ζωντανούς οργανισμούς. Όπως συμβαίνει με όλες τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα διαθέτουν μια καθορισμένη τεταρτοταγή δομή, μια τρισδιάστατη δομή που επιτρέπει την πρόσδεση υποστρωμάτων με την κατάλληλη διευθέτηση στο χώρο. Ο σκοπός τους in vivo είναι η αύξηση της ταχύτητας των βιοχημικών αντιδράσεων σε τέτοιο επίπεδο ώστε να υποστηρίζεται η ζωή.



Εικόνα 2.4 Κινητική ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης (Michaelis Menten). Διαγράμματα Ενέργειας και Ταχύτητας ως προς συγκέντρωση υποστρώματος. S=υπόστρωμα, E=ένζυμο, ES=σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος, EP=σύμπλοκο ενζύμου προιόντος, P=προϊόν

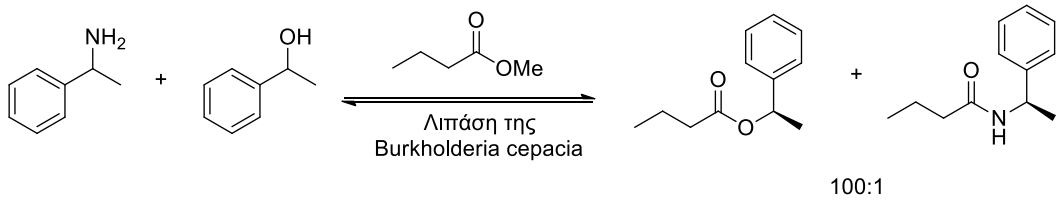
Η δραστικότητά τους in vitro μπορεί να αξιοποιηθεί είτε μέσα στον οργανισμό, (whole-cell), είτε μετά από την απομόνωση τους, σε καθαρή μορφή. Η ικανότητά τους να εκτελούν δύσκολες συνθετικές μετατροπές αποτελεί ένα αρκετά χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των οργανικών χημικών.

Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση ότι τα ένζυμα δεν είναι αποτελεσματικά, επειδή θεωρείτο πως είναι ενεργά μόνο για το ένα, φυσικό τους υπόστρωμα και δραστικά μόνο στο φυσικό τους περιβάλλον, αλλά και ότι είναι ευαίσθητα και ακριβά. Τέτοιες προκαταλήψεις έχουν ξεπεραστεί, και πλέον τα ένζυμα είναι

καθιερωμένοι, αξιόλογοι και εύχρηστοι καταλύτες στον τομέα της οργανικής σύνθεσης, αφού έχουν αξιόλογη σταθερότητα και είναι σε θέση να καταλύουν αντιδράσεις με ποικίλους τύπους υποστρωμάτων ακόμα και σε οργανικό περιβάλλον. Έχουν εξαιρετική καταλυτική δράση αφού μπορούν να επιταχύνουν αντιδράσεις 10^8-10^{10} φορές περισσότερο σε σχέση με μη ενζυμικές αντιδράσεις ενώ παράλληλα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί βιοκαταλύτες σε αντίθεση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μετάλλων. Τα ένζυμα δρουν σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας (20 – 40°C) και pH (5 – 8). Έχουν μια μεγάλη ποικιλία αποδεκτών υποστρωμάτων και έτσι μπορούν ακόμη να καταλύσουν και αντιδράσεις με μη φυσικά υποστρώματα, συμβάλλοντας σημαντικά στην οργανική σύνθεση. Επίσης, η εκ φύσεως ασυμμετρία που παρουσιάζουν, συνεπάγεται και στην ασύμμετρη παραγωγή ενώσεων με μεγάλη οπτική καθαρότητα. Οι ενζυμικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από:

- *Χημειοεκλεκτικότητα*

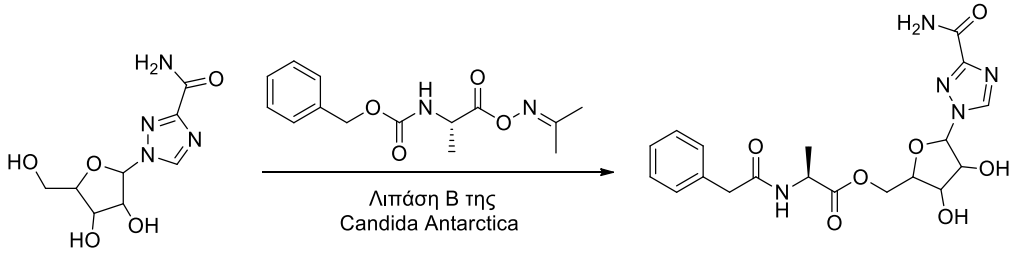
Η ενζυμική κατάλυση στοχεύει και δρα εκλεκτικά σε μια λειτουργική ομάδα ανάμεσα σε διαφορετικές χωρίς την μετατροπή εξίσου δραστικών ομάδων (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1 Χημειοεκλεκτική μετεστεροποίηση της λιπάσης burkholderia cepacia.[61]

- *Τοποεκλεκτικότητα*

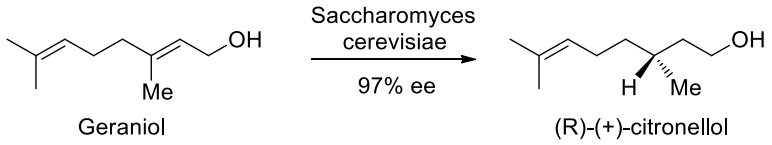
Τα ένζυμα μπορούν να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες και να δρουν σε μια από αυτές, ανάλογα με τη θέση στην οποία βρίσκεται στο υπόστρωμα (Σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2 Τοποεκλεκτική αντίδραση με λιπάση Candida antarctica B.[62]

- *Εναντιοεκλεκτικότητα*[63]

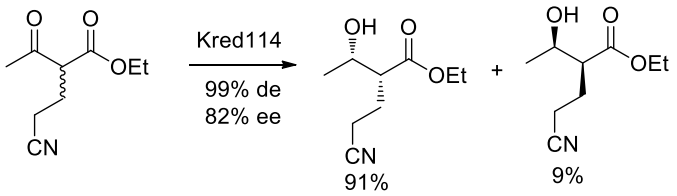
  Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να διακρίνουν και να δρουν σε ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος, ή σε μια εναντιοτοπική επιφάνεια ή ομάδα ενός μορίου (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3 Εναντιοεκλεκτική αναγωγή σε έναν διπλού δεσμό της γερανιόλης από τον Saccharomyces cerevisiae.[64]

- *Διαστερεοεκλεκτικότητα*.[65]

  Τα ένζυμα έχουν επίσης την ικανότητα να διακρίνουν και να δρουν σε ένα από τα διαστερεομερή ενός μίγματος ή σε μια από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4 Διαστερεοεκλεκτική αναγωγή κετόνης από την Kred114.[66]

Με την εξέλιξη της βιοτεχνολογίας υπάρχει πλέον η δυνατότητα του πρωτεϊνικού σχεδιασμού (rational protein design) και η κατευθυνόμενη εξέλιξη (directed evolution), τεχνικές που έχουν βοηθήσει στην αύξηση της δραστικότητας των ενζύμων σε περισσότερα υποστρώματα, πέραν του φυσικού τους, αλλά και στην αύξηση της εκλεκτικότητας και στην βελτίωση της σταθερότητας τους.[67] Οι παραπάνω λόγοι καθιστούν τη χρήση των ενζύμων κάποιες φορές αναγκαία στη σύνθεση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί στις παρακάτω κατηγορίες[68] (Πίνακας 2.1) με βάση το είδος της αντίδρασης που καταλύουν:

Πίνακας 2.7 Κατηγοριοποίηση των ενζύμων[58].

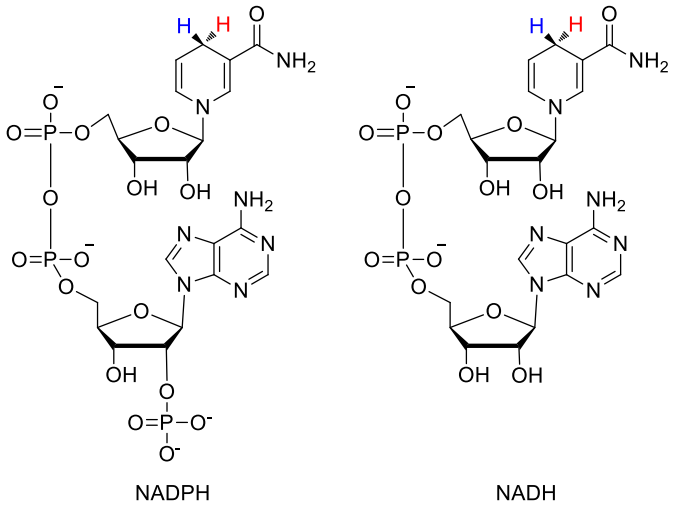
Κατηγορία Ενζύμου	Αντίδραση που καταλύουν
Οξειδορεδουκτάσες	Οξειδοαναγωγή και μεταφορά υδρογόνου
Τρανσφεράσες	Μεταφορά λειτουργικών ομάδων μεταξύ μορίων
Υδρολάσες	Υδρόλυση αμιδίων – πεπτιδίων και εστέρων
Λυάσες	Προσθήκη σε διπλό δεσμό και απόσπαση
Ισομεράσες	Ισομερίωση διπλών δεσμών και ρακεμοποίηση
Λιγάσες	Σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C
Τρανσλοκάσες	Μεταφορά ιόντων η μορίων μέσα από μεμβράνες

Στην εργασία αυτή οι μελέτες που περιγράφονται πραγματοποιήθηκαν με συγκεκριμένη κετορεδουκτάση (οξειδοαναγωγικό ένζυμο), μελετημένη στο παρελθόν απο την ερευνητική μας ομάδα σε αντιδράσεις ασύμμετρης αναγωγής δικαρβόνυλο υποστρωμάτων με μεγάλη δραστικότητα και υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα.

2.1.4. Κετορεδουκτάσες

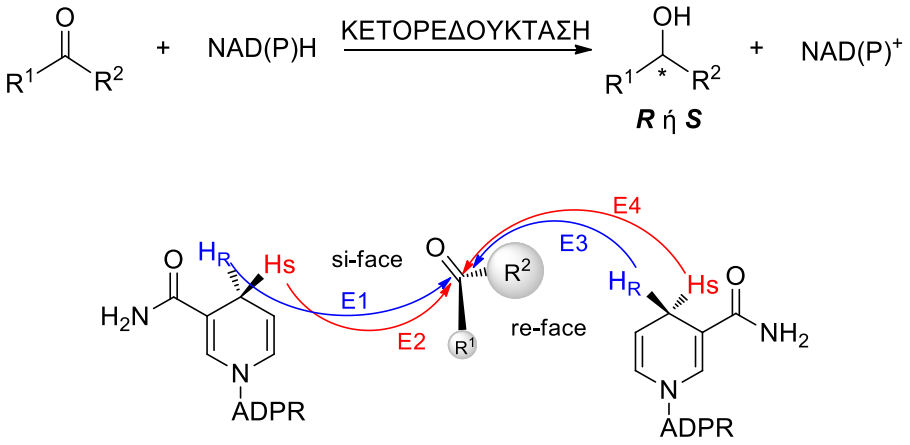
Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα συνήθως με χαμηλό μοριακό βάρος, ταξινομούνται στην κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Είναι ένζυμα ευρέως διαδεδομένα στη φύση και απομονώνονται από φυτά, βακτήρια, ψάρια αλλά κι από θηλαστικά[69] όπως άνθρωποι, κουνέλια και ποντίκια. Τα ένζυμα αυτά έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς από φυτικά και ζωικά κύτταρα. Αυτή η οικογένεια ενζύμων περιλαμβάνει μονομερή NADPH-εξαρτώμενων οξειδορεδουκτασών, όπως αναγωγάσες αλδεϋδών, συνθάση προσταγλανδίνης F και ξυλόζη-αναγωγάση. Δομούνται από βήτα-άλφα-βήτα πτυχώσεις, που περιλαμβάνουν μια ομάδα δεσμευτική για το NADPH. Οι κετορεδουκτάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθαρή μορφή, μετά από την απομόνωσή τους, οπότε απαιτείται η προσθήκη του απαραίτητου συνενζύμου για

την πραγματοποίηση της καταλυτικής τους δράσης. Η φυσική αποστολή αυτών των ενζύμων είναι η κατάλυση της αναγωγής των φυσικών καρβονυλικών ενώσεων, όμως μπορούν να ανάγουν ενατιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα κετονών και δικαρβονυλικών ενώσεων για την παραγωγή οπτικά ενεργών δευτεροταγών αλκοολών, που μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομες ενώσεις για οπτικώς ενεργά φάρμακα και φυσικά προϊόντα.[70] Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα συνένζυμα που απαιτούνται είναι το NADH ή το NADPH. Οι ενώσεις αυτές φέρουν το δραστικό υδρίδιο και συμμετέχουν στον μηχανισμό δράσης των αναγωγικών ενζύμων.



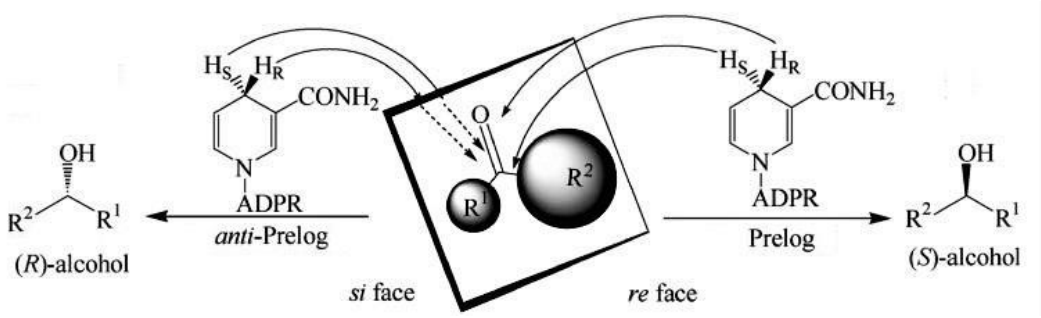
Σχήμα 2.5 Ανηγμένο νικοτιναμίδιο αδένινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο (NADPH) και ανηγμένο νικοτιναμίδιο αδένινο δινουκλεοτίδιο (NADH).

Προκύπτουν τέσσερις διαφορετικοί μηχανισμοί (τέσσερις κατηγορίες) ανάλογα με τη πλευρά του υποστρώματος στην οποία θα αποδοθεί το υδρίδιο του NAD(P)H από το ένζυμο.[71] Το υδρίδιο μπορεί να μεταφερθεί από το συνένζυμο στην si-face του καρβονυλικού υποστρώματος και αυτό να είναι το pro-R υδρογόνο (E1) ή το pro-S υδρογόνο (E2) του συνενζύμου. Επίσης, το υδρίδιο μπορεί να μεταφερθεί προς την re-face είτε και πάλι από το pro-R υδρογόνο (E3) είτε το pro-S (E4) (Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6 Μηχανισμός δράσης κετορεδουκτασών.

Οι περισσότερες αλκοολικές αφυδρογονάσες, πλην κάποιων εξαιρέσεων, ανήκουν στην κατηγορία Ε3 σχηματίζοντας S δευτεροταγείς αλκοόλες, με το υδρίδιο δηλαδή να προσεγγίζει από την re-face της προς αναγωγή καρβονυλομάδας. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει τις περισσότερες φορές να προβλέψουμε τη στερεοχημεία του προϊόντος με βάση τον κανόνα του Prelog. Σύμφωνα με τον κανόνα του Prelog, κατά την αναγωγή κετονών που φέρουν υποκαταστάτες διαφορετικού μεγέθους, με αλκοολικές αφυδρογονάσες σχηματίζονται οι S αλκοόλες. Οι περισσότερες γνωστές απομονωμένες αλκοολικές αφυδρογονάσες υπακούουν τον κανόνα αυτό, οδηγώντας στο σχηματισμό S αλκοολών. Περιορισμένος αριθμός αφυδρογονασών οδηγούν στο σχηματισμό R αλκοολών, τα λεγόμενα ένζυμα με anti-Prelog εκλεκτικότητα..[72]



Σχήμα 2.7 Μηχανισμός σχηματισμού S και R αλκοολών από τα αναγωγικά ένζυμα με βάση τον κανόνα του Prelog .

2.1.5. Ακινητοποιημένα Ένζυμα

Ακινητοποιημένα ορίζονται τα ένζυμα τα οποία περιορίζονται σε μια ορισμένη περιοχή του χώρου με ταυτόχρονη διατήρηση της καταλυτικής τους δράσης και με δυνατότητα επανειλημμένης χρήσης τους. Αυτό σημαίνει ότι κατά την πρόσδεσή τους σε ένα αδιάλυτο φορέα ή την ενθυλάκωσή τους σε μία πολυμερική μήτρα, τα ένζυμα παύουν να είναι διαλυτά και επομένως είναι εύκολη η επαναχρησιμοποίησή τους. Το γεγονός αυτό μπορεί κάποιες φορές να επηρεάσει σημαντικά τις φυσικές ιδιότητες των βιολογικών καταλυτών.[73]

Ένα από τα πρώτα παραδείγματα ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών είναι η προσρόφηση του ζυμομύκητα της ινβερτάσης σε ξυλοκάρβουνο πριν από 100 χρόνια, όπου το ένζυμο παρέμεινε ενεργό και κατέλυε την υδρόλυση της σουκρόζης (Nelson και Griffin).[74] Κάποιες δεκαετίες αργότερα η σημασία των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών αναγνωρίστηκε χάρη στις έρευνες των Grubhofer και Schleinth,[75] Bernfeld και Wan,[76] και Katchalski-Katzir.[77]

Η ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών μπορεί να βρει εφαρμογές στην οργανική σύνθεση και είναι σημαντική από οικονομικής άποψης λόγω της επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη. Ακόμη, η τεχνολογία αυτή βρίσκει εφαρμογή στην κατασκευή βιοαισθητήρων και στην επεξεργασία λυμάτων.[78] Ένας συνδυασμός βιοκατάλυσης – νανοτεχνολογίας έχει βρει επίσης εφαρμογή στην θεραπεία ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος.[79] Τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν αρκετά πλεονεκτήματα. Μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν αρκετές φορές και αποκτούν σταθερότητα.

Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι ακινητοποίησης ενός ενζύμου: μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης ή μέσω φυσικής σταθεροποίησης με ασθενείς αλληλεπιδράσεις. Η ομοιοπολική πρόσδεση απαιτεί χημικές αντιδράσεις – μετασχηματισμούς μεταξύ συγκεκριμένης θέσης του ενζύμου και του αντιδραστηρίου σύνδεσής του, ενώ η φυσική σταθεροποίηση προσφέρει το πλεονέκτημα μιας εύκολης μεθόδου ακινητοποίησης, αφού ο μηχανισμός σύνδεσης δεν εξαρτάται από κάποια συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης. Έχει αποδειχθεί ότι με την ακινητοποίηση του βιοκαταλύτη σε ένα υλικό με επιθυμητές φυσικές, χημικές, ηλεκτρικές ή μηχανικές ιδιότητες μπορεί να βελτιωθεί η δραστικότητα και η σταθερότητα του ενζύμου σε

ένα ευρύ φάσμα συνθηκών, ενώ ακόμα μπορούν να αναπτυχθούν νέες λειτουργικότητες ανάλογα με τη μέθοδο ακινητοποίησης και τις εγγενείς ιδιότητες των υλικών που χρησιμοποιούνται σε μια τέτοια διαδικασία.[80] Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ακινητοποιημένων ενζύμων.

Πίνακας 2.8 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ακινητοποιημένων ενζύμων.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Συνεχείς χρήσεις	Κίνδυνος απώλειας ενζυμικής δραστικότητας
Βελτιστοποίηση σταθερότητας σε ευρύτερο φάσμα λειτουργιών συνθηκών	Ακινητοποίηση του ενζύμου σε ανεπιθύμητη διαμόρφωση και επακόλουθη απώλεια δραστηριότητας
Εύκολος διαχωρισμός ενζύμου προϊόντος	Κόστος πρόσθετων υλικών και μεθόδων προετοιμασίας
Επαναχρησιμοποίηση ενζύμου	Χρονοβόρα διαδικασία σταθεροποίησης

Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε απο την ερευνητική μας ομάδα, σε συνεργασία με την ομάδα του καθηγητή Martin Rebros απο το Πανεπιστήμιο Τεχνολογίας της Σλοβακίας, μελέτη ακινητοποίησης κετορεδουκτάσης και αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH), χρησιμοποιώντας την τεχνολογία παγίδευσης σε υδρογέλη πολυβίνυλο αλκόολης (PVA) και πολυαιθυλενογλυκόλης. Τα παγιδευμένα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για 18 επανειλημμένες μετατροπές του 2-μεθυλακετοξικού αιθυλεστέρα με σύστημα αναγέννησης του NADPH. Αυτή η μέθοδος ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε μια αλληλουχία δύο ενζύμων. Τα σωματίδια διατήρησαν περίπου το 80% της δραστικότητάς τους, μετά από σχεδόν 10 μήνες αποθήκευσης με την υψηλότερη σταθερότητα των ακινητοποιημένων κετορεδουκτασών που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα.[81]

2.1.6. Ενθυλάκωση Ενζύμων

Ενθυλάκωση ενζύμων είναι η ακινητοποίηση ενός βιοκαταλύτη σε φορείς διαφόρων βαθμών διαπερατότητας. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα μέσω ενθυλάκωσης παρουσιάζουν βελτιωμένη σταθερότητα λόγω έλεγχου του μικροπεριβάλλοντός τους, αλλά επίσης είναι και περισσότερο καταλυτικά ενεργά σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε οργανικούς διαλύτες, ενώ ακόμη διαχωρίζονται εύκολα από το μίγμα της αντίδρασης υποστρώματος-προϊόντος.[82] Η ακινητοποίηση μέσω παγίδευσης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μια ποικιλία φορέων, (όπως κολλοειδείς πηκτές, υδροπηκτές, πολυμερή, νανοϋλικά) και έχει ερευνηθεί για την αξιοποίηση των βιοκαταλυτών στη σύνθεση των οργανικών ενώσεων αλλά και για νέα συστήματα βιοαισθητήρων.[83] Ένα βιβλιογραφικό παράδειγμα αποτελεί η ενθυλάκωση της καταλάσης του ήπατος των βοοειδών. Η ερευνητική ομάδα του Singh μελέτησε τις φαινομενικές κινητικές και σταθεροποιητικές επιδράσεις της ενθυλάκωσης της καταλάσης σε νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (HSNPs) όταν επετεύχθη μια απόδοση ακινητοποίησης σχεδόν 100%. Με περαιτέρω μελέτη αποδείχθηκε ότι η τεχνική ενθυλάκωσης μείωσε τη δραστικότητα τόσο του ενζύμου όσο και τη συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος, ωστόσο, η ενθυλακωμένη καταλάση εμφάνισε σημαντικά βελτιωμένη σταθερότητα σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH και συνθηκών θερμοκρασίας.[84] Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η παγίδευση ενζύμου σε βιοσυμβατά νανοσωματίδια και στερεά υποστρώματα είναι μια νέα προσέγγιση για τη βελτίωση της ενζυμικής δραστηριότητας εξαιτίας των ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φορέα και του βιοκαταλύτη. Μελέτες σχετικά με την παγίδευση ενζύμων σε στερεούς φορείς έχουν δείξει ότι η βέλτιστη ακινητοποίηση είναι δυνατόν να "κλειδώσει" τα ακινητοποιημένα ένζυμα σε περισσότερο καταλυτικά ενεργές διαμορφώσεις.[85]

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιείται προκαταρκτική μελέτη της καταλυτικής δράσης μιας εμπορικά διαθέσιμης κετορεδουκτάσης όταν αυτή ενθυλακώνεται σε νανοσωματίδα αμφίφιλων μορίων πρωτεΐνης-πολυμερούς. Ο μελλοντικός σκοπός αυτής της μελέτης είναι η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του νανοαντιδραστήρα της κετορεδουκτάσης σε επιλέον καταλυτικούς κύκλους, με ικανοποιητική δραστικότητα και ικανοποιητική εναντιομερική περίσσεια των

παραγόμενων προϊόντων. Παράλληλα σχεδιάζεται η μελέτη της δράσης του συστήματος αυτού σε οργανικό περιβάλλον.

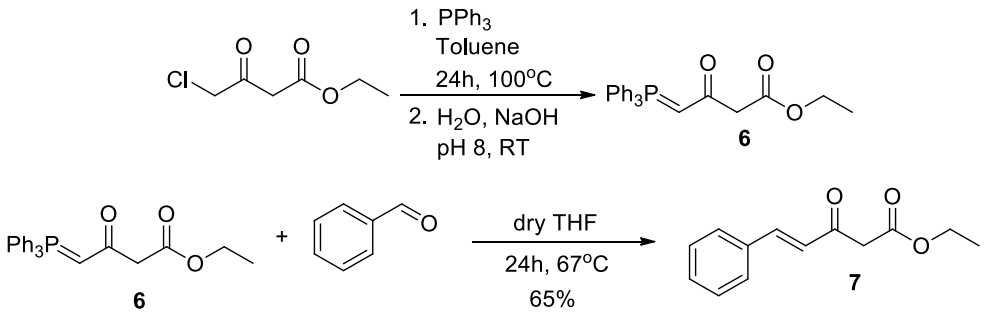
2.2. Συζήτηση και Αποτελέσματα

2.2.1. Κλασική ενζυμική αναγωγή με NADPH-εξαρτώμενη κετορεδουκτάση

Βασισμένοι σε προηγούμενες εκτενείς μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας σε αντιδράσεις στερεοεκλεκτικής αναγωγής σε ποικιλία καρβόνυλο ενώσεων (α-μονο- ή δι-υποκατεστημένων-1,3-δικετονών, β-κετοεστέρων και α-υποκατεστημένων β-κετοεστέρων) με σειρά NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών, για τον σχεδιασμό και την πραγματοποίηση των πειραμάτων ενθυλάκωσης, επιλέχθηκε μια κετορεδουκτάση με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Υπάρχει σε ικανοποιητική διαθεσιμότητα
- Παρουσιάζει αυξημένη καταλυτική δράση και σταθερότητα
- Τα προϊόντα αναγωγής σχηματίζονται με μεγάλη οπτική καθαρότητα.

Το ένζυμο επομένως που επιλέχθηκε είναι η Kred112, η οποία είναι μια NADPH εξαρτώμενη κετορεδουκτάση, που έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν από την ερευνητική μας ομάδα δείχνοντας μεγάλη δραστικότητα και υψηλή στερεοεκλεκτικότητα σε σχετικής δομής υποστρώματα. Για την μελέτη της κλασικής καταλυτικής δράσης του ενζύμου αυτού συντίθεται ο (E)-3-οξο-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκός αιθυλεστέρας (υπόστρωμα **7**) με μια αντίδραση Wittig μεταξύ του σταθεροποιημένου υλιδίου **6** και της βενζαλδεΰδης (Σχήμα 2.8).

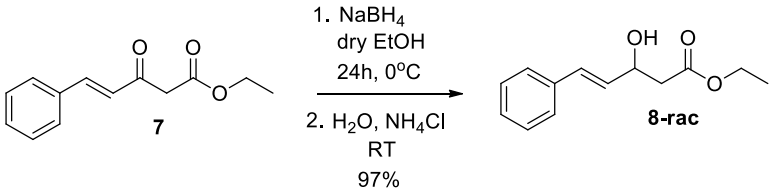


Σχήμα 2.8 Παρασκευή υποστρώματος **7**.

Το υπόστρωμα **7** χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπο υπόστρωμα στη μελέτη αυτή επειδή έχει αποδειχθεί από την ερευνητική μας ομάδα ότι η αναγωγή του από την Kred112 αποδίδει προϊόν με μεγάλη εναντιομερική περίσσεια, ενώ διευκολύνεται

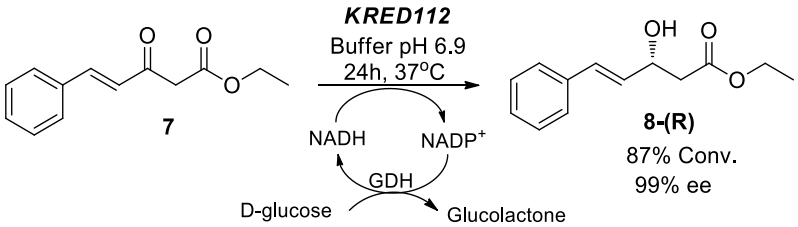
ο χρωματογραφικός προσδιορισμός των ανηγμένων εναντιομερών, λόγω της ογκώδους φαίνυλο ομάδας που διαθέτει.

Για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των εναντιομερών του ρακεμικού μίγματος πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή του υποστρώματος **7** με βοροϋδρίδιο του νατρίου.



Σχήμα 2.9 Χημική αναγωγή στο υπόστρωμα **7.**

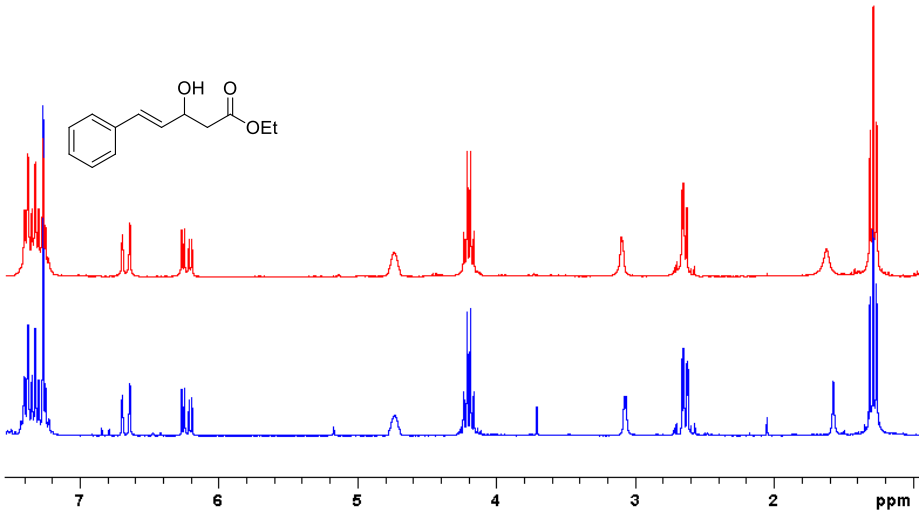
Στη συνέχεια πραγματοποήθηκε η ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **7** με την Kred112. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για την αναγέννηση του NADPH το οποίο καταναλώνεται κατά την αναγωγή, ήταν απαραίτητη η χρήση ενός ακόμα ενζύμου, της αφυδρογονάσης της γλυκόζης GDH. Η χρήση της GDH για την αναγέννηση του NADPH από το $NADP^+$ με την κατανάλωση γλυκόζης, αποτελεί ένα καλά μελετημένο σύστημα ανακύκλωσης της ανηγμένης μορφής του συνενζύμου[86] (Σχήμα 2.10). Η ενζυμική αναγωγή ολοκληρώθηκε με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (99% ee) και υψηλό ποσοστό μετατροπής (87%). (Σχήμα 2.10).



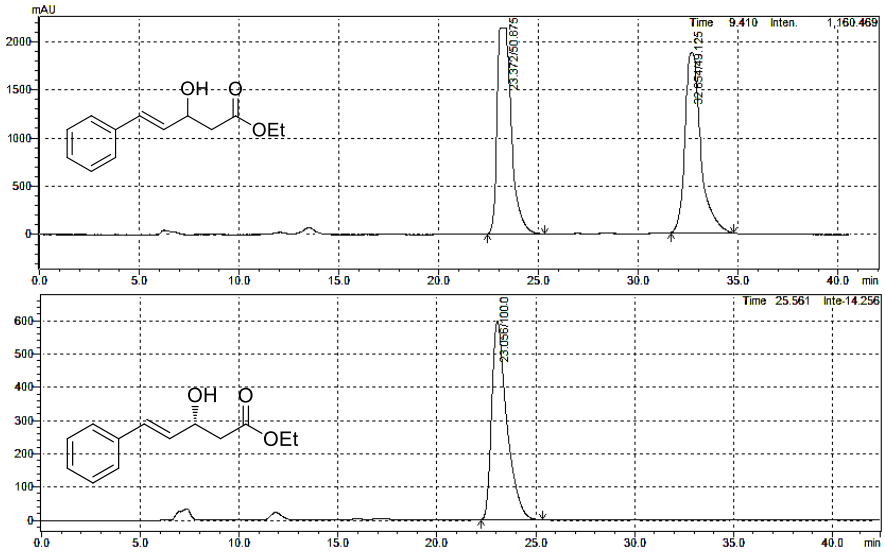
Σχήμα 2.10 Ενζυμική αναγωγή στο υπόστρωμα **7** με την Kred112.

Συγκρίθηκαν τα φάσματα ^{1}H-NMR των προϊόντων των δύο αναγωγικών αντιδράσεων, χημικής και ενζυμικής, ενώ για τον προσδιορισμό εναντιοεκλεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με χειρόμορφη κολώνα (HPLC). Από το χρωματογράφημα και με βάση

παλαιότερη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, αλλά και από τη βιβλιογραφία, παρατηρείται ο σχηματισμός του R εναντιομερούς[87] κατά την ενζυμική αναγωγή με την Kred112 (Σχήμα 2.10, Εικόνες 2.2 και 2.3).



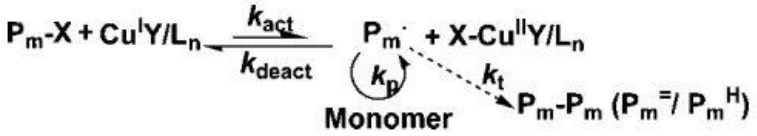
Εικόνα 2.5 Σύγκριση φασμάτων ^{1}H-NMR. Επάνω (κόκκινο): χημική αναγωγή Κάτω (μπλε): ενζυμική αναγωγή.



Εικόνα 2.6 Σύγκριση χρωματογραφημάτων HPLC. Επάνω: χημική αναγωγή Κάτω: ενζυμική αναγωγή

2.2.2. Σύνθεση αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυστυρενίου – Σχηματισμός Νανοαντιδραστήρα

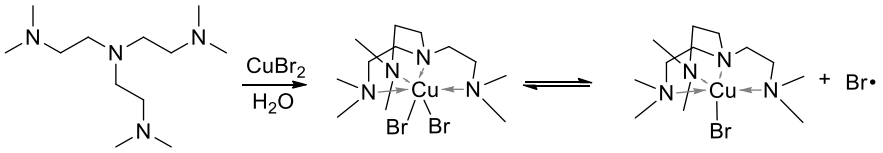
Η σύνθεση των γιγάντιων αμφίφιλων μορίων BSA-πολυστυρένιο πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του εμβολιασμού μονομερών στυρενίου (grafting from) από κατάλληλο βιοεκκινητή μέσω φωτοεπαγόμενου, ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού μεταφοράς ατόμου (ATRP) χωρίς απαέρωση του συστήματος.[88] Στον ATRP η απενεργοποίηση των ριζών περιλαμβάνει αναστρέψιμη μεταφορά ατόμων ή αναστρέψιμη μεταφορά ομάδας που καταλύεται συνήθως από σύμπλοκα μεταβατικών μετάλλων.



Σχήμα 2.11 Αποδεκτός μηχανισμός ATRP.[89]

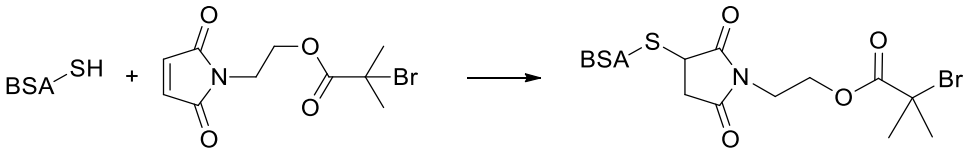
Ο πολυμερισμός στην δική μας μελέτη απαιτεί την χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για τον σχηματισμό ριζών, ενώ ο χαρακτήρας της αναστρέψιμης απενεργοποίησης οφείλεται στη προσθήκη του συμπλόκου χαλκού που παρασκευάζεται από τα αντιδραστήρια $CuBr_2$ και Me_6TREN πριν την έναρξη της αντίδρασης πολυμερισμού.[90,91] Το καθορίζον στάδιο της διαδικασίας αυτής είναι η επίτευξη της πλήρους αυτοοξειδοαναγωγής του $CuBr_2$ σε Cu(0) και πάλι $CuBr_2$. Ο Cu(I) είναι αρκετά ασταθής όσο αφορά την οξείδωση και υφίσταται ταχεία ανακατανομή σε Cu(0) και Cu(II) σε υδατικά και πολικά μέσα. Επιπλέον, τα αλογονίδια του χαλκού που χρησιμοποιούνται ευρέως έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και χωρίς την χρήση υποκαταστατών η ανακατανομή σε Cu(0) και Cu(II) δεν είναι αποτελεσματική. Η χρήση επομένως κατάλληλων σταθεροποιητών όπως είναι ένας π-δέκτης τροχιακών στον υποκαταστάτη βοηθούν τα αλογονίδια του χαλκού να συναρμόστούν για να σχηματίσουν υδατοδιαλυτά σύμπλοκα, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο υψηλές σταθερές ισορροπίας (~10^6).[90] Η μέθοδος ανακατανομής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την γεωμετρία του υποκαταστάτη και έτσι οι στερεοχημικά παρεμποδισμένοι υποκαταστάτες του Me_6TREN προκαλούν αποκλίσεις από την προτιμώμενη γεωμετρία, δημιουργώντας θέσεις συναρμογής για το νερό και το μονομερές. Η μέθοδος αυτή

επιτρέπει τον πολυμερισμό μονομερών προς το σχηματισμό πολυμερών με ελεγχόμενο μήκος αλυσίδας και στενές κατανομές μοριακού βάρους.[90]



Σχήμα 2.12 Σύμπλοκο χαλκού – Me_6TREN.

Ο βιοεκκινητής που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από την τροποποιημένη αλβουμίνη του ορού βοοειδών (BSA). Η φυσική BSA έχει μοριακό βάρος 66.4 kDa και αποτελείται από 583 αμινοξέα, με μια μόνο ελεύθερη κυστεΐνη (Cys34) στην εξωτερική της επιφάνεια.[92] Η πρωτεΐνη έχει προηγούμενα τροποποιηθεί (βιοεκκινητής) ώστε να φέρει οργανική ομάδα που δρα σαν εκκινητής του πολυμερισμού. Πιο συγκεκριμένα, ένα διλειτουργικό μόριο το οποίο φέρει στο ένα άκρο μαλεϊμιδο ομάδα και στο άλλο άκρο ένα κλασικό εκκινητή πολυμερισμού, έχει συνδεθεί ομοιοπολικά στην πρωτεΐνη μέσω αντίδρασης Michael με την ελεύθερη κυστεΐνη (Σχήμα 2.12).

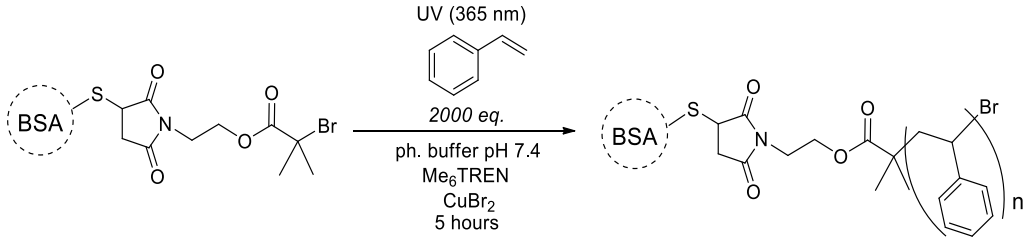


Σχήμα 2.13 Ομοιοπολική σύνδεση BSA και διλειτουργικού μαλεϊμιδο εκκινητή πολυμερισμού RDRP.

Η αντίδραση σύνθεσης του αμφίφιλων συζυγών BSA-πολυστυρενίου πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Συνθετικών Βιοϋλικών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών στα πλαίσια συνεργασίας, με μεθόδους που αναπτύσσονται από την επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου.[91,93]

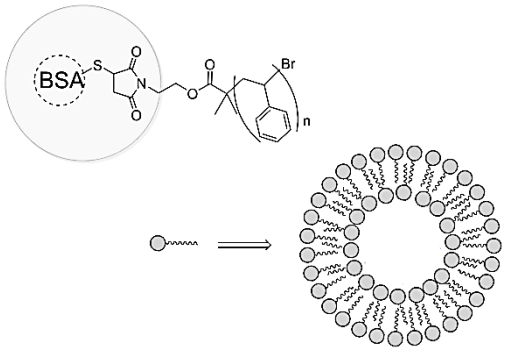
Ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε χωρίς προηγούμενη απαέρωση του συστήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία του βιοεκκινητή, του

συμπλόκου χαλκού-Me_6TREN, και στυρενίου κάτω από ακτινοβόληση στο υπεριώδες (365 nm) για 5 ώρες (Σχήμα 2.13).



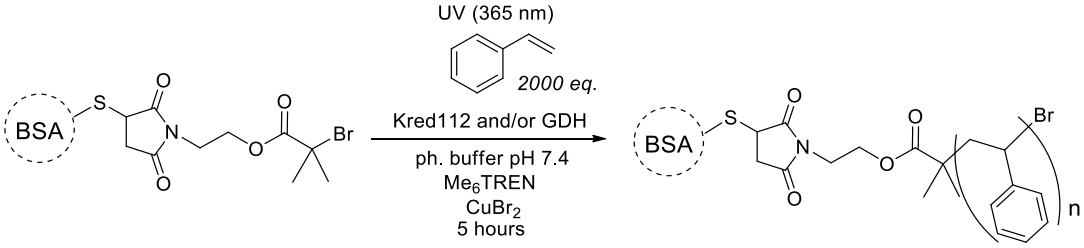
Σχήμα 2.14 Αντίδραση σύνθεσης αμφίφιλων συζυγών BSA-πολυστυρενίου.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού η σύνθεση των αμφίφιλων μορίων επάγει τον in situ σχηματισμό ιεραρχικά αυτοοργανωμένων νανοδοχείων[93], λόγω του ενδογενούς αμφιφιλου χαρακτήρα των νεοσχηματιζόμενων συζυγών BSA-πολυστυρενίου (Σχήμα 1.14).



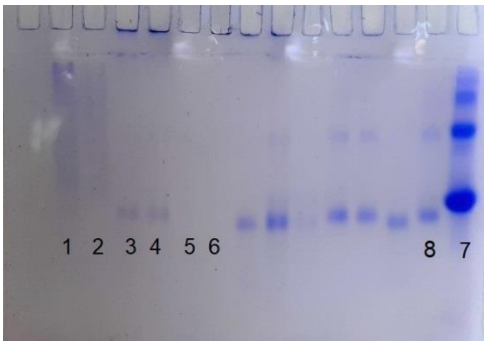
Σχήμα 2.15 Αναπαράσταση σχηματισμού νανοδοχείων από το αμφίφιλο βιοπολυμερές.

Η αυθόρμητη αυτοοργάνωση αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυστυρενίου σε καλά καθορισμένες σφαιρικές δομές, οδήγησε στον σχεδιασμό των προτεινόμενων νέων αντιδραστήρων για την κατασκευή των οποίων, η ενθυλάκωση της Kred112 ή/και της GDH στα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια, θα μπορούσε να επιτευχθεί απλά με την παρουσία των ενζύμων αυτών στο μίγμα της αντίδρασης πολυμερισμού (Σχήμα 2.15).

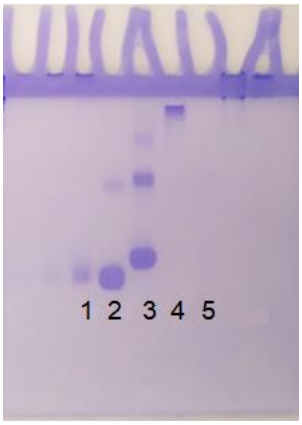


Σχήμα 2.16 Αντίδραση σχηματισμού αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυστυρενίου παρουσία Kred112 ή/και GDH.

Μετά το πέρας των αντιδράσεων έγινε απομάκρυνση του συμπλόκου χαλκού/Me_6TREN και της περίσσειας μονομερών στυρενίου με διαπίδυση ως προς διάλυμα φωσφορικών χρησιμοποιώντας μεμβράνες κυτταρίνης με MWCO 25 kDa. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των μη ενθυλακωμένων ενζύμων. Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου κάτω από μη-αποδιατακτικές συνθήκες (PAGE). Στην πρώτη ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 2.4) παρουσιάζεται η επιτυχής ενθυλάκωση της Kred112 όταν αυτή προστέθηκε στην αντίδραση πριν την έναρξη του πολυμερισμού, ενώ στη δεύτερη (Εικόνα 2.5) παρουσιάζετια και η ενθυλάκωση της GDH που πραγματοποιήθηκε σε δεύτερο πείραμα σε μια επιπλέον αντίδραση πολυμερισμού παρουσία και των δυο ενζύμων.



Εικόνα 2.4 Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου. 1-2: Kred112, 3-4: Ίζημα φυγοκέντρησης 5-6: Εναιώρημα φυγοκέντρησης, 7: BSA, 8. Εκκινητής

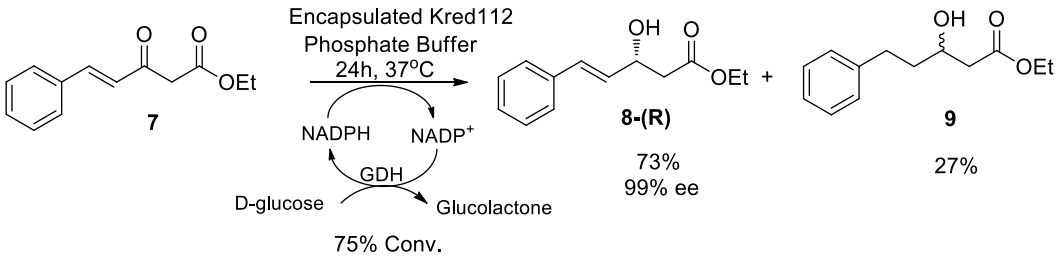


Εικόνα 2.5 Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου. 1: BSA-Πολυστυρένιο, 2: Βιοεκκινητής 3:BSA, 4:GDH, 5:Εναιώρημα φυγοκέντρησης.

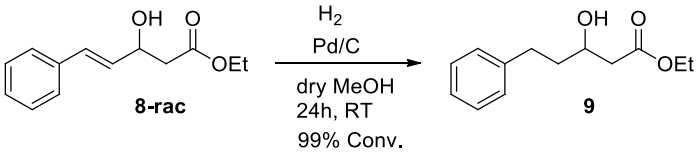
Από τις παραπάνω ηλεκτροφορήσεις (Εικόνες 2.4 και 2.5) παρατηρείται ο σχηματισμός μίας νέας μπάντας η οποία δεν μεταναστεύει μέσα στην γέλη και αποδίδεται στον σχηματισμό του αμφίφιλου συζυγούς BSA-πολυστυρενίου. Επιπλέον, το προϊόν της αντίδρασης πολυμερισμού / ενθυλάκωσης δεν εμφανίζει μπάντες που να αντιστοιχούν είτε στο αναγωγικό ένζυμο (Θέση 1-2 Εικόνα 2.4), ενώ ποσότητα εκκινητή BSA-BR (Θέση 8, Εικόνα 2.4) υπάρχει σε μικρή ποσότητα. Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι τόσο η Kred112 όσο και η GDH έχουν εγκλειστεί στα νανοσωματίδια του βιοϋβριδίου BSA-πολυστυρενίου και ότι η περίσσεια των μη εγκλεισμένων ενζύμων έχει απομακρυνθεί επιτυχώς. Τα πειράματα χαρακτηρισμού του νανοαντιδραστήρα με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών είναι ακόμη σε εξέλιξη.

2.2.3. Κατάλυση με τη χρήση του ενθυλακωμένου ενζύμου

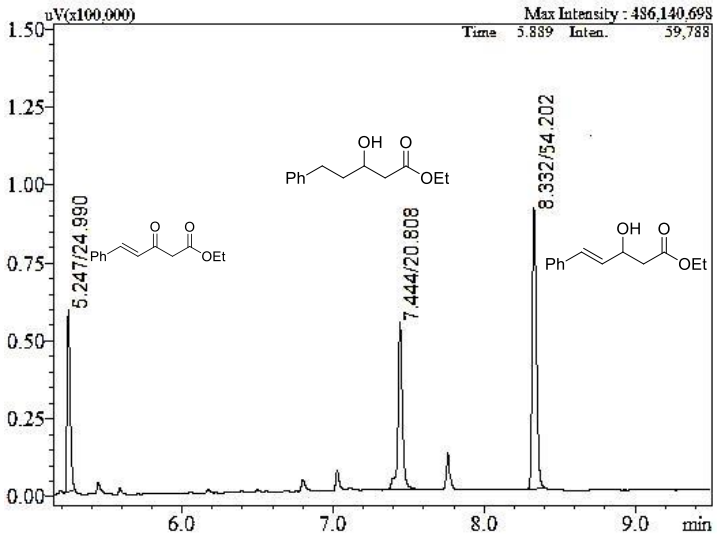
Επόμενο βήμα είναι το πείραμα της καταλυτικής αναγωγής του υποστρώματος **7** με τη χρήση των νεοσχηματιζόμενων νανοαντιδραστήρων. Η αντίδραση πραγματοποιείται στις ίδιες συνθήκες με τη κλασική ενζυμική αντίδραση που προηγήθηκε, είτε με συμπαράγοντα NADPH είτε με $NADP^+$ από την αρχή της αντίδρασης κατάλυσης. Σε αυτό το πείραμα έγινε η χρήση του νανοαντιδραστήρα με το ενθυλακωμένυ ενζύμο της Kred112 στα νανοδοχεία και την επιπλέον χρήση του ανακυκλωτικού συστήματος με GDH και γλυκόζη. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία. Μετά από 24 ώρες, εκτός του αναμενομένου προϊόντος στερεοεκλεκτικής αναγωγής **8-(R)**, παρατηρήθηκε στο χρωματογράφημα (Εικόνα 2.6) ο σχηματισμός ενός επιπλέον προϊόντος **9** σε ποσοστό 27% (Σχήμα 2.16). Η συνολική μετατροπή είναι 75% ενώ το κύριο προϊόν είναι το **8-(R)**, 73%. Το νέο προϊόν **9** ταυτοποιήθηκε με ^{1}H-NMR, με αέρια και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Εικόνες 2.7 και 2.8) και διαπιστώθηκε ότι αποτελεί το μη αναμενόμενο προϊόν διπλής αναγωγής. Για σύγκριση και επιβεβαίωση της δομής του **9** πραγματοποιήθηκε και η αντίστοιχη χημική αναγωγή του **8-rac**, μέσω υδρογόνωσης με καταλύτη παλλάδιο σε άνθρακα, με μετατροπή 99% (Σχήμα 2.17).



Σχήμα 2.17 Καταλυτική αναγωγή του υποστρώματος **7** με χρήση του ακινητοποιημένου ένζυμου

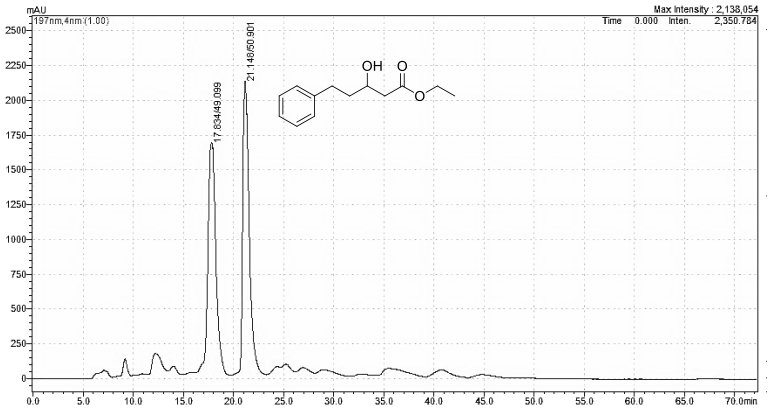


Σχήμα 2.18 Υδρογόνωση του **8-rac**.



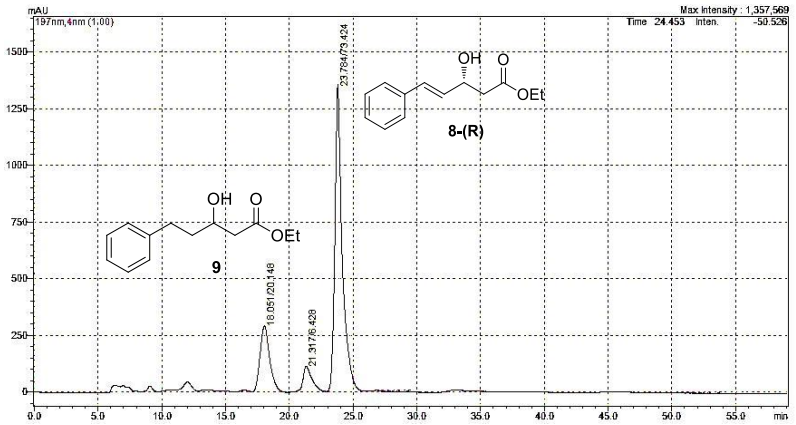
Εικόνα 2.6 Χρωματογράφημα GC της καταλυόμενης αναγωγής από τους νανοαντιδραστήρες.

Το ρακεμικό μίγμα της υδρογόνωσης διαχωρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με χειρόμορφη στήλη (HPLC) για τον προσδιορισμό των εναντιομερών (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7 Διαχωρισμός εναντιομερών της ένωσης **9** στο HPLC.

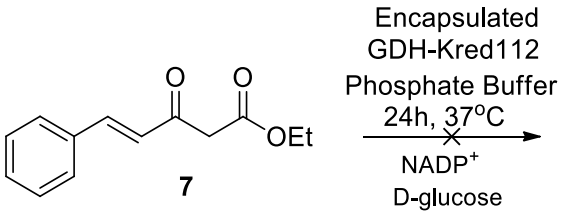
Στη συνέχεια παρακολουθήθηκαν και τα προϊόντα της βιοκατάλυσης στο HPLC (Εικόνα 2.8).



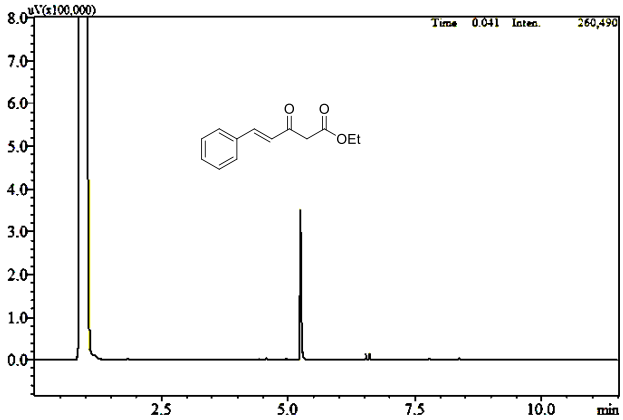
Εικόνα 2.8 Προϊόντα της καταλυόμενης αντίδρασης **8-(R)** και **9.**

Όπως φαίνεται από το HPLC χρωματογράφημα (Εικόνα 2.8) η εναντιομερική περίσσεια στο προϊόν **8** διατηρείται (99% ee), ενώ το νέο προϊόν **9** που σχηματίστηκε δεν είναι ρακεμικό μίγμα, χωρίς να παρουσιάζει αξιοσημείωτη εναντιομερική περίσσεια. Πιο συγκεκριμένα, το προϊόν **9** παράγεται με 52% ee.

Οι νανοαντιδραστήρες που περιλαμβάνουν ενθυλακωμένες και την GDH και την Kred112, παρουσίασαν δραστικότητα κατά την καταλυτική αναγωγή, όπως προκύπτει από GC και ^{1}H-NMR ανάλυση των προϊόντων, ενώ η χρήση του $NADP^{+}$ αντί NADPH απέτρεψε την πραγματοποίηση της αντίδρασης (Σχήμα 2.18) (Εικόνα 2.9). Το ενδεχόμενο της απώλειας ή της μείωσης της δραστικότητας μετά από μια διαδικασία ακινητοποίησης είναι κάτι που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.[58,73,84] Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να ερμηνευτεί, αφού το μόριο της γλυκόζης είναι υδρόφιλο και επομένως δεν μπορεί να διαπεράσει το υδρόφοβο τμήμα της μεμβράνης των νανοσωματιδίων BSA-πολυστερενίου και να προσεγγίσει την GDH ώστε να επιτευχθεί η αναγέννηση του NADPH.



Σχήμα 2.19 Με την ενθυλάκωση του ανακυκλωτικού ενζύμου GDH δεν πραγματοποιείται η αντίδραση.



Εικόνα 2.9 Χρωματογράφημα GC της καταλυόμενης αναγωγής από τους νανοαντιδραστήρες με ενθυλακωμένη Kred112 και GDH.

Ακόμη πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου με τη χρήση μόνο των νανοσωματιδίων του αμφίφιλων συζυγών BSA-πολυστυρενίου χωρίς την κετορεδουκτάση και με τη χρήση μόνο της BSA, στις ίδιες συνθήκες (GDH, γλυκόζη, NADPH), για να διαπιστωθεί εαν η αναγωγή που παρουσιάζεται από τα προηγούμενα πειράματα καταλύεται απο αυτά. Το αποτέλεσμα έδειξε οτι ούτε το βιοπολυμερές ούτε η BSA παρουσίασαν δραστικότητα με τον κετοεστέρα **7** στις ίδιες συνθήκες αντίδρασης.

2.3. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, οι ενδείξεις από τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το αναγωγικό ένζυμο έχει ενθυλακωθεί στα κυστίδια BSA-πολυστυρενίου κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Δεδομένου ότι οι νανοαντιδραστήρες με την Kred112 διατηρούν ενεργότητα και επιτυγχάνεται η μεταφορά του υδριδίου από το NADPH που βρίσκεται στο εξωτερικό διάλυμα στο ένζυμο και από εκεί στο υπόστρωμα, εικάζεται ότι το ένζυμο είναι πιθανά εκτεθειμένο στη διπλοστοιβάδα των σχηματιζόμενων νανοδοχείων. Όταν και η GDH είχει εγκλειστεί στα νανοδοχεία, η αναγέννηση του συνενζύμου δεν πραγματοποιήθηκε, πιθανότατα λόγω της απαγορευμένης προσπέλασης της υδρόφιλης γλυκόζης στο υδρόφοβο τμήμα της μεμβράνης του πολυμερικού νανοαντιδραστήρα. Περαιτέρω πειράματα χαρακτηρισμού με χρωματογραφικές μεθόδους είναι ακόμη σε εξέλιξη.

Η δραστικότητα, παρόλα αυτά, του αναγωγικού ενζύμου μετά την ενθυλάκωση παρουσιάζεται σε πολύ καλά επίπεδα, ενώ παρουσιάζεται επίσης και ο σχηματισμός του προϊόντος διπλής αναγωγής **9**, πράγμα ασυνήθιστο για την κετορεδουκτάση Kred112. Η αναγωγή στον διπλό δεσμό του υποστρώματος αξίζει να μελετηθεί πιο διεξοδικά.

Η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη απόπειρα ενθυλάκωσης του αναγωγικού ενζύμου Kred112 σε νανοσωματίδια συζυγών BSA-πολυστυρενίου με διατήρηση της καταλυτικής του δραστικότητας. Μελλοντικό στόχο αποτελεί ο σχεδιασμός ενός νέου βιοαντιδραστήρα με πρακτικές εφαρμογές στη βιοκατάλυση.

2.4. Πειραματικό Μέρος

2.4.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από τις Sigma-Aldrich, Fluka, Merck και Riedel de Haen. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν επίσης αγοραστεί από τη Sigma-Aldrich. Στην παρασκευή του υποστρώματος **7** το τετραϋδροφουράνιο είχε προξηρανθεί με Na και στη συνέχεια αποστάχθηκε παρουσία βενζοφαινόνης, υπό αδρανή ατμόσφαιρα.

Το ένζυμο Kred112 αγοράστηκε από την BioCatalytics, η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) από την εταιρία SyncoZymes και το NADPH από την εταιρία Prozomix.

2.4.2. Όργανα και Διατάξεις

Ο καθαρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (flash column chromatography) με υλικό πλήρωσης silica gel 60 0.040 – 0.063 mm (230-400 mesh ASTM). Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F254 EMD Millipore.

Ο προσδιορισμός της δομής των μορίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με φασματόμετρο NMR Bruker σε 300 MHz (DPX-300) για ^{1}H-NMR και 500 MHz (Avance 500) για ^{13}C-NMR. Σημείο αναφοράς είναι το τετραμέθυλο σιλάνιο (TMS) και διαλύτης το $CDCl_3$ (singlet 7.26 ppm για ^{1}H και triplet 77.00 ppm για ^{13}C).

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία, στο χρωματογράφο GC Shimadzu 2014 με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) με special performance capillary column HP chiral (30m×0.32mm×0.25μm, 20% permethylated beta-cyclodextrin). Ο διαχωρισμός και η ανάλυση των εναντιομερών στις ενώσεις **8** και **9** πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υγρού χρωματογράφου Shimadzu HPLC με ανιχνευτή UV-Vis και χειρόμορφη στήλη Daicel Chiralcel OD 0.46mm×0.25mm

2.4.3. Γενική Μέθοδος Σχηματισμού Αμφίφιλων συζυγών πρωτεΐνης-πολυστυρενίου

Σε ένα eppendorf tube το οποίο βρίσκεται σε παγόλουτρο προστίθενται 450 μL υπερκάθαρου H_2O και 0.1 mL (874 mmol, XXX eq.) στυρενίου. Το διάλυμα αυτό αναμιγνύεται με τη βοήθεια υπερήχων έως ότου γίνει γαλάκτωμα. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μL υδατικού διαλύματος $CuBr_2$ (67.1 mM, 0.66×10^{-3} mmol, XXX eq.) και Me_6TREN (Tris[2-(dimethylamino)ethyl]amine), 52.3 mM, 0.66×10^{-3} mmol, XXX eq.) σε υπερκάθαρο νερό. Σε πλαστική σύριγγα των 5 mL εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθεται 1,25 mL (0.44×10^{-3} mmol, XXX eq.) διαλύματος βιοεκκινητή BSA-Br (0.35 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM pH=7.4. Στη σύριγγα προστίθεται στη συνέχεια το διάλυμα στυρενίου - $CuBr_2$ – Me_6TREN, η σύριγγα σφραγίζεται και τοποθετείται κάτω από λαμπτήρα UV 356 nm για 5 ώρες.

Στα πειράματα όπου επιχειρείται η ενθυλάκωση των ενζύμων, ποσότητα 10 mg από αυτά προστίθεται στο αρχικό διάλυμα του βιοεκκινητή και η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιείται με τα ένζυμα παρόντα από την αρχή της πειραματικής διαδικασίας.

Μετά το πέρας των 5 ωρών το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη και πραγματοποιείται διαπύδιση μια φορά ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM pH=7.4 2.5% v/v MeCN και 2% w/v EDTA, και 2 φορές με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 5 mM pH=7.4 . Για τη διαπύδιση χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες κυτταρίνης με MWCO 30kDa. Τέλος, το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρείται 3 φορές 10 min 10000 rpm.

2.4.4. Γενική μέθοδος βιοκαταλυτικών αντιδράσεων

Σε 1 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (200 mM, pH=6.9) προστίθενται αρχικά 5 mg (0.023 mM) του υποστρώματος φαίνυλο κετοεστέρα **7** και στη συνέχεια η κετορεδουκτάση Kred112 (2 mg / mL). Στη μελέτη όπου χρησιμοποιούνται τα ακινητοποιημένα ένζυμα, το ίζημα της φυγοκέντρισης επαναδιαλύεται σε 1mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM, pH=7.4 και 380 μL του διαλύματος αυτού χρησιμοποιούνται για την αντίδραση της

καταλυτικής αναγωγής αντί της καθαρής Kred112. Έπειτα, προστίθεται το NADPH ή $NADP^+$ (2.5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Η αντίδραση επωάστηκε στους 37 ^oC για 24 ώρες. Έπειτα για τη λήψη των οργανικών ενώσεων πραγματοποιείται εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2×1 mL).

2.4.5. Σύνθεση Οργανικών Υποστρωμάτων

Σύνθεση σταθεροποιημένου υλιδίου του φωσφόρου 3-οξο-4-(τριφαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη με ψυκτήρα και μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται αρχικά 15 mL διαλύτη τολουολίου. Στη συνέχεια διαλύονται υπό ανάδευση 1.165 gr (4.44 mmol) τριφαινυλοφωσφίνης και προστίθενται στάγδην υπό ήπια ανάδευση 0.6 mL (4.44 mmol) 4-χλωροακετοξικού αιθυλεστέρα. Η φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 100^oC και η αντίδραση πραγματοποιείται για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης παρατηρείται ο σχηματισμός στερεού. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό μέχρι ξηρότητας, στο στερεό προστίθενται 10 mL χλωροφόρμιο το οποίο απομακρύνεται επίσης υπό κενό. Το στερεό στην ίδια φιάλη επαναδιαλυτοποιείται σε 8 mL απιονισμένου νερού και προστίθεται υπό ανάδευση υδατικό διάλυμα NaOH μέχρις ότου το pH=8. Το μίγμα εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο (3×10 mL). Οι οργανικές στιβάδες ξηράνθηκαν με $MgSO_4$ και συμπυκνώθηκαν υπό κενό μέχρι ξηρότητας. 1.639 gr. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7.55 (m, 15 αρωματικά-H), 4.20 (q, 2H, *J* = 7.1Hz), 3.81 (d, 1H, *J* = 24.9Hz), 3.36 (s, 2H), 1.27 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz) ppm ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 184.0, 183.96, 170.7, 133.2, 133.0, 132.13, 132.09, 128.9, 128.7, 127.2, 126.0, 60.4, 53.0, 51.5, 48.5, 48.3, 14.2 ppm

Σύνθεση του (E)-3-οξο-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα (**7**) με αντίδραση Wittig

Σε ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη με ψυκτήρα, 300 mg (1.16 mmol) του 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκού

αιθυλεστέρα και 120 μL (0.77 mmol) βενζαλδεϋδης προστέθηκαν σε 10 mL ξηρό διαλύτη τετραϋδροφουράνιο και το μίγμα αφέθηκε στους 67°C (reflux) για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό κενό, κατόπιν προστέθηκαν 3 mL εξάνιο στους 4°C για νακαταβυθιστούν τα φωσφινοξείδια και το μίγμα διηθήθηκε μέσω πορώδους ηθμού στρωμένου με Silica gel. Ο ηθμός ξεπλύθηκε με μίγμα εξανίου αιθυλεστέρα 5/1 και η οργανική φάση συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας, v/v, 70/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 65% (109 mg).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz;) δ: 7.34 (m, 5 αρωματικά-Η κετο- και 5 αρωματικά-Η για την ενολική μορφή, 1 βινυλικό-Η για την κετο και 1 βινυλικό-Η για την ενολική), 6.81 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz, κετο CH=CHC(O)), 6.43 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz, ενολική CH=CHC(OH)=C), 5.17 (s, 1H, ενολική CH=CH), 4.22 (q, 2H κετο και 2H ενολικό CH_3CH_2O), 3.70 (s, 2H, $C(O)CH_2C(O)$), 1.26 (t, 3H κετο και 3H ενολικό CH_3) ppm. ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 191.9, 172.8, 169.2, 167.3, 144.5, 136.7, 135.3, 134.1, 130.9, 129.3, 129.0, 128.8, 128.5, 127.5, 125.2, 121.9, 91.9, 61.4, 60.2, 47.6, 14.2, 14.1 ppm

<u>Χημική αναγωγή: παρασκευή του (Ε)-3-υδροξυ-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα **8-rac**</u>

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου σε μονόλαιμη φιάλη και σε 6 mL άνυδρης αιθανόλης διαλύονται 8 mg (0.21 mmol) $NaBH_4$. Στους 0°C προστίθενται στάγδην 52 mg του κετοεστέρα **7** (0.24 mmol) αφού πρώτα διαλυθούν σε 1 mL άνυδρης αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται αργά στους 0^{0}C περίπου 2 mL κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl και το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Κατόπιν προστίθενται 10 mL νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2x10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό.

Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 97% (50 mg) ύστερα από σύντομο καθαρισμό με λεπτό στρώμα από silica με Εξάνιο / Οξικό αιθυλεστέρα v/v, 30/1.^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz;) δ: 7.29 (m, 5 αρωματικά-Η), 6.64 (d, 1H, *J* =

15.9 Hz), 6.23 (dd, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.73 (dq, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.17 (q,2H, *J* = 7.2 Hz), 2.63 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz), 1.25 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz) ppm

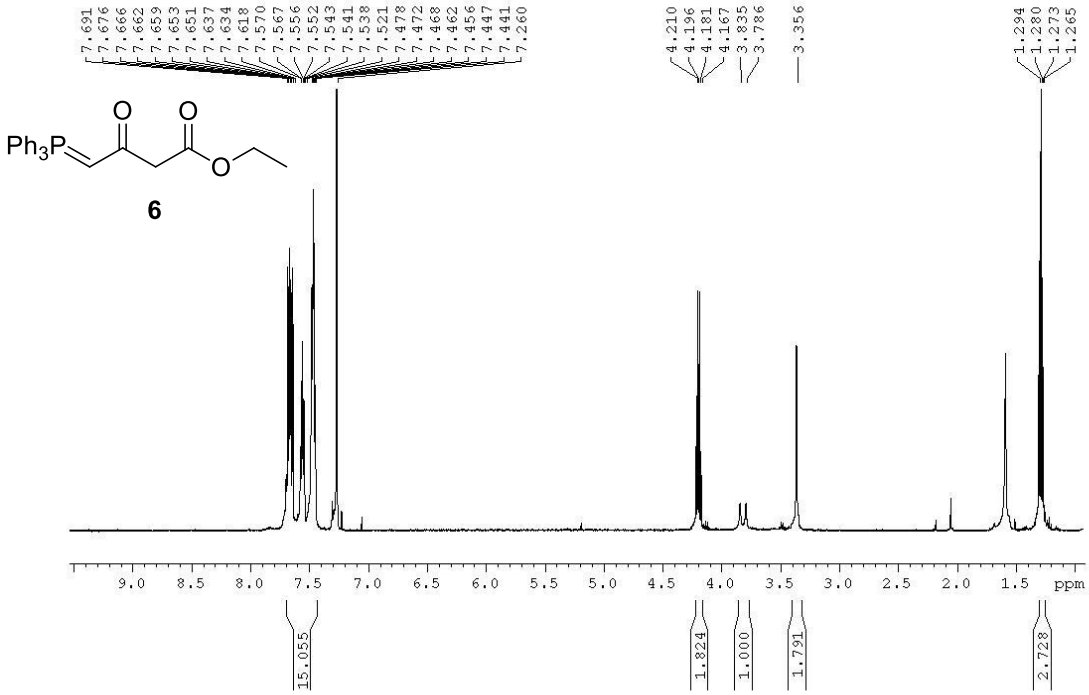
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 172.21, 136.44, 130.77, 129.92, 128.55, 127.78, 126.52, 68.85, 60.83, 41.49, 14.16 ppm

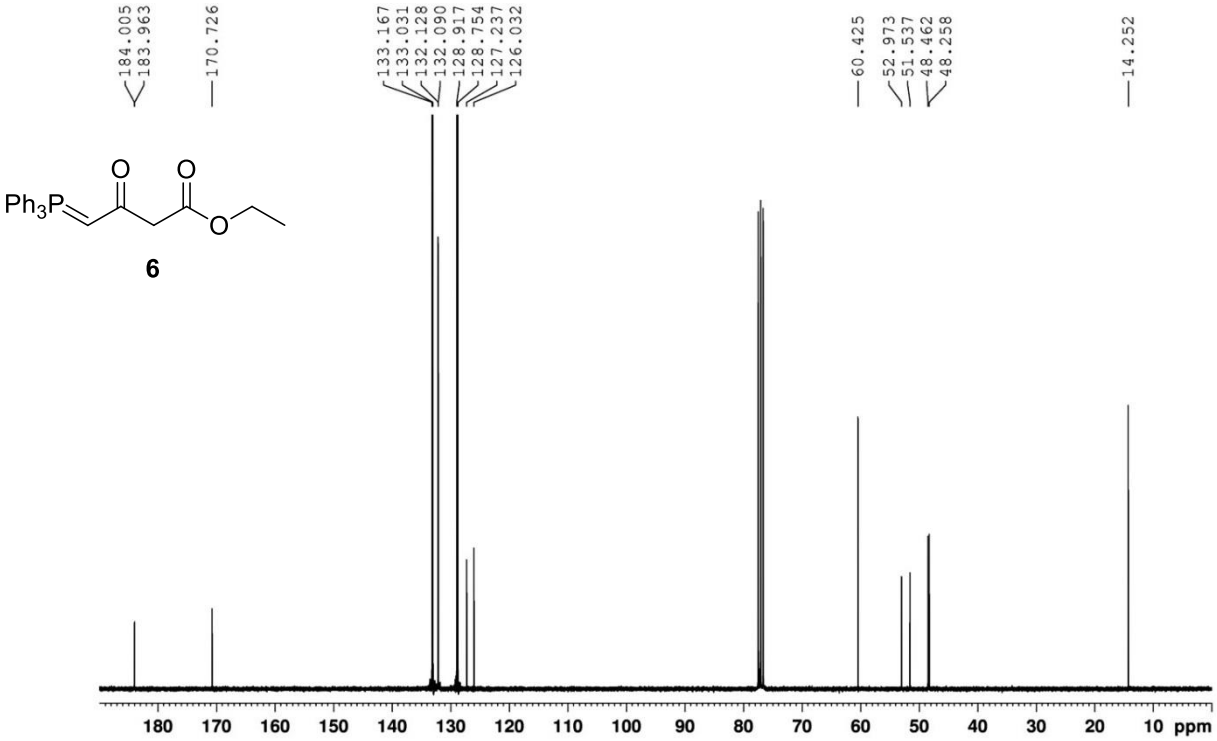
Χημική παρασκευή του 3-υδρόξυ-5-φαινυλοπεντανοικού αιθυλεστέρα (**9**)

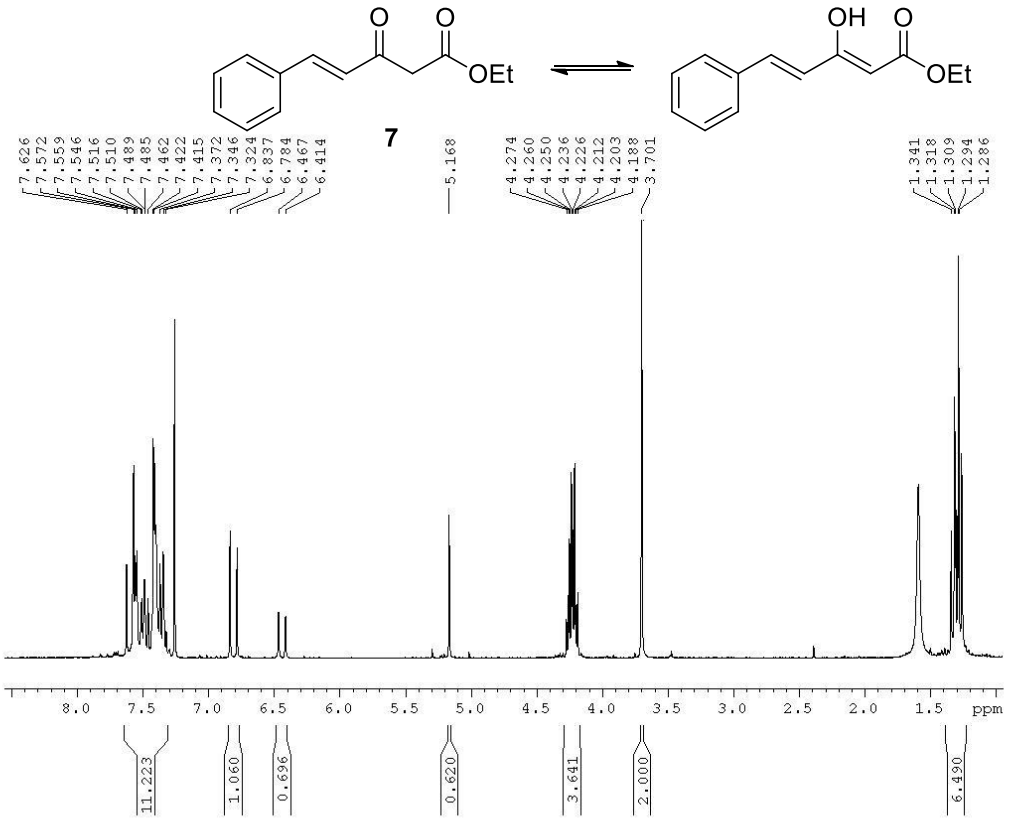
Σε 2 mL ξηρής μεθανόλης διαλύονται 5 mg του (E)-3-υδροξυ-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα (**8-rac**) και το διάλυμα προστίθεται σε ξηρή τρίλαιμη φιάλη που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και το εσωτερικό της βρίσκεται κάτω από ξηρή ατμόσφαιρα υδρογόνου. Στη φιάλη προστίθεται επίσης μικρή καταλυτική ποσότητα παλλαδίου σε άνθρακα (Pd/C). Η αντίδραση αφήνεται overnight υπό έντονη ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC και στο τέλος με GC. Μετά το πέρας της αντίδρασης το Pd/C απομακρύνεται μετά από φιλτράρισμα με celite. Το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν λαμβάνεται χωρίς περαιτέρω χρωματογραφικό καθαρισμό με απόδοση 99% (5mg). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz**)** δ: 7.19 – 7.30 (m, 5H), 4.16 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz), 4.06 – 3.97 (m, 1H), 2.87 – 2.77 (m, 1H), 2.75 – 2.65 (m, 1H), 2.55 – 2.39 (m, 2H), 1.90 – 1.67 (m, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H) ppm.

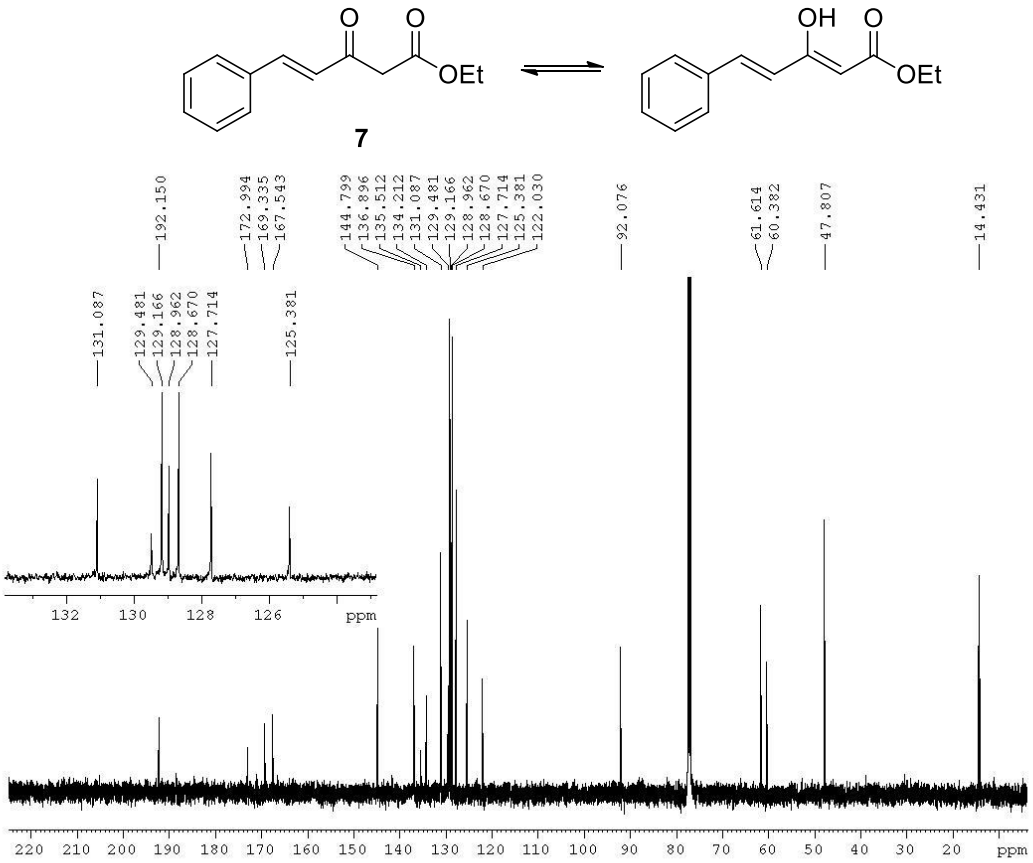
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

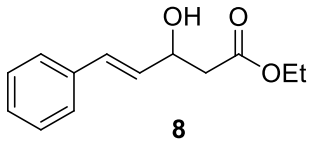
Φάσματα NMR


7.691
7.676
7.666
7.662
7.659
7.653
7.651
7.637
7.634
7.618
7.570
7.567
7.556
7.552
7.543
7.541
7.538
7.521
7.478
7.472
7.468
7.462
7.456
7.447
7.441
7.260
4.210
4.196
4.181
4.167
3.835
3.786
3.356
1.294
1.280
1.273
1.265
Ph3P
O
O
O
6
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 ppm
15.055
1.824
1.000
1.791
2.728

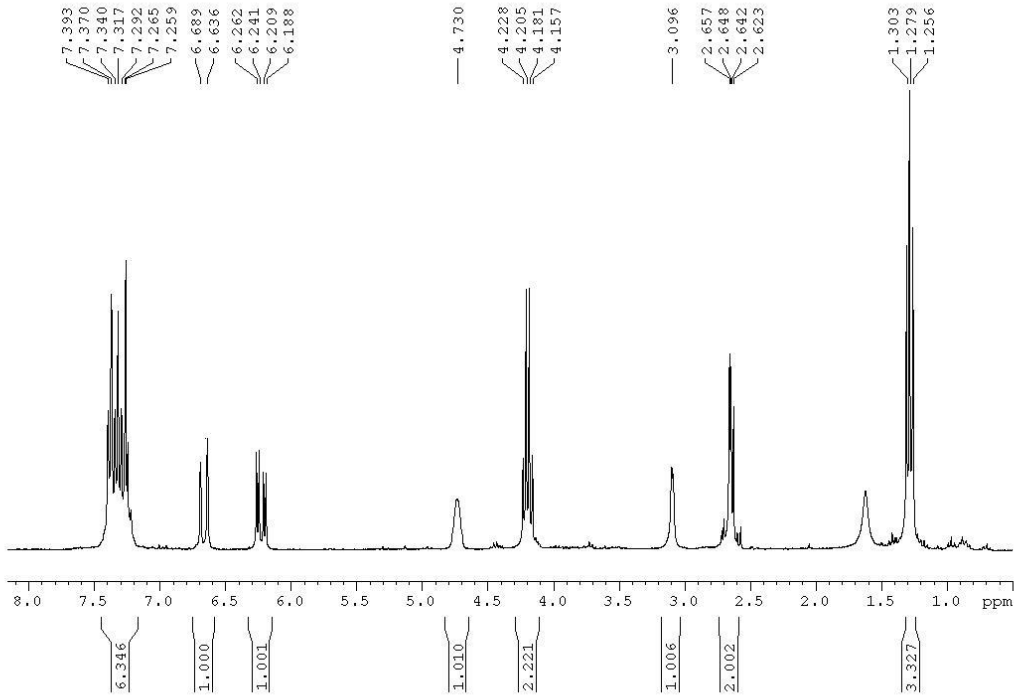

184.005
183.963
170.726
133.167
133.031
132.128
132.090
128.917
128.754
127.237
126.032
60.425
52.973
51.537
48.462
48.258
14.252
Ph3P
O
O
O
6
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

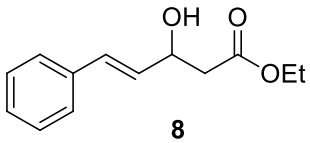

O
O
OEt
OH
O
OEt
7
7.626
7.572
7.559
7.546
7.516
7.510
7.489
7.485
7.462
7.422
7.415
7.372
7.346
7.324
6.837
6.784
6.467
6.414
5.168
4.274
4.260
4.250
4.236
4.226
4.212
4.203
4.188
3.701
1.341
1.318
1.309
1.294
1.286
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm
11.223
1.060
0.696
0.620
3.641
2.000
6.490


O
O
OEt
OH
O
OEt
7
192.150
172.994
169.335
167.543
144.799
136.896
135.512
134.212
131.087
129.481
129.166
128.962
128.670
127.714
125.381
122.030
92.076
61.614
60.382
47.807
14.431
131.087
129.481
129.166
128.962
128.670
127.714
125.381
132
130
128
126
ppm
220
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

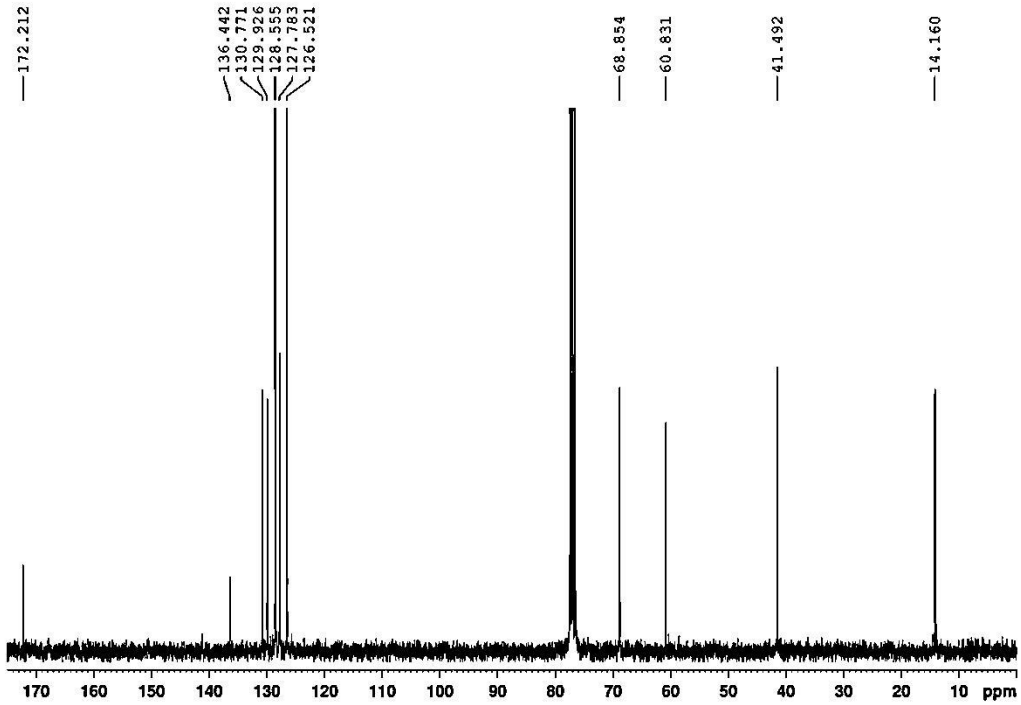

OH
O
OEt

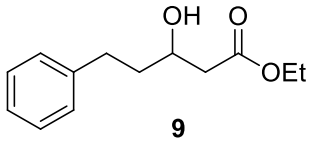
8


7.393
7.370
7.340
7.317
7.292
7.265
7.259
6.689
6.636
6.262
6.241
6.209
6.188
4.730
4.228
4.205
4.181
4.157
3.096
2.657
2.648
2.642
2.623
1.303
1.279
1.256
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
6.346
1.000
1.001
1.010
2.221
1.006
2.002
3.327

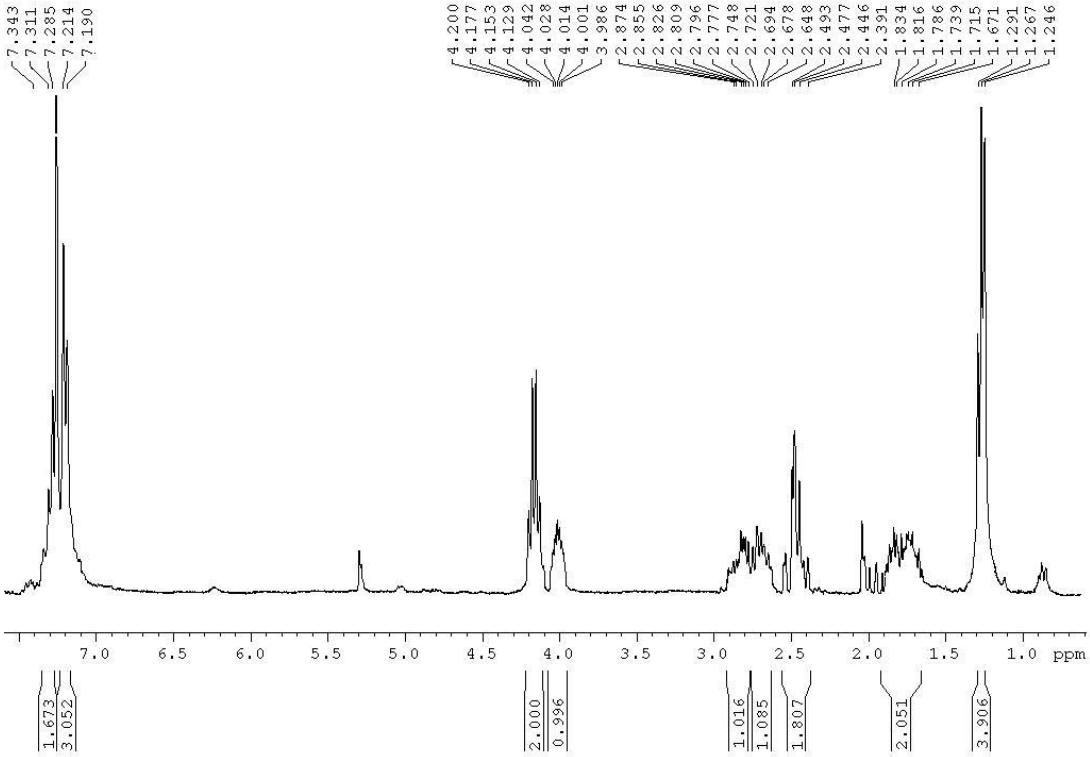

OH
O
OEt

8

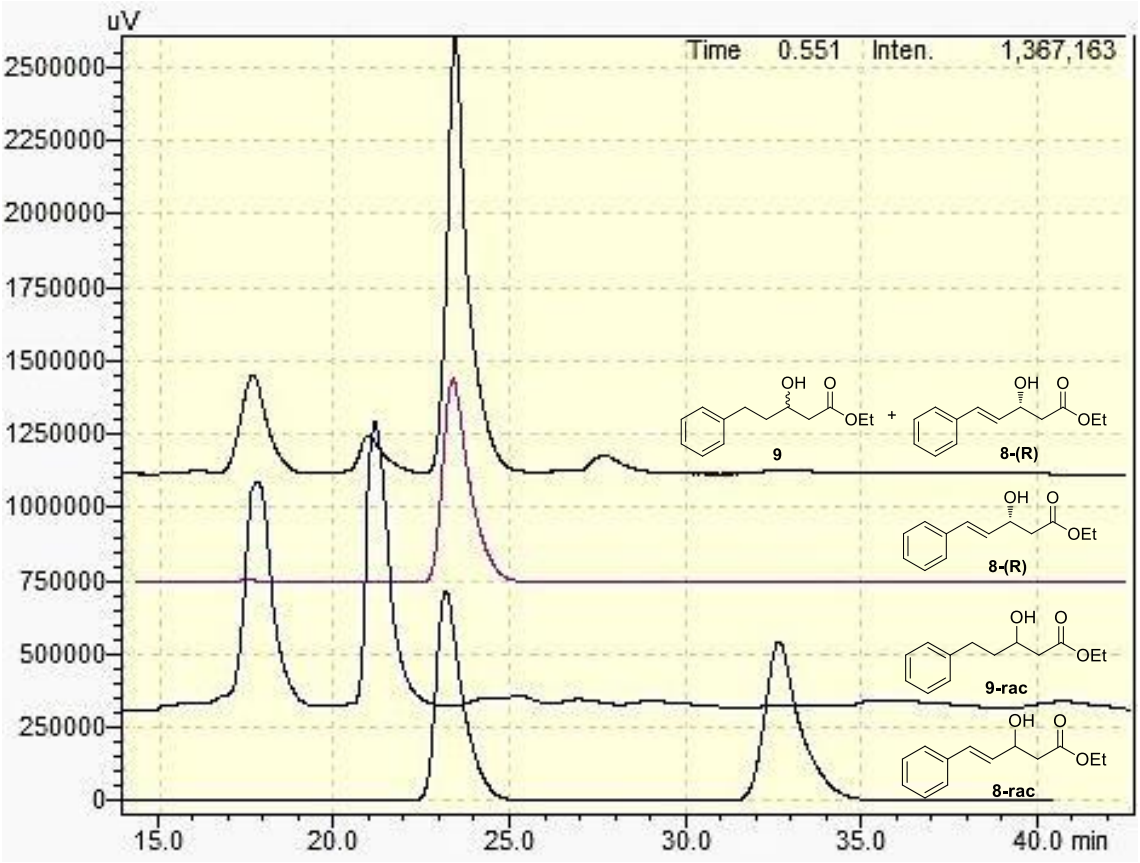

172.212
136.442
130.771
129.926
128.555
127.783
126.521
68.854
60.831
41.492
14.160
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm


OH
O
OEt

9


7.343
7.311
7.285
7.214
7.190
4.200
4.177
4.153
4.129
4.042
4.028
4.014
4.001
3.986
2.874
2.855
2.826
2.809
2.796
2.777
2.748
2.721
2.694
2.678
2.648
2.493
2.477
2.446
2.391
1.834
1.816
1.786
1.739
1.715
1.671
1.291
1.267
1.246
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
1.673
3.052
2.000
0.996
1.016
1.085
1.807
2.051
3.906

Χρωματογραφήματα HPLC



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1 (a) Schmid G.; Hofheinz, W., *J. Am. Chem. Soc*. ***1983***, *105(3)*, 624-625.
(b) Vassilikogianakis, G.; Stratakis, M.; *Angew., Chem. Int. Ed*. **2003**, *42(44)*, 5465-5468.
(c) Ioannou, G. I.; Kalaitzakis, D.; Vassilikogiannakis, G., *Eur. J. Org. Chem.,* **2016**, *2016(20)*, 3304-3305.

2 Kautsky H.; De Bruijn H., *Nat. Sc.* **1931**, *19(52)*, 1043-1045.

3 Gaffron, H., Ber., **1935**, *68B*, 1409–1411.

4 Gollnick, K., *Adv. Photochem.* **1968**, *6*, 1-79

5 Foote, C..S., *Photochem. Photobiol*. **1991**, *54*(5), 659.

6 Foote, C.S.; Wexler, S., *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3879-3880.

7 (a) Bonnett, R., *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24(1)*, 19.
(b) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D., *American Cancer Society*, **2011**, *61*, 250-281.

8 Lewis, G.N., *Chem. Rev.* **1924**, *46*, 2027-2032.

9 Foote, C.S., *Nature* **1968**, *162(3857)*, 963-970.

10 Wasserman, H.H.; De Simone, R.W.; Chia, K.R; Banwell, M.G., *Singlet Oxygen. In Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, *(Ed.),* Wiley Online Library **2013**

11 Foote, C.S.; Wexler, S.; Ando, W., *Tetrahedron Lett*. **1970**, *46*, 4111-4118.

12 (a) Montagnon, T.; Tofi, M.; Vassilikogiannakis, G., *Acc. Chem. Res*. **2008**, *41*, 1001–101.
(b) Hoffmann, N., *Chem. Rev*. **2008**, *108*, 1052-1103.

13 Stephenson, L.M.; Grdina, M.J.; Orfanopoulos, M., Acc. Chem. Res. **1980**, *13(11)*, 419-425.

14 (a) Clennan, E. L., *Tetrahedron Lett.* **1991**, *47*, 1343-1382
(b) Woodward, R. B.; Hoffman, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 781-932.
(c) Golnick, K.; Schenck, G. O. In ‘1,4 Cycloadition Reaction’, Hamer, J. Ed: Academic Press, Orlando, FL, **1967**.

15 (a) Wasserman, H.H.; Murray, R.W. Singlet Oxygen, Academic Press, New York, **1972**, 180-198.
(b) Adam, W.; Liu, J-C., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1206-1209.
(c) Bartlett, P. D.; Schaap, A. P*., J. Am. Chem. Soc*. **1970**, *92*, 3223-3225.

16 Liang, J.J.; Gu, C.L.; Kacher, M.L.; Foote, C.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4717-4721.

17 (a) Ogawa, S.; Fukui, S.; Hanasaki, Y.; Asano, K.; Uegaki, H.; Fujita, S.; Shimazaki, R., *Chemosphere* **1991**, *22(12)*, 1211-1225.
(b) Matsumoto, M.; Watanabe, N.; Matsubara, J.; Kitano, Y. ; Ikawa, H., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37(33)*, 5939-5942.
(c) Gandhi, H.; O'Reilly, K.; Gupta, M.K.; Horgan, C.; O'Learyabc E.M.; O'Sullivan, T.P., *RSC Advances* **2017**, *7*, 19506–19556.
(d) Sander, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 344-354.

18 Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H., *Arch. Biochem. Bioph.* **1989***, 274(2),* 532-538.

19 Sofikiti, N.; Tofi, M.; Montagnon, T.; Vassilikogiannakis, G.; Stratakis, M., *Org. Lett*. **2005**, *7(12)*, 2357-2359.

20 (a) Clennan, E.L.; Mehrsheikh-Mohammadi, M.E., *J. Am. Chem. Soc*. **1983**, *105*, 5932-5933.
(b) Clennan, E.L.; Mehrsheikh-Mohammadi, M.E., *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1321-1322.
(c) Clennan, E.L.; Mehrsheikh-Mohammadi, M.E., ., *J. Am. Chem. Soc.* **1984,** *106***,** 7112-7118.

21 Griesbeck, A.G., Ene Reactions with Singlet Oxygen In CRC Handbook of Organic Photochemistry S., CRC Press, Boca Raton, **1995**, pp 301-310

22 (a) O'Shea, K. E.; Foote, C.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7167-7170.
(b) Schweitzer, C.; Schmidt, R., *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685- 1758.

23 Harding, L.B.; W.A., *J. Am. Soc.* **1980**, *102*, 439-449.

24 (a) Clennan, E.L.; Nagraba, K., *J. Org. Chem*, **1978**, *52*, 2945-2946.
(b) Clennan, E.L., l'Esperance, R.P., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5178-5182.
(c) Clennan, E.L., l'Esperance, R.P., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *50*, 5424-5426.
(d) Clennan, E.L.; Nagraba, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 2475-2478.

25 (a) Asveld, E.W.H.; Kellogg, R.M., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3644-3646.
(b) Jefford, C.W.; Rimbault, C.G., *Tetrahedron Lett*. **1977**, *18*, 2375-2378.
(c) Jefford, C.W.; Rimbault, C.G., *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6437-6445.

26 (a) McCapra, F.; Beheshti, I., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 517-518.
(b) Wilson, S.L.; Schuster, G.B., *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2056-2060.
(c) Van den Heuvel, C.J.M.; Hofland, A.; Steinberg, H.; de Boer, T., J., *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **1980**, *104*, 275-278.
(d) Wilson, S.L.; Schuster, G.B., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105(3)*, 679-681.

27 Castel, D., *A. Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16(1)*, 55-73.

28 Malik, S.; Khan, S.A.; Ahuja, P.; Arya, S.K.; Sahu, S.; Sahu, *Medicinal Chemistry Research* **2013**, 22(12), 5633-5653.

29 (a) Orfanopoulos, M.; Foote, C.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6583-6584.
(b) Orfanopoulos, M.; Stratakis, M.; Elemes, Y., *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4875-4878.
(c) Orfanopoulos, M.; Grdina, M.B.; Stephenson, L.M., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 275-276.
(d) Frimer, A. A.; Bartlett, D. D; et.al., J*. Am. Chem. Soc*. **1977**, *99*, 7977-7986.
(e) Orfanopoulos, M.; Stratakis, M.; Elemes, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6417-6418.
(f) Orfanopoulos, M.; Stratakis, M.; Elemes, Y.; Jensen, F., J*. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3180-3181.
(g) Orfanopoulos, M.; Stephenson, L. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1417-1418.

30 (a) Clennan, E. L.; Chen, Y.; Koola, J. J., *J. Am. Chem. Soc*. **1990**, *112*, 5193-5199.
(b) Stratakis, M.; Orfanopoulos, M., *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 425-430.
(c) Stratakis, M.; Orfanopoulos, M.; Foote, C.S., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1315-1318.
(d) Stratakis, M.; Orfanopoulos, M.; Chen, J.; Foote, C.S., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4105-4108.
(e) Elemes, Y.; Stratakis, M.; Orfanopoulos, M., *Tetrahedron Lett*. **1997**, *38*, 6437-6440.

31 Stratakis, M.; Orfanopoulos, M., *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1595-1615.

32 Alberti, M. I.; Orfanopoulos, M., *Tetrahedron* **2006**, *62*(46), 10660-10675.

33 Prein, M.; Adam, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1996**, *35*, 417-494.

34 Wang, Y.; Wang, X.; Antonietti, M., *Angew. Chemie Int. Ed*. **2012**, *51(1)*, 68–89.

35 Wen, J.; Xie, J.; Chen, X.; Li, X., *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *391*, 72-123.

36 (a) Kroke, E.; Schwarz, M., *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 493–532.
(b) Liu, J.; Wang, H.; Antonietti, M., *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2308–2326.

37 (a) Kroke, E.; Schwarz, M., *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 493–532.
(b) Liu, J.; Wang, H.; Antonietti, M., *Chem. Soc. Rev*. **2016**, *45*, 2308–2326.
(c) Liu, J.; Zhang, Y.; Lu, L.;Wu, G.; Chen,W., *Chem. Commun*. **2012**, *48*, 8826–8828.

38 Ong,W.J.; Tan, L.L.; Ng, Y.H.; Yong, S.T.; Chai, S.P., *Chem. Rev*. **2016**, *116*, 7159–7329.

39 Liu, J.; Liu, Y.; Liu, N.; Han, Y.; Zhang, X.; Huang, H.; Lifshitz, Y.; Lee, S.T.; Zhong, J.; Kang, Z., *Science* **2015**, *347*, 970-974.

40 (a) Wang, Y.; Li, Y.; Bai, X.; Cai, Q.; Liu, C.; Zuo, Y.; Kang, S.; Cui, L., *Catal. Commun*. **2016**, *84*, 179-82.
(b) Wang, Q.; Chen, A.;Wang, X.; Zhang, J.; Yang, J.; Li, X.A., *J. Mol. Cat. A Chem.* **2016**, *420*, 159-166.
(c) Li, X.; Bi,W.; Zhang, L.; Tao, S.; Chu,W.; Zhang, Q.; Luo, Y.;Wu, C.; Xie, Y., *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 2427-2431
(d) Han, C.; Wu, L.; Ge, L.; Li, Y.; Zhao, Z. Carbon **2015**, *92*, 31-40.

41 (a) Xiong, T.; Cen,W.; Zhang, Y.; Dong, F., *ACS Catal.* **2016**, *6*, 2462-2472.
(b) Fu, Y.; Huang, T.; Zhang, L.; Zhu, J.;Wang, X. *Nanoscale* **2015**, *7*, 13723-13733.
(c) Kuriki, R.; Matsunaga, H.; Nakashima, T.;Wada, K.; Yamakata, A.; Ishitani, O.; Maeda, K., *J. Am. Chem. Soc*. **2016**, *138*, 5159-5170.

42 Liu, J.; Zhang, Y.; Lu, L.;Wu, G.; Chen,W., *Chem. Commun*. **2012**, *48*, 8826-8828.

43 (a) Xiang, Q.; Yu, J.; Jaroniec, M., *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 7355-7363.
(b) Suryawanshi, A.; Dhanasekaran, P.; Mhamane, D.; Kelkar, S.; Patil, S.; Gupta, N.; Ogale, S., *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 9584-9589.

44 Khan, M.A.; Teixeira, I.F.; Li, M.M.J.; Koito, Y.; Tsang, S.C.E., *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2772-2775.

45 Goettmann, F.; Fischer, A.; Antonietti, M.; Thomas, A., *Angew. Chem. Int. ed.* **2006**, *45*, 4467-4471.

46 (a) Verma, S.; Nasir Baig, R.B.; Nadagouda, M.N.; Varma, R.S., *ACS Sus. Chem.Eng*. **2016**, *4*, 1094-1098.
(b) Han, H.; Ding, G.; Wu, T.; Yang, D.; Jiang, T.; Han, B., *Molecules* **2015**, *20*, 12686-12697.
(d) Ding, Z.; Chen, X.; Antonietti, M.;Wang, X., ChemSusChem **2011**, *4*, 274-281.
(e) Verma, S.; Nasir Baig, R.B.; Nadagouda, M.N.; Varma, R.S., *ACS Sus. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 2333-2336.

47 (a) Zhang, P.; Deng, J.; Mao, J.; Li, H.;Wang, Y., *Chinese J. Catal*. **2015**, *36*, 1580-1586.
(b) Su, F.Z.; Mathew, S.C.; Lipner, G.; Fu, X.Z.; Antonietti, M.; Blechert, S.; Wang, X.C., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16299-16301.
(c) Long, B.; Ding, Z.; Wang, X., *ChemSusChem* **2013**, *6*, 2074-2078.

(d) Zhang, P.; Wang, Y.; Yao, J.; Wang, C.; Yan, C.; Antonietti, M.; Li, H., *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1447-1451.

48 Wu, W.; Han, C.; Zhang, Q.; Zhang, Q.; Li, Z.; Gosztola, D. J.; Wiederrecht, G. P.; Wu, M., *J. Catal*. **2018**, *361*, 222-229.

49 Zhang, W.; Bariotaki, A.; Smonou, I.; Hollmann, F., *Green Chem.* **2017**, *19*, 2096-2100.

50 Martin, D.J.; Qiu, K.; Shevlin, S.A.; Handoko, A.D.; Chen, X.; Guo, Z.; Tang, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9240-9245.

51 Chatzoudis, A.; Giannopoulos, V.; Hollman, F.; Smonou I., *Catalysts* **2019**, *9(8)*, 639-650.

52 (a) Gollnick, K.; Schnatterer, A., *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 185-188.
(b) Gollnick, K.; Schnatterer, A., *Tetrahedron Lett*. **1984**, *25*, 2735–2738.

53 Ouannes, C.; Wilson, T., *J. Am. Chem. Soc* **1968**, 90(23), 6527–6528.

54 Eriksen, J.; Foote, C.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6083–6088.

55 (a) Alberti, M.N.; Orfanopoulos, M. *Synlett* **2010***, 2010(07),* 999–1026.
(b) Stephenson, L.M.; Grdina, M.J.; Orfanopoulos, M., *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 419–425.

56 (a) Vougioukalakis, G.C.; Angelis, Y.; Vakros, J.; Panagiotou, G.; Kordulis, C.; Lycourghiotis, A.; Orfanopoulos, M., *Synlett.* **2004**, *6*, 971-974.
(b) Orfanopoulos, M.; Stratakis, M.; Elemes, Y.; Jensen, F., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3180-3181.

57 Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43(14)*, 2923-2925.

58 Chapman, J.; Ismail, A. E.; Dinu, C. Z., Catalysts **2018**, *8(6),* 20–29.

59 Anastas P.; Warner J., Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, **2000**.

60 (a) Thomas, S. M.; DiCosimo, R.; Nagarajan, V., *Trends Biotechnol.* **2002**, *20(6)*, 238– 242.
(b) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. Industrial Biotransformations, Second Edition; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany **2006**.

61 Cammenberg, M.; Hult, K.; Park, S., ChemBioChem **2006**, *7*, 1745-1749.

62 Riva, S. Exploiting Enzyme Chemoselectivity and Regioselectivity. In Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2008**.

63 Begley, T. P., Hollmann, F. and Otten, L. G. Enantioselectivity of Enzymes. In Wiley Encyclopedia of Chemical Biology ,T. P. Begley (Ed.). **2009**.

64 Gramatica, P.; Manitto, P.; Ranzi, B. M.; Delbianco, A.; Francavilla, M., *Experientia* **1982**, *38 (7),* 775–776.

65 Biotransformations in Organic Chemistry, Kurt Faber, 5th edition, Springer-Verlag Berlin **2011**.

66 Μυρτολλάρη Καμέλα, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα ειδίκευσης, **2019**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

67 May, O.; Voigt, C. A.; Arnold, F. H. Enzyme Engineering by Directed Evolution. In Enzyme Catalysis in Organic Synthesis; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, **2008**, pp 95–138.

68 Webb, E.C., NC-IUBMB, Academic Press, New York, **1992**.

69 Forrest, G.L.; Gonzales, B., *Chem-Biol. Interact.* **2000**, *129*, 21.

70 (a) Kaluzna, I. A.; David Rozzell, J.; Kambourakis, S., *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16(22)*, 3682–3689.
(b) Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I., *Org. Lett.* **2005**, *22*, 4799–4801.

71 Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K., *Tetrahydron: Assymetry* **2009**, *20(5)*, 513-557.

72 Prelog, V., *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*(1), 119–130.

73 Illanes, A. Immobilized Biocatalysts. In Comprehensive Biotechnology; Elsevier **2011**, pp 25–39.

74 Nelson, J.M.; Griffin, E.G., *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 1109–1115.

75 Grubhofer, N.; Schleith, L., *Die Naturwissenschaften* **1953**, *40(19)*, 508–512.

76 Bernfeld, P.; Wan, J., *Science* **1963**, *142*, 678–679.

77 Katchalski-Katzir, E.; Silman, E.H.; Goldman, R., *Adv. Enzymol.* **1971**, *34*, 445–536.

78 (a) Dzionek, A.; Wojcieszy ´ nska, D.; Hupert-Kocurek, K.; Adamczyk-Habrajska, M.; Guzik, U., *Catalysts* **2018**, *8*, 176.
(b) Samoylova, Y.V.; Sorokina, K.N.; Piligaev, A.V.; Parmon, V.N.,*Catalysts* **2018**, *8*, 154.
(c) Allertz, P.J.; Berger, S.; Sellenk, G.; Dittmer, C.; Dietze, M.; Stahmann, K.-P.; Salchert, K., *Catalysts* **2017**, *7*, 359.

79 (a) Peluffo, H.; Unzueta, U.; Negro-Demontel, M.L.; Xu, Z.; Váquez, E.; Ferrer-Miralles, N.; Villaverde, A., *Biotechnol. Adv*. **2015**, *33*, 277–287.
(b) Reynolds, J.L.; Mahato, R.I., *Neuroimmune Pharmacol*. **2017**, *12*, 1–5.
(c) DeMarino, C.; Schwab, A.; Pleet, M.; Mathiesen, A.; Friedman, J.; El-Hage, N.; Kashanchi, F., *Neuroimmune Pharmacol*. **2017**, *12*, 31–50.

80 (a) Sheldon, R.A., Appl. Microbial. *Biotechnol* **2011**, *92*, 467–477.
(b) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B., *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.
(c) Betancor, L.; Luckarift, H.R., *Trends Biotechnol*. **2008**, *26*, 566–572.
(d) Feng,W.; Ji, P., *Biotechnol. Adv*. **2011**, *29*, 889–895.
(e) Chauhan, G.S., *Polym. Int.* **2014**, *63*,1889–1894.

81 Petrovičová, T.; Markošová, K.; Hegyi, Z.; Smonou, I.; Rosenberg, M.; Rebroš, M., *Catalysts* **2018**, *8(4)*, 168-177.

82 Zhao, X.; Qi, F.; Yuan, C.; Du, W.; Liu, D., *Renew. Sustain. Energy Rev*. **2015**, *44*, 182–197.

83 (a) Betancor, L.; Luckarift, H.R., *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 566–572.
(b) Chauhan, G.S., *Polym. Int*. **2014**, *63*, 1889–1894.

84 Singh, H.P.; Gupta, N.; Sharma, R.K., *Catal. Lett.* **2013**, *143*, 1304–1311.

85 Prakasham, R.S.; Devi, G.S.; Rao, C.S.; Sivakumar, V.S.S.; Sathish, T.; Sarma, P.N., *Appl. Biochem. Biotechnol*. **2010**, *160*, 1888–1895.

86 (a)Wong, C.; Drueckhammer, D. G.; Sweers, H. M., J. Am. Chem. Soc. **1985**, *107(13)*, 4028–4031.
(b) Weckbecker, A.; Hummel, W., Glucose Dehydrogenase for the Regeneration of NADPH and NADH. In Microbial Enzymes and Biotransformations; Humana Press: Totowa, NJ, **2005**, pp 225–238.

87 (a) Μπαριωτάκη Άννα, Διδακτορική Διατριβή, **2015**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
(b) Bae, H. Y.; Höfler, D.; Kaib, P. S. J.; Kasaplar, P.; De, C. K.; Döhring, A.; Lee, S.; Kaupmees, K.; Leito, I.; List, B., *Nat. Chem.* **2018**, *10*(8), 888–894.

88 Jenkins, A. D.; Jones, R. G.; Moad, G., *Pure Appl. Chem.* **2009**, *82(2)*, 483–491.

89 Wang, Y.; Kwak, Y.; Buback, J.; Buback, M.; Matyjaszewski, K., *ACS Macro Letters* **2012**, *1*, 1367.

90 Zhang, Q.; Wilson, P.; Li, Z.; McHale, R.; Godfrey, J.; Anastasaki, A.; Waldron, C.; Haddleton, D. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135(19)*, 7355–7363.

91 Liarou, E.; Whitfield, R.; Anastasaki, A.; Engelis, N.G.; Jones, R.G.; Velonia, K.; Haddleton D.M., *Angew. Chem. Int. Ed,* **2018**, *57*, 8998-9002.

92 Janatova, J.; Fuller, J.K.; Hunter, M.J., *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3612-3622.

93 Le Droumaguet, B. ; Velonia, K, Angew. *Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6263-6266.