

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΟΠΤΙΚΩΣ ΚΑΘΑΡΩΝ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΩΝ
ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ**

ΜΠΑΡΙΩΤΑΚΗ Β. ANNA

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

LABORATORY ORGANIC SYNTHESIS - BIOCATALYSIS



Doctoral Thesis

**CHEMOENZYMATIC SYNTHESIS OF OPTICALLY PURE
NATURAL PRODUCTS AND CHIRAL INTERMEDIATES**

BARIOTAKI V. ANNA

Thesis Supervisor: SMONOU IOULIA

HERAKLION 2015

στους γονείς μου,

Βασίλη και Ειρήνη

στον αδερφό μου,

Αρτέμη

και σε όσους είναι πάντα δίπλα μου

Εξεταστική Επιτροπή

Ιουλία Σμόνου

Αναπληρώτρια καθηγήτρια - Επιβλέπουσα

Τμήμα Χημείας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μανώλης Στρατάκης

Καθηγητής

Τμήμα Χημείας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αριστοτέλης Ξενάκης

Ερευνητής Α

IBEB

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Χαράλαμπος Ε. Κατερινόπουλος

Καθηγητής

Τμήμα Χημείας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Ε. Βασιλικογιαννάκης

Καθηγητής

Τμήμα Χημείας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βασίλης Μπουριώτης

Καθηγητής

Τμήμα Βιολογίας

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κέλλυ Βελώνια

Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών

Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας - Βιοκατάλυσης, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά την χρονική περίοδο 2011-2015.

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

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ιουλία Σμόνου, για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής και την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την συνεχή ενθάρρυνση της κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, για την υπομονή, τις πολύτιμες συμβουλές της και την άμεση βοήθεια της σε κάθε μικρή δυσκολία που εμφανιζόταν.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή κ. Μανώλη Στρατάκη και Ερευνητή κ. Άρη Ξενάκη για τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και τους Καθηγητές κ. Χάρη Κατερινόπουλο, κ. Γιώργο Βασιλικογιαννάκη, από το Τμήμα Χημείας, την Επικ. Καθηγήτρια κ. Κέλλυ Βελώνια από το Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Υλικών και τον Καθηγητή κ. Βασίλη Μπουριώτη από το Τμήμα Βιολογίας που δέχτηκαν να είναι μέλη της Εξεταστικής μου επιτροπής.

Ευχαριστώ το πρόγραμμα «Ηράκλειτος II» για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχε όλα τα χρόνια της διατριβής αλλά και το “COST CM1303-Systems Biocatalysis” για την οικονομική επίσης στήριξη κατά τη διάρκεια της επίσκεψής μου (Short Term Scientific Mission) στο TU Delft, στην Ολλανδία.

Ακόμη ευχαριστώ πολύ τον Dr. Frank Hollmann, που με δέκτηκε στη ερευνητική του ομάδα, με εμπιστεύτηκε και μου πρόσφερε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω μέρος της έρευνάς μου στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ τον Δρ. Απόστολο Σπύρο και την Δρ. Βίβιαν Μάρα για την διάθεση τους να βοηθήσουν στην επίλυση οποιουδήποτε τεχνικού προβλήματος του φασματομέτρου NMR.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Δημήτρη Καλαϊτζάκη για την πολύτιμη βοήθεια του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Για την υποστήριξη του, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του και την Dr. Tamsyn Montagnon για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε.

Ακόμα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες από τον τομέα της Οργανικής και από το τμήμα Χημείας για την άψογη συνεργασία τους, καθώς και τους συνεργάτες από το εργαστήριο Α. Στεργίου, Χ. Διονυσοπούλου, Α. Τζανακάκη, Β. Γιαννόπουλο, Θ. Τυρίκου-Εργά και Μ. Ζωΐδη.

Νοιώθω επίσης την υποχρέωση να ευχαριστήσω όλους αυτούς που με οποιοδήποτε τρόπο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας και στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε δύσκολη στιγμή.

Τέλος, ευχαριστώ τον σύντροφο μου Δρ. Ματθαίο Καββαλάκη για το κουράγιο και την ηθική στήριξη, όλους τους φίλους αλλά και ιδιαίτερα την οικογένεια μου για την ποικιλόμορφη βοήθεια και συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα τους δε θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Όνοματεπώνυμο: Μπαριωτάκη Άννα
Ημ. γέννησης: 24 Οκτωβρίου 1986
Τόπος γέννησης: Χανιά, Κρήτη
E-mail: anna-993@hotmail.com, bariotakianna@gmail.com

Εκπαίδευση

2011- Σήμερα: Ph.D. στην Οργανική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τίτλος: «Χημειοενζυμική σύνθεση οπτικώς καθαρών φυσικών προϊόντων και χειρόμορφων ενδιαμέσων»

Επιβλέπουσα: Αναπλ. Καθηγ. κ. Ι. Σμόνου

2009-2011: M.Sc, στην Οργανική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τίτλος: «Βιοκαταλυτικές αναγωγές β,δ-δικετοεστέρων»

Επιβλέπουσα: Αναπλ. Καθηγ. κ. Ι. Σμόνου

2004-2009: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Επαγγελματική εμπειρία

2014- Σήμερα: Εκπαιδύτρια στο Ι.Ι.Ε.Κ. MORFI, Ηράκλειο

- *Αναλυτική Χημεία I & II*
- *Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων*
- *Μέθοδοι Ελέγχου Φαρμάκων*
- *Οργανική Χημεία*
- *Τεχνολογία Υλικών I*

2014- Σήμερα: Εκπαιδύτρια στο Ε.Ε.Σ. ΚΕΠΑΝΣΗ, Ηράκλειο

- *Χημεία-Κοσμετολογία I & II*

2014- Σήμερα: Καθηγήτρια Χημείας στον φροντιστηριακό οργανισμό «ΔΟΜΗ», Ηράκλειο

- Χημεία Γ Γυμνασίου
- Χημεία Α, Β, Γ Ενιαίου Λυκείου (Γενικής & Κατεύθυνσης)

3/2014 - Επισκέπτρια Ερευνήτρια στο Technical University of Delft,
6/2014: Ολλανδία, Επιβλέπων: Dr.. F. Hollmann

2010-2012: Βοηθός Καθηγητής στα προπτυχιακά *Εργαστήρια Οργανικής Χημείας I & II* Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων: κ. Α. Καταχανάκης

•
2007-2009: Διπλωματική εργασία με θέμα «Χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (S)-(+)-5,6-διυδρο-6-μεθυλο-2H-πυραν-2-όνη (Παρασορβικό οξύ)» υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθηγ. κ. Ι. Σμόνου, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

1/7- 31/10/2006: Πρακτική άσκηση στην εταιρία «Κυλινδρόμυλοι Κρήτης ΑΕ (ΜΥΛΟΙ ΚΡΗΤΗΣ)»

Παρακολούθηση Συνεδρίων & Σεμιναρίων

23/11/ 2013: Organic Chemistry Seminar in Memory of Dr. Maria Hatzimarinakis, November 23, 2013, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

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

4-5/12/2012: Workshop "Heraclitus II", 4-5/12/2012, University of Crete, Heraklion, Greece.

10-13/4/2012: Multistep Enzyme-Catalyzed Processes 2012, April 10 – April 13, 2012, University of Graz, Austria.

10-15/7/2011: 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10th-15th July 2011, Crete, Greece.

27/4– 1/5/2011: COST Action CM0701 "Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry", Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy.

- 23-27/6/2010:** 3rd Conference of Chemistry Graduates Students from Cyprus and Greece, Protaras, Paralimni, Cyprus.
- 3-9/5/2010:** 1st Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School – BIONANOTOX 2010, Heraklion, Greece.
- 10-11/10/2008:** 1st Greek Symposium of Dermatology, Heraklion, Greece.
- 14-15/3/2008:** 13th Greek Symposium of Pharmaceutical Chemistry, Athens, Greece.
- 2-3/2/2008:** 4th International Conference of Biotechnology, Athens, Greece.

Συμμετοχή σε Συνέδρια & Σεμινάρια

1. Smonou I., **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D. "Chemoenzymatic synthesis of the natural product (*R*)-Goniothalamine utilizing ketoreductases", Hellenic Conference of Green Chemistry, 30/10-1/11, **2014**, Ioannina, Greece.
2. **Bariotaki A.**, Stergiou T, Kalaitzakis D, Smonou I. "Exploring the potential of bioreductions for the synthesis of high-added value compounds", 3rd Multistep Enzyme-Catalyzed Processes, 7-10/4, **2014**, Madrid, Spain.
3. Kavvalakis M, Tzatzarakis M, Stivaktakis P, **Bariotaki A.**, Tsakalof A, Vardavas A, Babatsikou F, Vynias D, Tsatsakis A. "Imidacloprid and 6-chloronicotinic acid determination in blood serum of long-term exposed rabbits using LC-APCI-MS technique". 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 7-10/9, **2014**, Edinburgh, Scotland.
4. **Bariotaki A.**, Smonou I. "Chemoenzymatic approach for the synthesis of natural product (*R*)-Goniothalamine", Organic Chemistry Seminar in Memory of Dr. Maria Hatzimarinakis, November 23, **2013**, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
5. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. "Enzymatic reductions of α or γ -substituted- β,δ -diketo esters", 18th European Symposium on Organic Chemistry, 7-12 July, **2013**, Marseille, France.
6. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. "Studies in Enzyme reduction of β,δ -diketoesters", International Conference on Chemistry for Health, 9-14/9, **2012**, Athens, Greece.
7. Smonou I., Kalaitzakis D., **Bariotaki A.** "Enzymatic one pot synthesis of Pharmaceuticals Precursors", Workshop "Heraclitus II", 4-5/12, **2012**, University of Crete, Heraklion, Greece.

8. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Enzymatic one-pot synthesis of dihydroxy esters”, Biotrans 2011, October 2 – 6, 2011, Sicilia, Italy, Multistep Enzyme-Catalyzed Processes 2012, April 10 – April 13, **2012**, University of Graz, Austria.
9. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Orfanopoulos M, Smonou I. “Biocatalytic synthesis of δ -hydroxy- β -keto esters and β,δ -dihydroxy esters”, Biotrans 2011, October 2 – 6, **2011**, Sicilia, Italy.
10. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Biocatalytic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate”, 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10th-15th July, **2011**, Crete, Greece.
11. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Biocatalytic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate”, COST Action CM0701 “Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry”, 27/4-1/5, **2011**, Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy.
12. Smonou I, Kalaitzakis D, **Bariotaki A**. “Biocatalytic reduction of 3,5-diketo esters utilizing isolated Ketoreductases”, 3rd Conference of Chemistry Graduates Students from Cyprus and Greece, 23-27/6, **2010**, Protaras, Paralimni, Cyprus.
13. Smonou I, Smaragdakis M, **Bariotaki A**. “Biochemical synthesis of physical products Xestodecalactones A, B, C”, 4th International Conference of Biotechnology, 2-3/2, **2008**, Athens, Greece.

Δημοσιεύσεις

1. **Bariotaki Anna**, Kalaitzakis Dimitris, Smonou Ioulia. “Enzymatic Reductions for the Regio- and Stereoselective Synthesis of Hydroxy-keto esters and Dihydroxy Esters”. Organic Letters, **2012**, 14, 1792. DOI: 10.1021/ol3003833.
2. Stergiou Anastasios, **Bariotaki Anna**, Kalaitzakis Dimitris, Smonou Ioulia. “Oxone-Mediated Oxidative Cleavage of β -Ketoesters and 1,3-Diketones to α -ketoesters and 1,2-diketones in Aqueous Medium”. Journal of Organic Chemistry, **2013**, 78, 7268–7273.
3. Kavvalakis Matthaios, Tzatzarakis Manolis, Stivaktakis Polychronis, **Bariotaki Anna**, Tsakalof Andreas, Vardavas Alexandros. “Imidacloprid and 6-chloronicotinic acid determination in blood serum of long-term exposed rabbits using LC-APCI-MS technique”. Toxicology Letters, **2014**, 229S, S40-S252.

Επιπλέον Δεξιότητες

Ξένες Γλώσσες	Κατανόηση	Ομιλία	Γράψιμο
Αγγλικά	B2	B2	B2
Γερμανικά	B1	B1	B1

- *First Certificate in English (FCE), University of Cambridge*

- *Mittelstufe, Palso*
- *ZertifikatDiplom, Goethe Institut*

Levels: A1/2: Basic user - B1/2: Independent user - C1/2 Proficient user
Common European Framework of Reference for Languages

Γνώσεις Η/Υ Διαθέσιμο πιστοποιητικό γνώσης ηλεκτρονικών υπολογιστών, εφόσον ζητηθεί.

- Καλή χρήση και γνώση λειτουργικού συστήματος Windows.
- Καλή χρήση και γνώση του διαδικτύου.
- Καλή χρήση και γνώση εφαρμογών Office (Word, Excel, Power Point κ.α.), Internet Browsers και άλλων εφαρμογών (software-ChemDraw, TopSpin, MestRec, κ.α.).

Συμπληρωματικά στοιχεία

- ✓ Μέλος της «Ένωσης Ελλήνων Χημικών», από το 2010.

CURRICULUM VITAE

Full name: Bariotaki Anna
Date of Birth: 24 October 1986
Place of Birth: Chania, Crete, Greece
E-mail: anna-993@hotmail.com, bariotakianna@gmail.com

Education

2011-Today: PhD student in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete

Supervisor: Prof. I. Smonou

2009-2011: M.Sc thesis, Department of Chemistry, University of Crete

Title: "Biocatalytic reductions of β,δ -diketo esters"

Supervisor: Prof. I. Smonou

2004-2009: BS in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.

Experience

2014-Today: Chemistry Instructor in "I.I.E.K. MORFI", Heraklion

2014-Today: Chemistry Instructor in "C.L.S. KEPANSI", Heraklion

2014-Today: Chemistry Instructor in "DOMI" institute, Heraklion

3/2014 - Guest researcher at Technical University of Delft,

6/2014: Netherlands, Supervisor Prof. Dr. F. Hollmann

2010-2012: Teaching assistant in the undergraduate Organic Chemistry I and II laboratory, Supervisor A. Katachanakis

2007-2009: Senior undergraduate diploma thesis "Chemoenzymatic synthesis of the natural product (S)-(+)-5,6-dihydro-6-methyl-2H-pyran-2-one (Parasorbic acid)" elaborated under the supervision of Prof. I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete

1/7- 31/10/2006: Industrial Training Placement at the Company “Mill of Crete”

Congresses / Seminars

- 23/11/ 2013:** Organic Chemistry Seminar in Memory of Dr. Maria Hatzimarinakis, November 23, 2013, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
- 7-12/7/2013:** 18th European Symposium on Organic Chemistry, 7-12 July 2013, Marseille, France.
- 4-5/12/2012:** Workshop "Heraclitus II", 4-5/12/2012, University of Crete, Heraklion, Greece.
- 10-13/4/2012:** Multistep Enzyme-Catalyzed Processes 2012, April 10 – April 13, 2012, University of Graz, Austria.
- 10-15/7/2011:** 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10th-15th July 2011, Crete, Greece.
- 27/4– 1/5/2011:** COST Action CM0701 “Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry”, Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy.
- 23-27/6/2010:** 3rd Conference of Chemistry Graduates Students from Cyprus and Greece, Protaras, Paralimni, Cyprus.
- 3-9/5/2010:** 1st Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist’s School – BIONANOTOX 2010, Heraklion, Greece.
- 10-11/10/2008:** 1st Greek Symposium of Dermatology, Heraklion, Greece.
- 14-15/3/2008:** 13th Greek Symposium of Pharmaceutical Chemistry, Athens, Greece.
- 2-3/2/2008:** 4th International Conference of Biotechnology, Athens, Greece.

Oral and poster presentations in Congresses

1. Smonou I., **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D. “Chemoenzymatic synthesis of the natural product (*R*)-Goniothalamine utilizing ketoreductases”, Hellenic Conference of Green Chemistry, 30/10-1/11, **2014**, Ioannina, Greece.
2. **Bariotaki A.**, Stergiou T, Kalaitzakis D, Smonou I. “Exploring the potential of bioreductions for the synthesis of high-added value compounds”, 3rd Multistep Enzyme-Catalyzed Processes, 7-10/4, **2014**, Madrid, Spain.
3. Kavvalakis M, Tzatzarakis M, Stivaktakis P, **Bariotaki A.**, Tsakalof A, Vardavas A, Babatsikou F, Vynias D, Tsatsakis A. “Imidacloprid and 6-chloronicotinic acid determination in blood serum of long-term exposed rabbits using LC-APCI-MS technique”. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 7-10/9, **2014**, Edinburg, Scotland.
4. **Bariotaki A.**, Smonou I. “Chemoenzymatic approach for the synthesis of natural product (*R*)-Goniothalamine”, Organic Chemistry Seminar in Memory of Dr. Maria Hatzimarinakis, November 23, **2013**, Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
5. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Enzymatic reductions of α or γ -substituted- β,δ -diketo esters”, 18th European Symposium on Organic Chemistry, 7-12 July, **2013**, Marseille, France.
6. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Studies in Enzyme reduction of β,δ -diketoesters”, International Conference on Chemistry for Health, 9-14/9, **2012**, Athens, Greece.
7. Smonou I., Kalaitzakis D., **Bariotaki A.** “Enzymatic one pot synthesis of Pharmaceuticals Precursors”, Workshop "Heraclitus II", 4-5/12, **2012**, University of Crete, Heraklion, Greece.
8. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Enzymatic one-pot synthesis of dihydroxy esters”, Biotrans 2011, October 2 – 6, 2011, Sicilia, Italy, Multistep Enzyme-Catalyzed Processes 2012, April 10 – April 13, **2012**, University of Graz, Austria.
9. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Orfanopoulos M, Smonou I. “Biocatalytic synthesis of δ -hydroxy- β -keto esters and β,δ -dihydroxy esters”, Biotrans 2011, October 2 – 6, **2011**, Sicilia, Italy.
10. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Biocatalytic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate”, 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10th-15th July, **2011**, Crete, Greece.
11. **Bariotaki A.**, Kalaitzakis D, Smonou I. “Biocatalytic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate”, COST Action CM0701 “Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry”, 27/4-1/5, **2011**, Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy.
12. Smonou I, Kalaitzakis D, **Bariotaki A.** “Biocatalytic reduction of 3,5-

diketo esters utilizing isolated Ketoreductases”, 3rd Conference of Chemistry Graduates Students from Cyprus and Greece, 23-27/6, **2010**, Protaras, Paralimni, Cyprus.

13. Smonou I, Smaragdakis M, **Bariotaki A.** “Biochemical synthesis of physical products Xestodecalactones A, B, C”, 4th International Conference of Biotechnology, 2-3/2, **2008**, Athens, Greece.

Publications

1. **Bariotaki Anna**, Kalaitzakis Dimitris, Smonou Ioulia. “Enzymatic Reductions for the Regio- and Stereoselective Synthesis of Hydroxy-keto esters and Dihydroxy Esters”. *Organic Letters*, **2012**, 14, 1792. DOI: 10.1021/ol3003833.
2. Stergiou Anastasios, **Bariotaki Anna**, Kalaitzakis Dimitris, Smonou Ioulia. “Oxone-Mediated Oxidative Cleavage of β -Ketoesters and 1,3-Diketones to α -ketoesters and 1,2-diketones in Aqueous Medium”. *Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 78, 7268–7273.
3. Kavvalakis Matthaios, Tzatzarakis Manolis, Stivaktakis Polychronis, **Bariotaki Anna**, Tsakalof Andreas, Vardavas Alexandros. “Imidacloprid and 6-chloronicotinic acid determination in blood serum of long-term exposed rabbits using LC-APCI-MS technique”. *Toxicology Letters*, **2014**, 229S, S40-S252.

Additional Skills

Other languages	Mother language	Greek		
		Understanding	Speaking	Writing
	English	B2	B2	B2
		<ul style="list-style-type: none"> • <i>First Certificate in English (FCE), University of Cambridge</i> 		
	German	B1	B1	B1
		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mittelstufe, Palso</i> • <i>ZertifikatDiplom, Goethe Institut</i> 		
		Levels: A1/2: Basic user - B1/2: Independent user - C1/2 Proficient user Common European Framework of Reference for Languages		

Computer Skills

Available computer knowledge certificate upon request.

- General knowledge of operation and computer architecture (hardware).
- Good command of Windows operating system.
- Good command of Office applications (Word, Excel, PowerPoint κ.α.), Internet Browsers and other software (ChemDraw, TopSpin, MestRec, κ.α.).

Supplemental information

- ✓ Member of the Association of Greek Chemists, since 2010.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν στερεοεκλεκτικές ενζυμικές αναγωγές με NADPH εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες για την σύνθεση σημαντικών χειρόμορφων ενδιάμεσων και πιο συγκεκριμένα για την σύνθεση οπτικά καθαρών υδροξυ-κετο εστέρων, διυδροξυ εστέρων και α- ή γ-υποκατεστημένων υδροξυ-κετο εστέρων. Επίσης πραγματοποιήθηκε η χημειοενζυμική προσέγγιση για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-Goniothalamine. Σε όλα τα προϊόντα των ενζυμικών αναγωγικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής τους με φασματοσκοπία NMR. Οι εργασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια του Προγράμματος ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II.

Αρχικά ολοκληρώθηκε η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του υποστρώματος 3,5-διόξο-εξανικού τριπ-βουτυλεστέρα προς τον σχηματισμό οπτικά καθαρών διαφορετικών στερεοϊσομερών διυδροξυ-κετο εστέρων σε μία διαδικασία δύο σταδίων σε μία φιάλη, χωρίς την απομόνωση του ενδιάμεσου. Οι ενζυμικές αναγωγές πραγματοποιήθηκαν με χρήση κετορεδουκτασών οι οποίες εμφάνισαν εξαιρετική τοποεκλεκτικότητα και διαστεροεκλεκτικότητα.

Ακολούθησε η μελέτη των ενζυμικά καταλυόμενων αναγωγών του 2-μεθυλο-3,5-διόξο-εξανικού τριπ-βουτυλεστέρα προς το σχηματισμό οπτικά καθαρών διαφορετικών στερεοϊσομερών 2-μεθυλο-5-υδροξυ-3-κετο τριπ-βουτυλεστέρων με υψηλή χημική και οπτική καθαρότητα.

Επίσης, μελετήθηκαν οι ενζυμικά καταλυόμενες αναγωγές του 4-μεθυλο-3,5-διόξο-εξανικού τριπ-βουτυλεστέρα προς το σχηματισμό 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-κετο εστέρων και 4-μεθυλο-3-υδροξυ-5-κετο εστέρων με υψηλή τοποεκλεκτικότητα και υψηλά ποσοστά εναντιομερικής και διαστερομερικής περίσσειας.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η χημειοενζυμική προσέγγιση για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-Goniothalamine.

Τέλος, παρουσιάζεται η μελέτη ενός νέου φωτοκαταλύτη, του graphiticCarbonNitride, στην οξειδωση της κυκλοεξανόλης προς το σχηματισμό κυκλοεξανόνης.

Λέξεις κλειδιά: Βιοκατάλυση, ενζυμική αναγωγή, ενζυμική οξειδωση, κετορεδουκτάσες, οξειδορεδουκτάσες, NADPH, cascade, one-pot, 3,5-διοξο-εξανικός *τριτ*-βουτυλεστέρας, 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανικός *τριτ*-βουτυλεστέρας, 2-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανικός *τριτ*-βουτυλεστέρας, (*R*)-Goniothalamine, κυκλοεξανόνη, οξειδωση κυκλοεξανόλης, graphitic Carbon Nitride (g-C₃N₄)



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ABSTRACT

In the present thesis the stereoselective enzymatic reductions with NADPH-dependent ketoreductases for the synthesis of important chiral intermediates were studied and more specifically for the synthesis of optically pure hydroxy-keto esters, 1,3-dihydroxy esters and α - or γ -substituted hydroxy-keto esters. Also, a chemoenzymatic approach for the synthesis of the natural product (*R*)-Goniothalamine has been accomplished. All products derived from enzymatic reductions were analyzed and characterized and their absolute configuration was determined by NMR spectroscopy. These research projects were accomplished under the Research Program HRAKLEITOS II.

In the first part, the enzymatic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate for the synthesis of 3,5-dihydroxy esters was completed, in a two-step, one-pot method in the same reaction vessel, without the isolation of the intermediate. These products were synthesized with excellent optical purity and chemical yield. Ketoreductases proved to be excellent catalysts with high stereoselectivity and chemoselectivity.

The next part included the studies for the enzymatic reduction of *tert*-butyl-2-methyl-3,5-dioxo-hexanoate for the synthesis of 2-methyl-5-hydroxy-3-keto esters. The products were formed in excellent optical and chemical purity with high enantiomeric and diastereomeric excess.

Also, the enzymatic reduction of *tert*-butyl-4-methyl-3,5-dioxo-hexanoate was studied for the synthesis of 4-methyl-5-hydroxy-3-keto esters and 4-methyl-3-hydroxy-5-keto esters with high stereoselectivity and high enantiomeric and diastereomeric excesses.

In the next part the chemoenzymatic approach for the synthesis of the natural product (*R*)-Goniothalamine, an anti-proliferative agent is presented.

In the last part the investigation of a new photocatalyst of graphitic Carbon Nitride, for the oxidation of cyclohexanol to cyclohexanone, is described.

Keywords: Biocatalysis, enzymatic reduction, enzymatic oxidation, ketoreductases, Oxidoreduktases, NADPH, cascade, one-pot, *tert*-butyl 3,5-dioxohexanoate, *tert*-butyl 4-methyl-3,5-dioxohexanoate, *tert*-butyl 2-methyl-3,5-dioxohexanoate, (*R*)-Goniothalamine, cyclohexanone, cyclohexanol, graphitic Carbon Nitride ($g\text{-C}_3\text{N}_4$).



European Union
European Social Fund



MINISTRY OF EDUCATION & RELIGIOUS AFFAIRS
MANAGING AUTHORITY



Co-financed by Greece and the European Union

Περιεχόμενα

Εξεταστική Επιτροπή	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	7
CURICULUM VITAE	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	17
ABSTRACT	19
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
1.1 Βιοκατάλυση	24
1.2 Μηχανισμός δράσης ενζύμων	31
1.3 Μορφές ενζύμων	33
1.3.1 Απομονωμένα ένζυμα και ολόκληροι μικροοργανισμοί ενζύμων	33
1.3.2 Ακίνητοποιημένα ένζυμα	34
1.4 Κετορεδουκτάσες	36
1.5 Οι κετορεδουκτάσες στην σύνθεση σημαντικών χειρόμορφων ενδιαμέσων και πρόδρομων ενώσεων για προϊόντα με φαρμακευτικό ενδιαφέρον	41
1.6 Συμπαραγόντες	48
1.6.1 Συστήματα αναγέννησης των νικοτιναμιδικών συνενζύμων	51
Α΄ ΚΕΦΑΛΑΙΟ	55
Στόχος της ερευνητικής εργασίας	56
2.1 Σύνθεση χειρόμορφων ενδιαμέσων με χρήση κετορεδουκτασών	57
2.2 Βιοκαταλυτικές αναγωγές α-υποκατεστημένων ή γ-υποκατεστημένων β,δ-δικετο εστέρων	61
2.3 Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων	69
2.4 Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	93
Αντιδραστήρια	94
Όργανα	94
Γενικές συνθετικές μέθοδοι	94
Σύνθεση Υποστρωμάτων και Ενζυμικές Αναγωγές	97
Β΄ ΚΕΦΑΛΑΙΟ	103
3.1 Λακτόνες	104

3.1.1 Λακτονοποίηση υποκατεστημένων δ-υδροξυ-οξέων -----	104
3.1.2 Κλείσιμο του δακτυλίου με μετάθεση RCM -----	105
3.1.3 Κλείσιμο του δακτυλίου με διάφορες μεθόδους -----	106
3.2 Σύνθεση φυσικών προϊόντων με χρήση κετορεδουκτασών -----	108
3.3 (<i>R</i>)-Goniothalamine -----	111
3.4 Χημειοενζυμική προσέγγιση για την σύνθεση της (<i>R</i>)-Goniothalamine -----	117
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -----	124
Σύνθεση Υποστρωμάτων και Ενζυμικές Αναγωγές -----	125
Γ' ΚΕΦΑΛΑΙΟ -----	130
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -----	149
Αντιδραστήρια -----	150
Όργανα -----	150
Αντίδραση Φωτοξείδωσης -----	150
Βιβλιογραφία -----	151
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 -----	156
ΦΑΣΜΑΤΑ ¹ H και ¹³ CNMR -----	156
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 -----	184
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ GC-CHIRAL -----	184

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοκατάλυση

Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είναι απαραίτητες σε κάθε γνωστό είδος ζωής και αποτελούν σημαντική κατηγορία αντιδράσεων σε μεταβολικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική αναπνοή και η φωτοσύνθεση. Οι οξειδοοδουκτάσες αποτελούν πάνω από 25% των γνωστών ενζύμων, και πλέον αποτελούν καθιερωμένους εναλλακτικούς καταλύτες, όπως και τα υδρολυτικά ένζυμα, για τους συνθετικούς χημικούς δεδομένου ότι διαθέτουν εξαιρετικές ιδιότητες ως προς την απόδοση, την επεκτασιμότητα και την επιλεκτικότητα σε συνθετικές διαδικασίες. Η ομογενής κατάλυση και η οργανοκατάλυση έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί πολλά χρόνια τώρα, και η βιοκατάλυση κατά την τελευταία δεκαετία με σημαντικά αποτελέσματα στην ασύμμετρη σύνθεση, παίζοντας εξαιρετικό ρόλο στην σύνθεση φαρμακευτικών ουσιών. Δεδομένου ότι περισσότερα από το 50% των υποψηφίων φαρμακευτικών ενώσεων διαθέτουν περισσότερα από ένα στερεογονικά κέντρα, η ασύμμετρη σύνθεση διαρκώς έχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές ενώσεις και τα χειρόμορφα ενδιάμεσα. Οι πληροφορίες και βάσεις δεδομένων Βιοκατάλυσης είναι πλέον πολύ εμπλουτισμένες για χρήση και εφαρμογή τόσο για την φαρμακευτική βιομηχανία, την χημική βιομηχανία όσο και για συνθετική βιολογία. Τα ένζυμα όταν έχουν τροποποιηθεί μέσω πρωτεϊνικής μηχανικής ώστε να προσαρμόζονται σε κάποια συνθετική πορεία, μπορούν να ανταγωνιστούν τους χημικούς καταλύτες ως προς το κόστος, την απόδοση, καθαρότητα προϊόντων και την εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα^{1,2,3}

Στα τέλη του 20ου αιώνα μεγάλο τμήμα της επιστημονικής κοινότητας θεωρούσε τα ένζυμα ακριβά, ότι δέχονται μικρή ποικιλία υποστρωμάτων, ότι είναι ασταθή σε υψηλές θερμοκρασίες και μη λειτουργικά σε οργανικούς διαλύτες. Ωστόσο, όλες αυτές οι προκαταλήψεις πλέον έχουν εκλείψει, στον 21ο αιώνα, ο οποίος έχει χαρακτηριστεί «χρυσός αιώνας» της βιοτεχνολογίας και της βιοκατάλυσης. Ιδιαίτερα με την ανάπτυξη της γενετικής και πρωτεϊνικής μηχανικής πλέον πολλά στοιχεία έχουν βελτιωθεί ως προς τη συμπεριφορά των ενζύμων στις χημικές αντιδράσεις. Έτσι πολλές νέες εφαρμογές της βιοκατάλυσης χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία.

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια, πρωτεϊνικής φύσεως, εξαιρουμένων τα ribozymes (ριβόζυμα), τα οποία καταλύουν τις περισσότερες βιολογικές αντιδράσεις *in vivo*. Επίσης χρησιμοποιούνται αρκετά στις αντιδράσεις είτε με φυσικά είτε και με μη φυσικά υποστρώματα *in vitro*. Η ικανότητα τους να καταλύουν συνθετικές μετατροπές, οι οποίες υπό άλλες συνθήκες θα ήταν αδύνατες, είναι μια από τις σπουδαιότερες ευκαιρίες που έχουν τώρα στη διάθεσή τους οι οργανικοί χημικοί. Τα κύρια χαρακτηριστικά των βιοκαταλυτών αυτών και τα οποία τους διαφοροποιούν από τους υπόλοιπους χημικούς καταλύτες είναι τα εξής⁴:

- Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Γενικά οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι υψηλότερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του $10^8 - 10^{10}$. Σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της ταχύτητας μπορεί να υπερβεί τον παράγοντα 10^{12} , τιμή την οποία οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να επιτύχουν.⁵ Γενικά οι χημικοί καταλύτες χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0.1% - 1% σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται για αντίστοιχες ταχύτητες, σε συγκεντρώσεις της τάξης του $10^{-3} \% - 10^{-4} \%$, γεγονός που καθιστά τα ένζυμα ιδιαίτερα αποτελεσματικούς καταλύτες.
- Τα ένζυμα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μεταβατικών μετάλλων καθώς είναι αποικοδομήσιμα στο περιβάλλον και λειτουργικά σε υδατικά διαλύματα.
- Είναι ενεργά κάτω από ήπιες συνθήκες όπως σε θερμοκρασία 20–40 °C καθώς και σε pH 5–8. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων, μη επιθυμητών αντιδράσεων, όπως οι αποικοδομήσεις, ισομεριώσεις, υποκαταστάσεις και ρακεμοποιήσεις.
- Το γεγονός ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες, δίνει τη δυνατότητα της χρήσης περισσοτέρων του ενός ενζύμων ταυτόχρονα πραγματοποιώντας πολλά στάδια αντίδρασης σε ένα μόνο εργαστηριακό σκεύος. Αυτό είναι αρκετά πρακτικό στην περίπτωση όπου ένα ενδιάμεσο προϊόν είναι

αρκετά ασταθές και είναι αδύνατη η απομόνωσή του ή στην περίπτωση όπου μια ανεπιθύμητη ισορροπία μπορεί να οδηγηθεί προς το επιθυμητό προϊόν συνδυάζοντας δυο συνεχόμενα ενζυμικά στάδια.

- Μπορούν να δεχτούν αρκετά μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, καθώς καταλύουν αντιδράσεις είτε φυσικών είτε μη φυσικών υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση. Μόλις τη δεκαετία του 1980 άρχισε η δυναμική εφαρμογή των φυσικών καταλυτών για τη μετατροπή μη φυσικών οργανικών ενώσεων και από τότε συνεχίζεται με επιτυχία, με αποτέλεσμα την ραγδαία εξέλιξη του πεδίου της βιοκατάλυσης.
- Λόγω ύπαρξης πολλών διαφορετικών ενζύμων, οι βιοκαταλύτες μπορούν να καταλύσουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών αντιδράσεων. Έτσι, τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί από τη διεθνή ένωση βιοχημείας και μοριακής βιολογίας (International Union of Biochemistry and molecular biology) σε έξι κύριες ομάδες:
 1. Τις **οξειδοοξειδοκτάσες**, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.
 2. Τις **τρανσφεράσες** που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων, όπως άκυλο και φωσφορικών ομάδων ή σακχάρων, από ένα μόριο σε άλλο
 3. Τις **υδρολάσες** που καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και πεπτιδίων.
 4. Τις **λυάσες** που καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.
 5. Τις **ισομεράσες** που καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού όπως τη μετακίνηση διπλών δεσμών, Z/E ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.
 6. Τις **λιγάσες** που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.

Τα ένζυμα – βιοκαταλύτες κατατάσσονται στην κατηγορία των ετερογενών καταλυτών, εξαιτίας του μεγάλου μοριακού τους βάρους, εφόσον είναι κατά κύριο

μέρος πρωτεΐνες, σε σχέση με τα υποστρώματα, τα οποία μετατρέπουν μέσω διαφόρων καταλυόμενων αντιδράσεων. Σε μία βιοκαταλυτική αντίδραση, τα αντιδρώντα ονομάζονται υποστρώματα. Συνένζυμα ονομάζονται τα «βοηθητικά» υποστρώματα, τα οποία βοηθούν και υποστηρίζουν την λειτουργία του ενζύμου. Ο συνδυασμός ενζύμου και συνενζύμου ονομάζεται ολοένζυμο. Ενώ ένα ένζυμο αδρανές πλέον, λόγω απουσίας/κατανάλωσης του συνενζύμου, ονομάζεται αποένζυμο. Τα συνένζυμα είναι είτε οργανικά είτε ανόργανα μόρια.

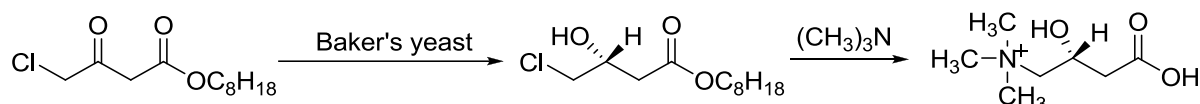
Τα ένζυμα είναι δραστικά κυρίως σε υδατικά διαλύματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στην εξωτερική επιφάνειά τους εντοπίζονται υδρόφιλες πολικές ομάδες, όπως $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{CONH}_2$, ενώ στην εσωτερική υδρόφοβες, όπως αρυλο και αλκυλο ομάδες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η επιφάνεια του ενζύμου να είναι καλυμμένη από ένα υδατικό στρώμα που φτάνει έως και το 10% της ποσότητας του ενζύμου σε ξηρή κατάσταση. Το νερό αυτό είναι απαραίτητο για να αποκτήσει το ένζυμο την κατάλληλη τρισδιάστατη δομή και έτσι την δραστικότητά του. Ολόκληρη η δομή που αποκτά το ένζυμο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις Van-Der-Waals των αλειφατικών αλυσίδων, π-π αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή γέφυρες αλάτων μεταξύ φορτισμένων ομάδων του μορίου. Εκτός από τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που αποτελούν τον σκελετό του ενζύμου (πρωτεΐνη), δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ ατόμων S (S – S) και ονομάζονται δισουλφιδικοί δεσμοί. Τέτοιοι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί, καθώς ανάλογα με τον αριθμό δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο επηρεάζεται η σταθερότητά του στη θερμοκρασία. Μεγάλη επιρροή στη θερμο-σταθερότητα του ενζύμου έχουν επίσης και οι δεσμοί αλάτων καθώς και τα κατάλοιπα ασπαραγινικού οξέος.

Τα ένζυμα εξαιτίας της πολύπλοκης δομής τους διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα τα οποία και φαίνονται μέσα από τις αντιδράσεις που καταλύουν.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ενζύμων είναι η κάθε είδους εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν:

α) Χημειοεκλεκτικότητα

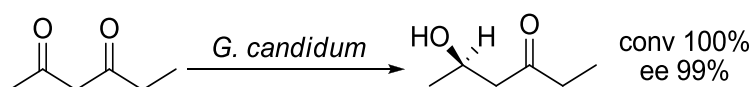
Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να δρουν εκλεκτικά σε μια δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών ομάδων του ίδιου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καθαρών ενώσεων χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων. Παράδειγμα αποτελεί η χημειοενζυμική σύνθεση της L-Καρνιτίνης (Σχήμα 1).⁶



Σχήμα 1. Σύνθεση της L-Καρνιτίνης

β) Τοποεκλεκτικότητα

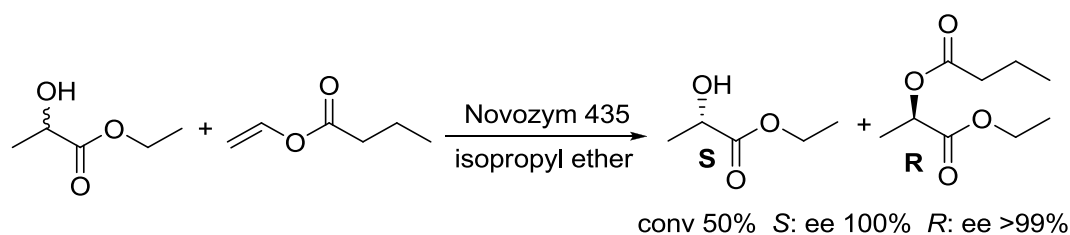
Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγωγή της 2,4-εξανοδιόνης με το μύκητα *Geotrichum candidum* (Σχήμα 2).⁷



Σχήμα 2. Σύνθεση της οπτικά ενεργής 2-υδροξυ-4-εξανόνης

γ) Εναντιοεκλεκτικότητα

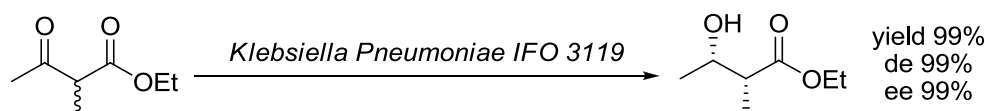
Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου, όπως φαίνεται στην αντίδραση εστεροποίησης του 2-υδροξυ προπανοϊκού αιθυλεστέρα με τη λιπάση *Candida Antarctica B* (Σχήμα 3).⁸



Σχήμα 3. Αντίδραση εστεροποίησης του (R)-2-υδροξυ-προπανικού εστέρα

δ) Διαστερεοεκλεκτικότητα

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα διαστερομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντίδραση αναγωγής του 2-μεθυλο-ακετοξικού αιθυλεστέρα με τον μικροοργανισμό *Klebsiella Pneumoniae* IFO 3119 (Σχήμα 4).⁹



Σχήμα 4. Ενζυμική αναγωγή του α-υποκατεστημένου κετο-εστέρα

Από τον 19ο αιώνα ξεκίνησε η παρατήρηση και η μελέτη των ενζύμων. Το 1811, ο Kirshhoff βρήκε ότι η μαλτόζη σχηματίζεται από το άμυλο μέσω του κριθαριού και το 1836 ο Schwann ονόμασε ένα συστατικό του στομαχιού ως «πεψίνη», η οποία υδρολύει το κρέας. Τέλος, το 1860, ο Berthelot παρατήρησε έντονη δραστηριότητα σε εκχύλισμα ζύμης. Ο όρος «ένζυμο» επινοήθηκε το 1876, από τον Kühne, εννοώντας μέσα “in-en” στην ζύμη “zyme”. Παρόλο που υπήρχαν βιομετατροπές βασιζόμενες σε μικροβιακά συστήματα, η ιδέα της χρήσης ενζύμων ως καταλυτών επεκτάθηκε, καθώς και η ανάπτυξη βιομετατροπών με την χρήση πλέον απομονωμένων ενζύμων.¹⁰ Έτσι, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται κυρίως λιπάσες (εστεράσες), κετορεδουκτάσες (αλκοολικές αφυδρογονάσες) και τρανσαμινάσες σε βιοκαταλυτικές μετατροπές στην Οργανική σύνθεση.

Πριν αναλυθούν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της χρήσης των ενζύμων στην οργανική σύνθεση, πρέπει να γίνει μια μικρή ανασκόπηση που αφορά στον τρόπο που επιλέγεται σε μια συνθετική πορεία μια καταλυτική αντίδραση, σε σχέση με τον τελικό σκοπό που επιδιώκεται. Οικονομία ατόμων; Διαθεσιμότητα του απαιτούμενου υποστρώματος; Υψηλή εναντιεκλεκτικότητα έως και 99%; Διαθεσιμότητα του καταλύτη; Σταθερότητα και δυνατότητα ανακύκλωσης του καταλύτη; Υψηλή μετατροπή και απόδοση μεγαλύτερη του 95%; Υψηλό ποσοστό παραγωγικότητας; Τα παραπάνω ερωτήματα αντιπροσωπεύουν χαρακτηριστικούς προβληματισμούς. Γενικά η

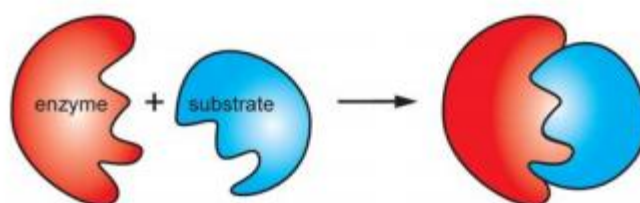
υψηλή μετατροπή και εναντιοεκλεκτικότητα είναι τα πιο επιθυμητά και ζητούμενα σε μία βιοκαταλυτική αντίδραση. Ένα από τα πρακτικότερα πλεονεκτήματα των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων είναι ότι από μία τέτοια αντίδραση με ποσοτική μετατροπή >99%, όχι μόνο λαμβάνουμε την μέγιστη δυνατή ποσότητα σε προϊόν αλλά απλοποιείται και ο διαχωρισμός της αρχικής ουσίας από το παραγόμενο προϊόν. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα των ενζύμων ως βιοκαταλυτών είναι οι υψηλές εκλεκτικότητες που παρουσιάζουν σε ενζυμικές αντιδράσεις. Η ιδανικά υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα είναι μεγαλύτερη του 99%. Ξεκινώντας από προχειρόμορφες ενώσεις, το επιθυμητό προϊόν παράγεται με υψηλή εναντιομερική περίσσεια >99%, ενώ σε περιπτώσεις ενζύμων wild-type, όπου δεν επιτυγχάνεται υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα, υπάρχουν πολλές μεθοδολογίες, με τις οποίες μπορεί να αναστραφεί το αποτέλεσμα και να βελτιστοποιηθεί. Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα που παρουσιάζουν τα ένζυμα, είναι ότι τα υποστρώματα συχνά χρησιμοποιούνται χωρίς να έχει προηγηθεί προστασία των χαρακτηριστικών ομάδων, λόγω της υψηλής τοποεκλεκτικότητας των ενζύμων.

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, χαρτοπολτού και στα απορρυπαντικά για δεκαετίες, κυρίως ως μίγματα απομονωμένα από κύτταρα. Έχουν επίσης εφαρμογή στην ωρίμανση των τυριών και στην κατασκευή δερμάτινων ειδών. Παρόλο τον μεγάλο αριθμό εφαρμογών στην βιομηχανία τροφίμων, η βιοκατάλυση έχει κινήσει πολύ το ενδιαφέρον της βιομηχανίας χημικών, για πολλούς λόγους, τα τελευταία χρόνια. Αρχικά, τα ένζυμα ήταν σχετικά ακριβά, δύσκολα στην χρήση τους και στην ανακύκλωση τους. Επίσης, πολλά χημικά προέρχονται παραδοσιακά από το πετρέλαιο, με διαδικασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες, υψηλές πιέσεις και ακραίες συνθήκες pH. Επειδή όμως το πετρέλαιο είναι ακριβό και όσο περνάνε τα χρόνια η διάθεση του περιορίζεται, τον 20^ο αιώνα η χημική βιομηχανία χρησιμοποιεί κάποιες βιοκαταλυτικές μεθόδους, εκμεταλλευόμενη τα πλεονεκτήματα της και τις πολλές εφαρμογές της.

1.2 Μηχανισμός δράσης ενζύμων

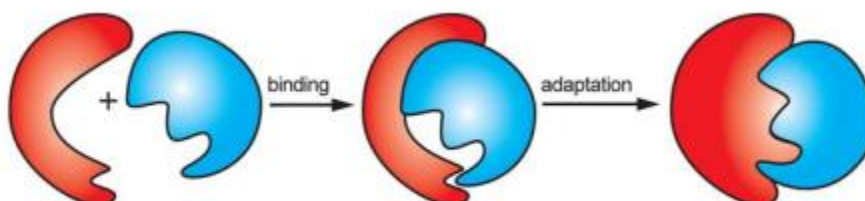
Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι συνήθως μια κοιλότητα που περιβάλλεται από κατάλοιπα αμινοξέων. Αυτά τα κατάλοιπα, και μερικές φορές το ολόενζυμο, βοηθούν το υπόστρωμα να συνδεθεί με το ένζυμο. Τα ένζυμα χρησιμοποιούν τέσσερα είδη δράσεων για να συνδεθούν με τα υποστρώματα: ηλεκτροστατικές δυνάμεις, δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς van den Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Τα ένζυμα οφείλουν την δραστικότητα τους και την μοναδική εκλεκτικότητα τους στην χημική και χωρική διαμόρφωση της ενεργής πλευράς/κοιλότητας τους. Το 1894 ο Γερμανός Emil Fischer, και βραβευμένος με βραβείο Nobel το 1902, παρουσίασε το μοντέλο “lock-and-key” (Σχήμα 5).¹¹



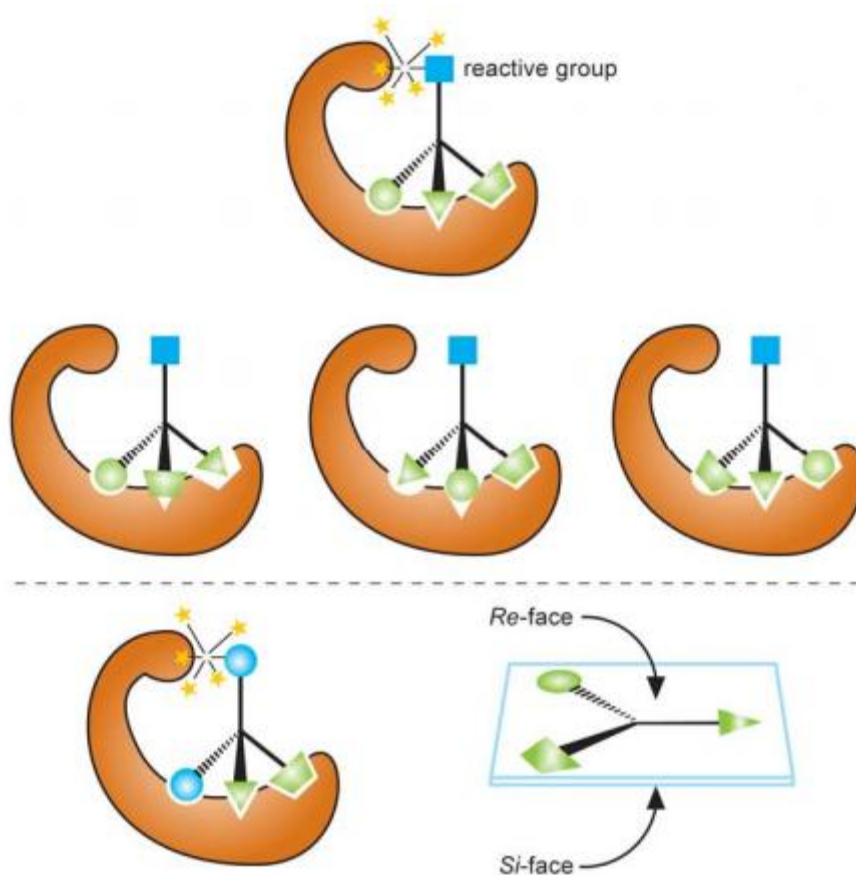
Σχήμα 5. Μοντέλο “lock and key”

Η ιδέα αναδιατυπώθηκε το 1960 από τον Daniel Koshland, ο οποίος επεξήγησε ότι μερικά ένζυμα πρώτα προσδέονται στο υπόστρωμα και στη συνέχεια αναδιατάσσουν το ενεργό τους κέντρο, σε σχήμα, φορτίο ή και πολικότητα (Σχήμα 6). Βάσει αυτής της αναδιάταξης, τα κατάλοιπα αμινοξέων που είναι ενωμένα κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθιστούν το υπόστρωμα ασταθές, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος να είναι παρόμοιο δομικά με το ενεργοποιημένο σύμπλοκο και αντίστοιχο με την δομή της μεταβατικής κατάστασης.^{12a}



Σχήμα 6. Η πρόσδεση ενζύμου-υποστρώματος και η αναδιάταξη τους

Ο τρόπος πρόσδεσης του ενεργού κέντρου με το υπόστρωμα είναι υπεύθυνος για την ικανότητα του ενζύμου να διαχωρίζει πλευρές βάσει χειρομορφίας και να παράγει οπτικά ενεργά προϊόντα. Στο παρακάτω Σχήμα (Σχήμα 7) φαίνεται η ένωση του χειρόμορφου υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου περιέχονται τρία κατάλοιπα αμινοξέων. Μόνο ένα εναντιομερές προσδέεται αποτελεσματικά και αντιδρά, ενώ το άλλο δεν μπορεί να προσδεθεί σε καμία πιθανή θέση πρόσδεσης. Ο ίδιος μηχανισμός ισχύει και στα προ-χειρόμορφα υποστρώματα. Η ενεργή πλευρά του ενζύμου διαχωρίζει τις *pro-R* και *pro-S* πλευρές του υποστρώματος και μεταξύ τους τις επιφάνειες σε *si* και *re* στο επίπεδο προ-χειρόμορφο μόριο.



Σχήμα 7. Πιθανοί τρόποι πρόσδεσης ενζύμου-υποστρώματος

Συγκεκριμένα αφυδρογονάσες, ρεδουκτάσες, οξειδάσες και οξυγενάσες απαιτούν την παρουσία ενζύμου και συνενζύμου, και δρουν μαζί ώστε να πραγματοποιήσουν μια ενζυμική αντίδραση. Τα συνένζυμο και το υπόστρωμα ενώνονται στο ένζυμο, το

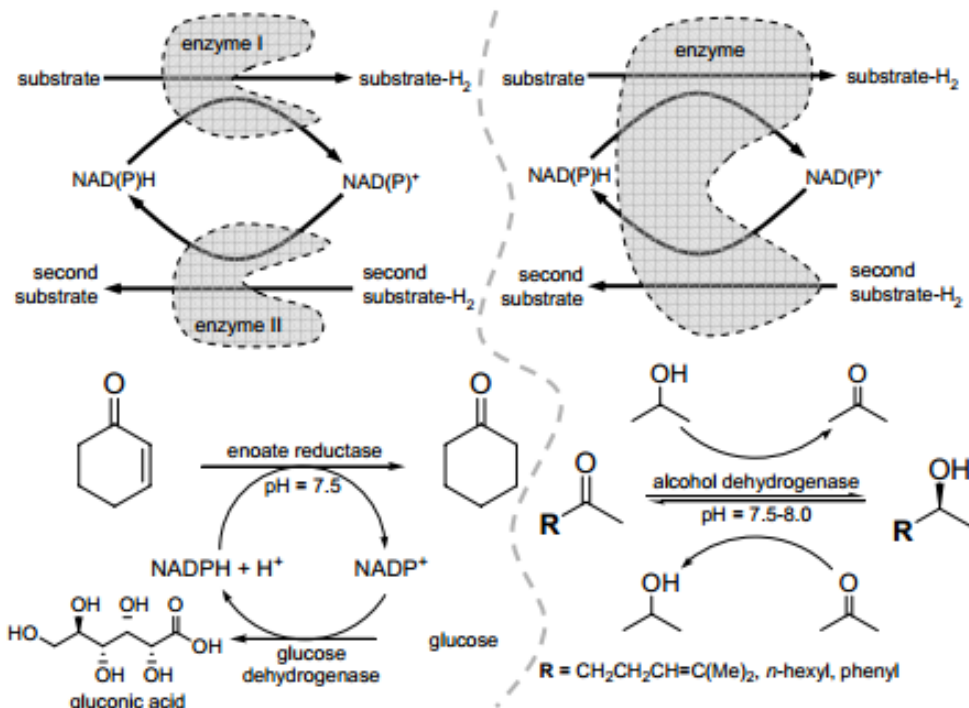
υπόστρωμα ανάγεται ή οξειδώνεται, ενώ το συνένζυμο πραγματοποιεί την αντίστροφη αντίδραση. Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση το συνένζυμο και το προϊόν πλέον, αποδεσμεύονται από το ένζυμο και έτσι το ένζυμο μπορεί να συνεχίσει να πραγματοποιεί ένα νέο καταλυτικό κύκλο.^{12b}

1.3 Μορφές ενζύμων

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται σε δύο κύριες μορφές α) απομονωμένα με διαφορετικούς βαθμούς καθαρότητας ή β) ολόκληροι μικροοργανισμοί, σε ελεύθερη μορφή ή ακινητοποιημένα.^{4,11} Κάθε κατηγορία παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και η επιλογή τους εξαρτάται από τον επιθυμητό μετασχηματισμό που πρόκειται να καταλύσουν.

1.3.1 Απομονωμένα ένζυμα και ολόκληροι μικροοργανισμοί ενζύμων

Τα απομονωμένα ένζυμα παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόδοση και λιγότερες παράπλευρες αντιδράσεις που οδηγούν στον σχηματισμό παραπροϊόντων. Τα απομονωμένα ένζυμα είναι λιγότερο πολύπλοκα από τα κύτταρα, καθιστώντας τα αντίστοιχα με τους χημικούς καταλύτες. Έχουν χρησιμοποιηθεί συνήθως για υδρόλυση και ισομερίωση αντιδράσεων, όπου δεν απαιτείται η παρουσία συνενζύμων. Στις περισσότερες περιπτώσεις για το συνένζυμο απαιτείται ανακυκλωτικό σύστημα, το οποίο συνήθως είναι δαπανηρό, εάν γίνει χρήση περαιτέρω ενζύμων, ωστόσο το κόστος μειώνεται όταν χρησιμοποιείται για την ανακύκλωση ένα δεύτερο υπόστρωμα. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Ανακύκλωση ενζύμου με α) χρήση ανακυκλωτικού συστήματος γλυκόζης/αφυδρογονάσης της γλυκόζης και β) με χρήση δεύτερου υποστρώματος

Στην πρώτη περίπτωση ο Bommarius και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το σύστημα γλυκόζης/αφυδρογονάσης της γλυκόζης για την ανακύκλωση του νικοτιναμδικού συμπαραγόντα, μετατρέποντας την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ, αντίδραση καταλυόμενη από την αφυδρογονάση της γλυκόζης. Στην δεύτερη περίπτωση, ο Kroutil και η ομάδα του, σχεδίασαν και εφάρμοσαν ένα καταλυτικό κύκλο οξείδωσης αλκοόλης σε κετόνη, μέσω ασύμμετρης μεταφοράς υδριδίου.¹³

1.3.2 Ακίνητοποιημένα ένζυμα

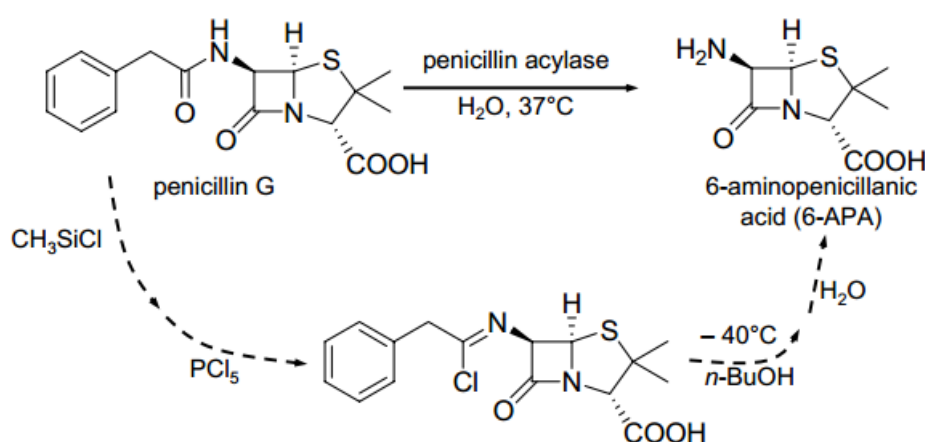
Σαν σταθεροποιημένα ένζυμα ονομάζονται τα ένζυμα που είναι ακίνητοποιημένα πάνω σε κάποιο υπόστρωμα, το οποίο δεν λαμβάνει μέρος στους εκάστοτε μετασχηματισμούς αλλά αποσκοπεί στην σταθερότητα του ενζύμου.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι σταθεροποίησης ενός ενζύμου σε κάποιο υπόστρωμα, επομένως και τρία διαφορετικά είδη σταθεροποίησης ενός ενζύμου.

Συγκεκριμένα: α) με ένωση του ενζύμου πάνω σε κάποιο στερεό με ομοιοπολικό δεσμό ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις, β) «παγιδεύοντας» το ένζυμο εσωτερικά ενός στερεού πλέγματος ή γέλης και γ) με διασταύρωση διαφόρων ενζύμων. Στην πρώτη περίπτωση τα ένζυμα προσδένονται πάνω σε συνθετικά πολυμερή, όπως ακρυλικές ρητίνες, άμυλο, κυτταρίνη ή την Degussa'sEupergitρητίνη. Αυτά τα πολυμερή περιέχουν συνήθως μία ομάδα ακρυλαμιδίου ή μεθακρυλικού οξέος με πλευρική ομάδα ένα εποξειδίο, η οποία αντιδρά με τα αμινοξέα του ενζύμου, δημιουργώντας σε πολλά διαφορετικά σημεία ομοιοπολικούς δεσμούς. Στην περίπτωση όπου ένζυμα «παγιδεύονται» σε κάποιο πλέγμα, ουσιαστικά πραγματοποιείται πολυμερισμός ενός μονομερούς όπως το ακρυλαμίδιο παρουσία του ενζύμου, σχηματίζοντας έτσι πορώδεις πολυμερικές γέλες, οι οποίες περιέχουν το ένζυμο και επιτρέπουν τη διάχυση του υποστρώματος και του προϊόντος. Ουσιαστικά είτε το ένζυμο αναπτύσσεται πάνω στο πλέγμα, είτε το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε ένα διαφορετικό υπόστρωμα, το οποίο με τη σειρά του αναπτύσσεται πάνω στο πλέγμα. Σε αυτή την κατηγορία ακινητοποίησης, το πλέγμα μπορεί να είτε γέλη είτε και κάποιο είδος ίνας. Τέλος, ο συνδυασμός διαφόρων ενζύμων σε κρυσταλλική μορφή (Cross Linked Enzyme Crystals, CLECs) αρχικά αναπτύχθηκε το 1964 από τους F. Quijcho και F. Richards. Ο συνδυασμός αυτός, παρουσίαζε μικρότερη δραστικότητα σε σχέση με ένα μη ακινητοποιημένο ένζυμο, αλλά παρουσίασε υψηλά ποσοστά μετατροπής. Η ιδέα αυτή εξελίχθηκε από τον Roger Sheldon, (Cross Linked Enzyme Aggregates, CLEAs), όπου στα διαλύματα των ενζύμων προκαλούσε την καθίζηση τους, προσθέτοντας αιθυλενο-γλυκόλη ή θειϊκό αμμώνιο.¹⁴

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα λοιπόν είναι πολύ ενεργά και εξαιρετικά εκλεκτικά στις αντιδράσεις. Ένα απομονωμένο ακινητοποιημένο ένζυμο, χρησιμοποιείται και έχει όλα τα πλεονεκτήματα ενός χημικού καταλύτη, δηλαδή είναι εύκολο στην χρήση, μπορεί να ανακτηθεί από το διάλυμα της αντίδρασης μέσω απλής διήθησης. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαδοχικές αντιδράσεις μεγάλης κλίμακας. Επιπλέον, είναι σταθεροί σε θερμοκρασίες και μεταβολές του pH. Αυτό αποτελεί ένα συγκριτικό πλεονέκτημα της βιοκατάλυσης σε σχέση με συμβατικές συνθετικές πορείες. Η εφαρμογή ενζύμων στην χημική βιομηχανία έχει αναπτυχθεί ραγδαία και πολλές εταιρίες έχουν επενδύσει στην ονομαζόμενη «λευκή βιοτεχνολογία». Όπως αναφέρθηκε, πολλές βιοκαταλυτικές διαδικασίες έχουν σκοπό την σύνθεση νέων ενώσεων, οι οποίες

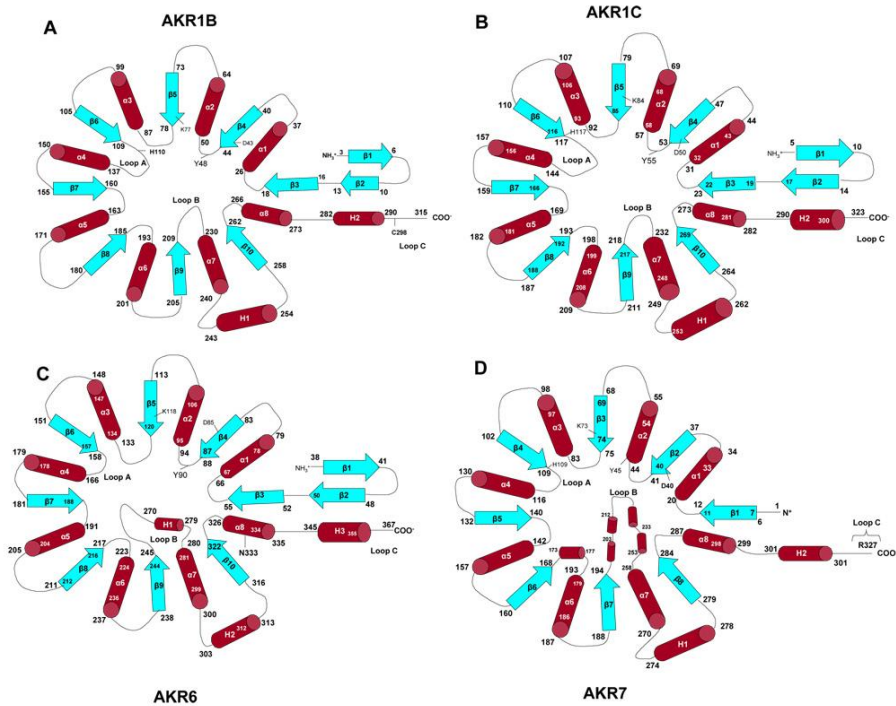
ήταν δύσκολο να συντεθούν με παραδοσιακές χημικές μεθόδους. Πρόκληση αποτελεί η αντικατάσταση μιας υπάρχουσας διαδικασίας με μία βιοκαταλυτική, επειδή με την νέα πορεία παράγεται καλύτερης ποιότητας προϊόν με λιγότερο κόστος και προσπάθεια. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πενικιλίνη (Σχήμα 9). Η πενικιλίνη μετασχηματίζεται με την χρήση της ακυλάσης της, σε 6-αμινο-πενικιλικό οξύ, δομή η οποία είναι πρόδρομη ένωση για μια μεγάλη ποικιλία αντιβιοτικών, αποφεύγοντας έτσι πολλά βήματα με ακραίες θερμοκρασίες και πολλά χημικά αντιδραστήρια.¹⁰



Σχήμα 9. Μετατροπή πενικιλίνης προς 6-αμινο-πενικιλικό οξύ είτε απευθείας μέσω ακυλάσης είτε σε 2 βήματα με απαιτητικές συνθήκες

1.4 Κετορεδουκτάσες

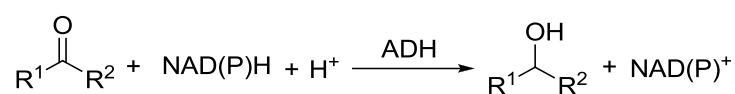
Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και απομονώνονται από φυτά, βακτήρια, διαδικασίες ζύμωσης, ψάρια αλλά κι από θηλαστικά όπως άνθρωποι, κουνέλια, ποντίκια. Αυτά τα ένζυμα έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς από φυτικά και ζωικά κύτταρα. Αυτή η οικογένεια ενζύμων περιλαμβάνει μονομερή NADPH-εξαρτώμενων οξειδορεδουκτασών, όπως αναγωγάσες αλδευδών και αλδοζών, συνθάση προσταγλανδίνης F και ξυλόζη αναγωγάση. Η δομή τους γενικά περιλαμβάνει βήτα-άλφα-βήτα πτυχωσεις, και η πτυχή αυτή περιλαμβάνει μια ομάδα δεσμευτική για το NADPH.



Γενικά οι κετορεδουκτάσες είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μονομερή ένζυμα, όμως σε μικρό ποσοστό έχουν απομονωθεί και τετραμερείς κετορεδουκτάσες, κυρίως από θηλαστικά.¹⁵ Ορισμένοι από αυτούς τους βιοκαταλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μέσα στο φυσικό τους περιβάλλον, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και τα κύτταρα (whole cell), οπότε σε αυτή την περίπτωση το απαραίτητο συνένζυμο προμηθεύεται συνεχώς από τα κύτταρα, είτε μετά από την απομόνωσή τους, οπότε απαιτείται η προσθήκη συνενζύμου. Εμπορικά διαθέσιμοι βιοκαταλύτες περιλαμβάνουν μαγιά της ζύμης (baker's yeast), και αλκοολικές αφυδρογονάσες από την μαγιά της ζύμης, *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), horse liver και hydroxysteroid dehydrogenase από *Pseudomonas testosterone* και *Bacillus Spherisus*.¹⁶

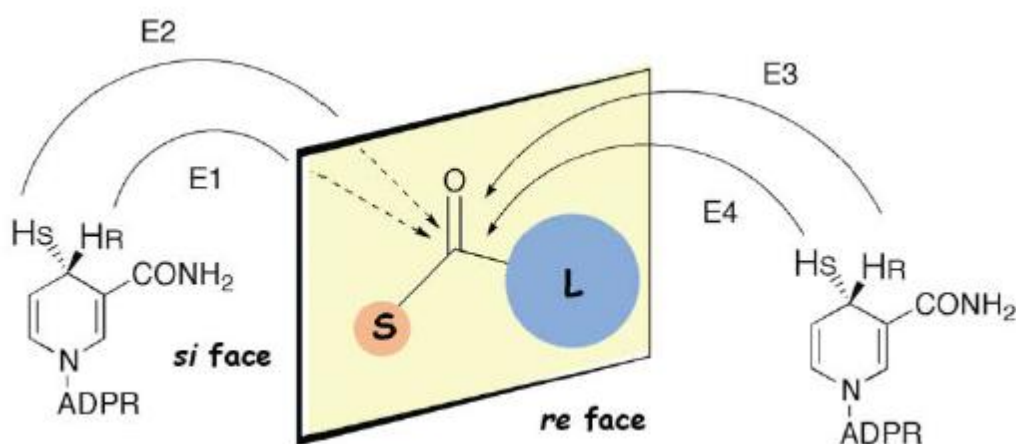
Η φυσική αποστολή αυτών των βιοκαταλυτών είναι η κατάλυση της αναγωγής καρβονυλικών ενώσεων. Τα φυσικά τους υποστρώματα είναι αλκοόλες όπως αιθανόλη, γαλακτικό, γλυκερόλη κ.τ.λ. καθώς και οι αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά έχουν τη ικανότητα να ανάγουν εναντιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα. Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα ένζυμα αυτά απαιτούν τη χρήση συνενζύμων

όπως NADH ή NADPH. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του Σχήματος (Σχήμα 10):



Σχήμα 10. Αντίδραση αναγωγής με μεταφορά υδριδίου

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων ανάλογα με τον τρόπο ενεργοποίησης του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα (Σχήμα 11).¹⁷ Στις κατηγορίες E1 και E2, η προσβολή του υδριδίου γίνεται στην *si*-επιφάνεια της καρβονυλομάδας και στις κατηγορίες E3 και E4, η προσβολή γίνεται στην *re*-επιφάνεια, προκύπτοντας αντίστοιχα οι *R* και *S* αλκοόλες. Μηχανιστικά τα ένζυμα που ανήκουν στις κατηγορίες E1 και E3 μεταφέρουν το *pro*-(*R*)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ αυτά που κατατάσσονται στις κατηγορίες E2 και E4 μεταφέρουν το *pro*-(*S*)-υδρίδιο κατά την αναγωγή.



Σχήμα 11. Αναγωγή καρβονυλίου από NADH

Παραδείγματα ενζύμων E1 – E3 είναι:

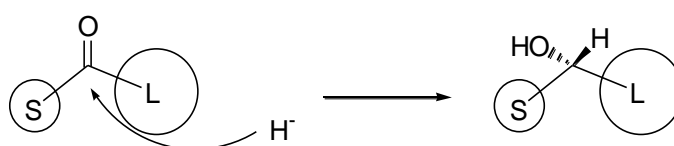
E1: *Pseudomonas* Sp. alcohol dehydrogenase,¹⁷ *Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase.¹⁸

E2: *Geotrihum candidum* glycerol Dehydrogenase,¹⁹ *Mucor javanicus* dihydroxyacetone reductase.

E3: Yeast alcohol dehydrogenase, Horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH),²⁰ *Moraxella* sp. alcohol dehydrogenase (Moraxella sp. ADH).²¹

E4: Άγνωστη.

Στις περισσότερες περιπτώσεις των αφυδρογονασών, το στερεοχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο, αναφερόμενο σαν “κανόνας του Prelog”. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό η αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την *re*-επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης. Το αποτέλεσμα της αναγωγής με ένα ένζυμο που υπακούει στον κανόνα του Prelog είναι ο σχηματισμός της *S* αλκοόλης (Σχήμα 12).

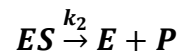
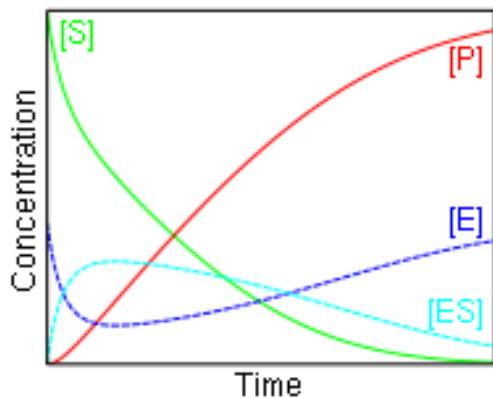
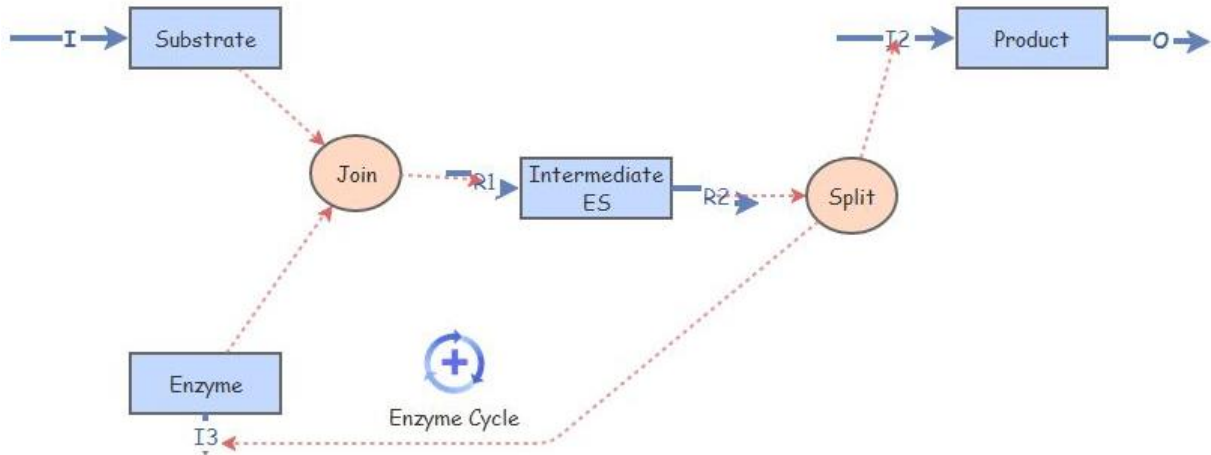


Σχήμα 12. Σχηματισμός *S* αλκοόλης σύμφωνα με τον κανόνα του Prelog

Οι πλειοψηφία των αφυδρογονασών υπακούει στον κανόνα του Prelog (Prelog ένζυμο) παράγοντας *S* αλκοόλες, ενώ ελάχιστα είναι τα ένζυμα με αντίθετη εκλεκτικότητα (*anti*-Prelog ένζυμο). Αυτό σημαίνει ότι οι περισσότερες κετορεδουκτάσες ανήκουν στην κατηγορία E3 (Σχήμα 11). Πάντως σε κάθε περίπτωση, για την πραγματοποίηση μιας ενζυμικής αντίδρασης αναγωγής, είναι απαραίτητη η ύπαρξη συνενζύμου NADH ή NADPH.

Εφόσον κάθε μόριο ενζύμου διαθέτει μόνο ένα ενεργό κέντρο, και εφόσον όλες οι κοιλότητες έχουν την ίδια διαμόρφωση, μπορούμε να πούμε ότι στην επιφάνεια κάθε ενζύμου υπάρχουν πολλές ενεργές πλευρές/κοιλότητες, ικανές να αντιδράσουν και να καταλύσουν μια αντίδραση. Σε αυτή την περίπτωση, βάσει κινητικής και μηχανισμού

Michaelis-Menten, k_1 είναι η ταχύτητα δέσμευσης και k_{-1} η ταχύτητα αποδέσμευσης του ενζύμου από το υπόστρωμα, ενώ, k_2 είναι η ταχύτητα της αντίδρασης ακολουθούμενη από την αποδέσμευση του προϊόντος από το ένζυμο (Σχήμα 13).

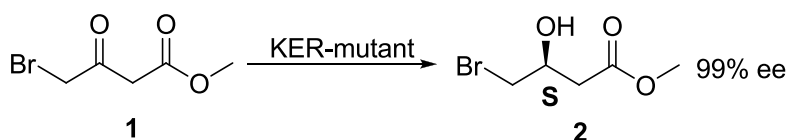


Σχήμα 13. Κινητική Michaelis-Menten

Σύμφωνα με την κινητική Michaelis-Menten, η συγκέντρωση του υποστρώματος [S] μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, εφόσον σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος [ES]. Το σύμπλοκο αυτό μόλις σχηματιστεί, αρχίζει και μετατρέπεται σε προϊόν [P] και ένζυμο σε ελεύθερη μορφή [E], ικανό να ξεκινήσει ένα νέο καταλυτικό κύκλο με ποσότητα υποστρώματος [S] που δεν συμπλοκοποιήθηκε αρχικά.

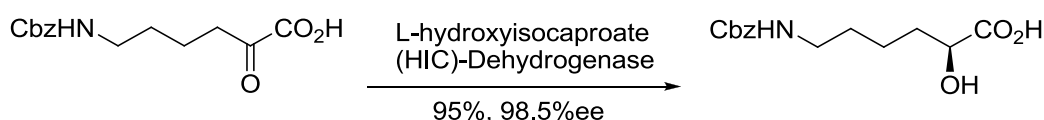
1.5 Οι κετορεδουκτάσες στην σύνθεση σημαντικών χειρόμορφων ενδιάμεσων και πρόδρομων ενώσεων για προϊόντα με φαρμακευτικό ενδιαφέρον

Οι κετορεδουκτάσες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην σύνθεση οπτικά ενεργών προϊόντων και χειρόμορφων ενδιάμεσων κυρίως υπό μορφή ολόκληρων μικροοργανισμών. Η β-αναγωγή κετο εστέρων απομονωμένη από *Penicillium citrinum*, μπορεί να μετατρέψει τον 4-βρωμο-3-οξο-βουτανοϊκό μεθυλεστέρα **1** προς τον οπτικά ενεργό (S)-4-βρωμο-3-υδροξυ-βουτανοϊκό μεθυλεστέρα **2** με 97% εναντιοεκλεκτική περίσσεια (Σχήμα 14).²² Ο συγκεκριμένος χειρόμορφος υδρόξυ εστέρας **2** συμπεριλαμβάνεται στην σύνθεση αρκετών φαρμάκων, και ένα παράδειγμα δράσης του είναι η παρεμπόδιση του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρικού συνενζύμου Α.



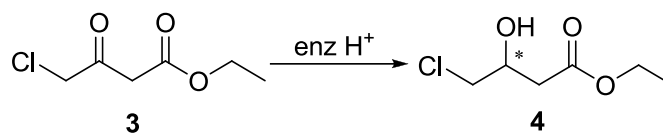
Σχήμα 14. Εναντιοεκλεκτική αναγωγή από KER-mutant

Οι κετορεδουκτάσες ανήκουν στην οικογένεια των αλκοολικών αφυδρογονασών γενικότερα, οικογένεια ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγωγή αλδευδών, κετονών και α-, β- ή ω-κετο εστέρων σχηματίζοντας την αντίστοιχη υδροξυένωση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αναγωγής με χρήση κετορεδουκτάσης παρουσιάζεται από την ερευνητική ομάδα του Szarka, για τη σύνθεση της ceranopril, μιας φαρμακευτικής ουσίας που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της υπέρτασης (Σχήμα 15).²³



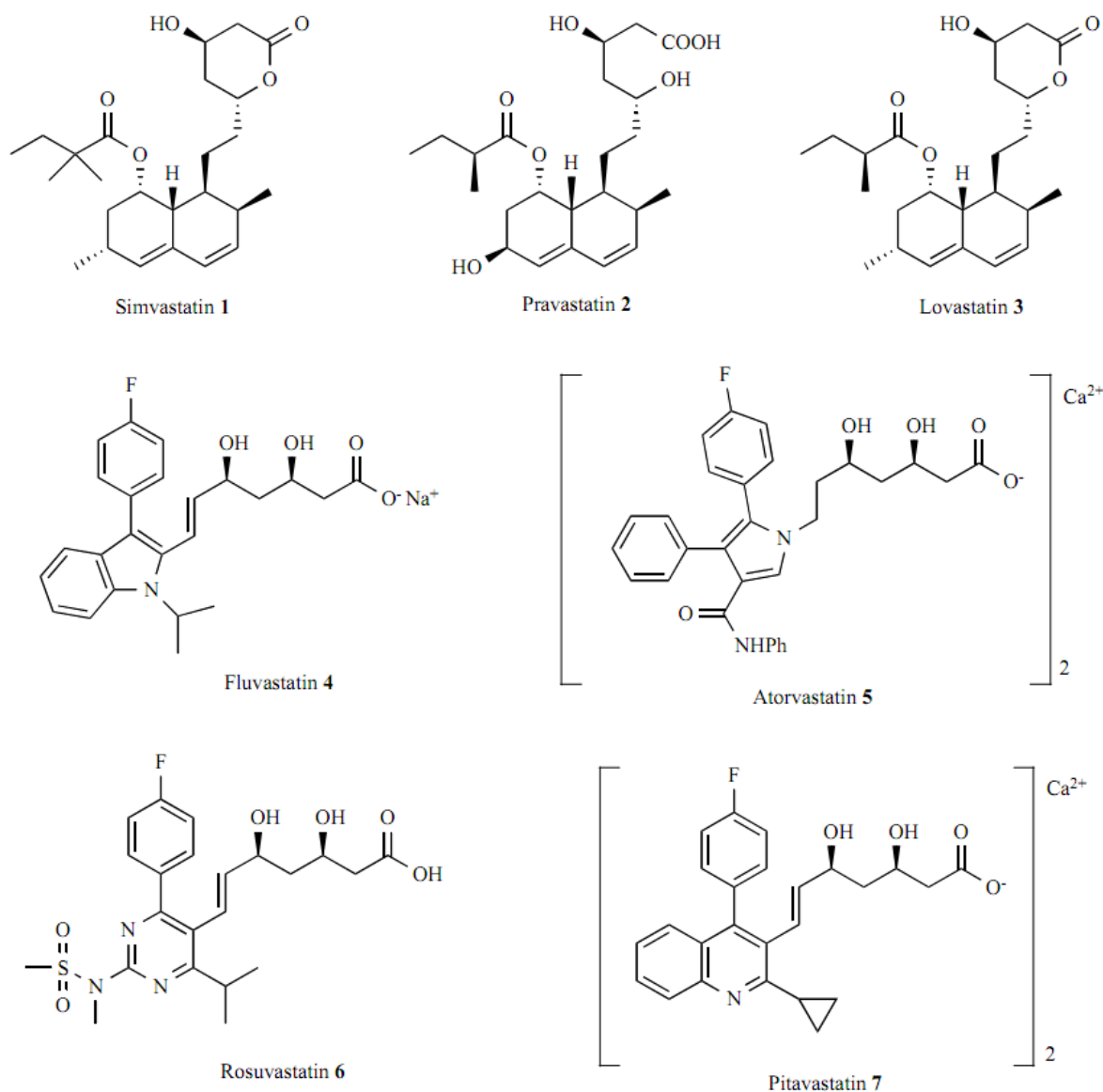
Σχήμα 15. Ενζυμική αναγωγή κετο-οξέος

Μεταξύ πολλών υποστρωμάτων των οποίων ηεναντιοεκλεκτική αναγωγή έχει πραγματοποιηθεί με χρήση κετορεδουκτάσης προς το οπτικά ενεργό υδροξυ-εστέρα **4**, είναι ο 4-χλωρο-3-οξο-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας **3**, οποίος συναντάται πολύ συχνά στην βιβλιογραφία (Σχήμα 16).



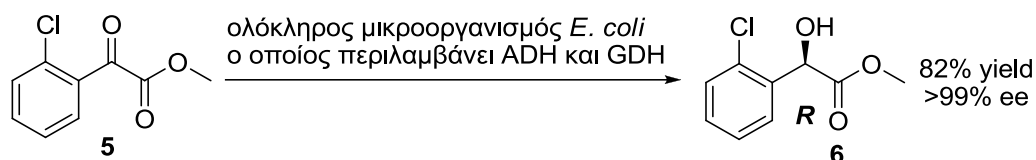
Σχήμα 16. Ενζυμική αναγωγή του χλωρο-κετο εστέρα

Η ένωση αυτή αποτελεί πρόδρομη σημαντική ένωση για την σύνθεση πλευρικών ομάδων σε μόρια στατινών (Σχήμα 17).²⁴



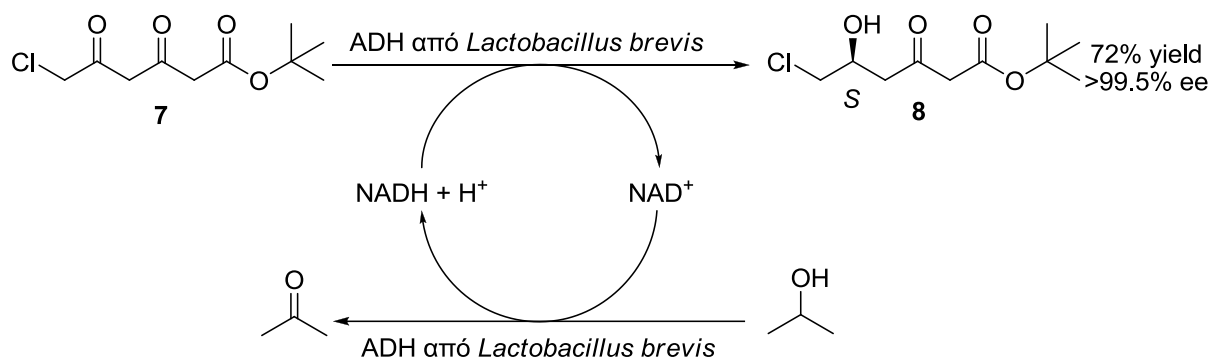
Σχήμα 17. Χημικές δομές από 7 διαφορετικές στατίνες

Η ερευνητική ομάδα των Ema και Sakai, το 2007, παρουσίασε την βιοκαταλυτική αναγωγή του α-οξο-κετο εστέρα **5** προς την σύνθεση του (*R*)-*o*-chloromandelate **6**, ένωση που αποτελεί ενδιάμεσο για τη σύνθεση του φαρμάκου clopidogrel. Η αναγωγή είχε 82% απόδοση και >99% εναντιοεκλεκτική περίσσεια (Σχήμα 18).²⁵



Σχήμα 18. Ενζυμική αναγωγή κετο εστέρα με μικροοργανισμό που περιέχει ένζυμο και ανακυκλωτικό ένζυμο.

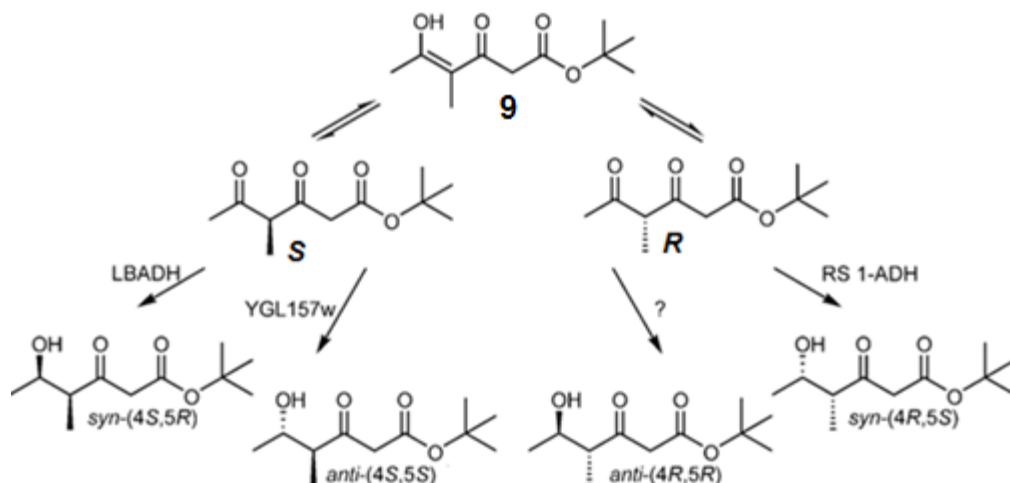
Η ομάδα του Müller με την χρήση αλκοολικής αφυδρογονάσης από τον μικροοργανισμό *Lactobacillus brevis* πραγματοποίησε την τοπο- και εναντιοεκλεκτική αναγωγή του 6-χλωρο-3,5-διοξο-εξανοϊκού εστέρα **7** με χρήση ισοπροπανόλης σαν ανακυκλωτικό σύστημα. Ο 3,5-δικετο εστέρας μετατράπηκε στον (*S*)-6-χλωρο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανικό εστέρα **8** με απόδοση 72% και >99.5% εναντιοεκλεκτική περίσσεια (Σχήμα 19). Ο οπτικά ενεργός εστέρας αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο για την σύνθεση του αναστολέα HMG-CoA αναγωγής.²⁶



Σχήμα 19. Ενζυμική αναγωγή του χλωρο-δικετο εστέρα με αλκοολική αφυδρογονάση απομονωμένη από *Lactobacillus brevis*

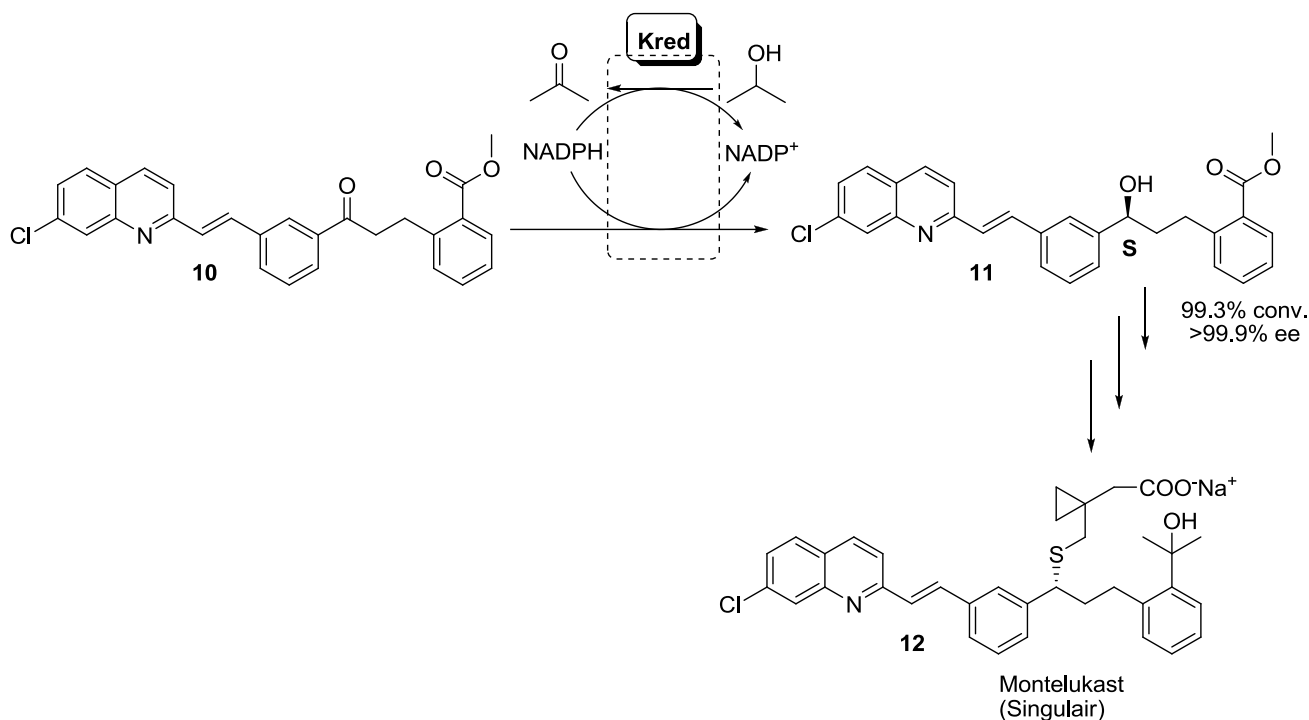
Η ίδια ερευνητική ομάδα έχει πραγματοποιήσει την αναγωγή των 4-υποκατεστημένων 3,5-διοξο εστέρων **9**. Η τοπο- και εναντιοεκλεκτική αναγωγή μέσω Δυναμικού Κινητικού Διαχωρισμού (DKR) και παρουσία αλκοολικών αφυδρογονασών από διάφορους μικροοργανισμούς, *Lactobacillus brevis*, *Rhodococcus erythropolis* και *Saccharomyces cerevisiae*, οδηγεί στην σχηματισμό των αντίστοιχων *syn*-(4*S*,5*R*), *syn*-(4*R*,5*S*) και *anti*-(4*S*,5*S*) διαστερεομερών, με υψηλή εναντιοεκλεκτική και διαστερεοεκλεκτική περίσσεια (Σχήμα 20).²⁷ Οι ενώσεις αυτές αποτελούν δομικές μονάδες σε πολυκετιδικά ανάλογα και φυσικά προϊόντα που προέρχονται από

πολυκετιδικές δομές. Τα πολυκετίδια είναι δευτεροταγείς μεταβολίτες και υψηλής βιολογικής δραστηριότητας ενώσεις.



Σχήμα 20. Σχηματισμός 3 από τα 4 πιθανά διαστερομερή με χρήση αλκοολικών αφυδρογονασών από διάφορους μικροοργανισμούς

Απομονωμένη κετορεδουκτάση της εταιρίας Codexis χρησιμοποιείται βιομηχανικά για την σύνθεση του χειρόμορφου ενδιάμεσου κλειδί **11** για την σύνθεση του Montelukast **12**. Το Montelukast αποτελεί το ενεργό φαρμακευτικό συστατικό (API: Active Pharmaceutical Ingredient) του φαρμάκου Singulair της εταιρίας Merck για τη θεραπεία του άσθματος, με περισσότερες από 7 δισεκατομμύρια δολάρια πωλήσεις ετησίως. Η βιομηχανική συνθετική πορεία από την εταιρία Codexis περιλαμβάνει την ασύμμετρη αναγωγή της κετόνης **10** με τον σχηματισμό ενός σημαντικού ενδιάμεσου (*S*), με υψηλή μετατροπή 99.3% και εναντιομερική περίσσεια >99.9% (Σχήμα 21).²⁸

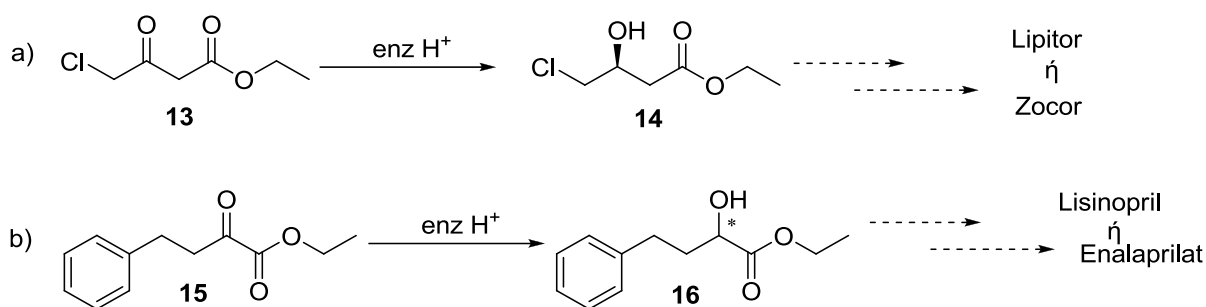


Σχήμα 21. Σύνθεση φαρμάκου Singular με χρήση κετορεδουκτάσης στο σημαντικό ενδιάμεσο **11**

Η στερεοεκλεκτική αναγωγή κετονών προς το σχηματισμό χειρόμορφων αλκοολών είναι από τις χρησιμότερες αντιδράσεις στην οργανική σύνθεση. Οι χειρόμορφες αλκοόλες βρίσκονται σε πληθώρα φαρμακευτικών και υψηλής προστιθέμενης αξίας ενώσεων, που χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα σε χειρόμορφες συνθέσεις πολλαπλών βημάτων. Επομένως, είναι αυτονόητο ότι πολλοί συνθετικοί οργανικοί χημικοί έχουν αφιερώσει χρόνο και κόπο για την εύρεση της κατάλληλης χημικής μεθόδου αναγωγής των κετονών προς την σύνθεση χειρόμορφων αλκοολών με υψηλή εναντιομερική περίσσεια και καθαρότητα. Οι κετορεδουκτάσες παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, έναντι άλλων ενζύμων, ως βιοκαταλύτες, στην αναγωγή κετονών. Μεγάλη ανάκαμψη έχει πραγματοποιηθεί στην ανάπτυξη ενζύμων, με αποτέλεσμα να έχει αυξηθεί το πλήθος των διαθέσιμων κετορεδουκτασών και των ανακυκλωτικών συστημάτων για την αναγέννηση του συνενζύμου. Σε αντιδράσεις όπου χρησιμοποιούνται κετορεδουκτάσες, δεν απαιτούνται ιδιαίτερα εξεζητημένες συνθήκες, αλλά συνήθως 20-45°C και ατμοσφαιρική πίεση. Τα απόβλητα είναι λιγοστά, εφόσον τα

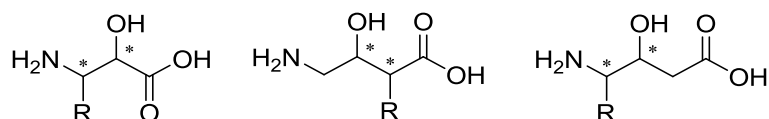
ένζυμα αυτά είναι πλήρως βιοδιασπώμενα, και οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε υδατικό διάλυμα. Υψηλά ποσοστά απόδοσης και οπτικής καθαρότητας επιτυγχάνονται συχνά, με αποτέλεσμα να καθιστούν τις κετορεδουκτάσες πολύ διαδεδομένες ως καταλύτες, στην σύνθεση είτε (*R*) είτε (*S*) αλκοολών, ξεκινώντας από καρβονυλικά υποστρώματα. Το κόστος των κετορεδουκτασών είναι χαμηλό συγκριτικά με άλλους χειρόμορφους καταλύτες. Οι κετορεδουκτάσες παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από μικροβιακές ζυμώσεις. Έτσι, οι ενζυμικές αναγωγές κετονών είναι πολύ σημαντικό εργαλείο στα χέρια των χημικών, συμπληρώνοντας και επεκτείνοντας την στερεοεκλεκτική χημική αναγωγή.

Στάδιο κλειδί σε μια ενζυμικά καταλυόμενη πορεία σύνθεσης μιας χειρόμορφης αλκοόλης είναι η εύρεση του κατάλληλου ενζύμου. Πολλές εργασίες έχουν δημοσιευτεί για τη χρήση ολόκληρων μικροοργανισμών, αλλά η χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών είναι πιο συνήθης και πιο εύχρηστη προσέγγιση για τους χημικούς. Σε αντίθεση με τα συστήματα που χρησιμοποιούνται ολόκληροι μικροοργανισμοί, οι οποίοι απαιτούν καλλιέργειες κυττάρων, οι απομονωμένες κετορεδουκτάσες μπορούν να προστεθούν απευθείας στην αντίδραση χωρίς να χρειάζεται ιδιαίτερος εξοπλισμός. Η ταχύτητα και η καθαρότητα της αντίδρασης είναι ένα ακόμα πλεονέκτημα. Τα ένζυμα που αποτελούν συστατικό ολόκληρων μικροοργανισμών μπορούν να πραγματοποιήσουν και παράπλευρες αντιδράσεις, ενώ σε απομονωμένη μορφή οι κετορεδουκτάσες μετατρέπουν μεγάλη ποσότητα υποστρώματος γρήγορα σε καταλυτική ποσότητα, χωρίς άλλες παράπλευρες/ανταγωνιστικές αντιδράσεις. Πολλές κετόνες με αυξημένο βιομηχανικό ενδιαφέρον, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για πολλά και σημαντικά μόρια.²⁹ Η αναγωγή του 3-χλωρο-2-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα **13**, σε (*S*)-3-χλωρο-2-υδροξυβουτανοϊκό αιθυλεστέρα **14**, αποτελεί το στάδιο κλειδί για την σύνθεση του Lipitor και του Zocor, φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την μείωση της χοληστερίνης (Σχήμα 22a).



Σχήμα 22. Αναγωγή α) χλωρο-κετο εστέρα και β) 4-φαινυλο-2-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα προς το σχηματισμό πολύτιμων οπτικά ενεργών αλκοολών

Η αναγωγή του 4-φαινυλο-2-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα **15**, προς 4-φαινυλο-2-υδροξυβουτανοϊκού αιθυλεστέρα **16**, οδηγεί στην σύνθεση των φαρμάκων κατά της υπέρτασης, Lisinopril και Enalaprilat (Σχήμα 22b). Άρυλο υποκατεστημένες αλκοόλες χρησιμοποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών, όπως αυτές που φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα (Σχήμα 23), οι οποίες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για στατίνες και φαρμακευτικά σκευάσματα, τα οποία είναι αντι-νεοπλασματικά, αντιβακτηριακά είτε αντικαρκινικά φάρμακα.²⁹ Ανάλογα παράγωγα της αλκοόλης που προέρχεται από την ενζυμική αναγωγή της α-τετραλόνης, χρησιμοποιούνται για την σύνθεση των ανταγωνιστών της σεροτονίνης 5-HT7 για την καταπολέμηση της σχιζοφρένειας, και για τη σύνθεση αναστολέων της β-σεκρετάσης για την θεραπεία της νόσου Alzheimer.³⁰



Σχήμα 23. Άρυλο υποκατεστημένες αλκοόλες.

1.6 Συμπαράγοντες

Μια επιτυχημένη ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση απαιτεί συχνά την παρουσία συμπαράγοντων. Οι συμπαράγοντες είναι ενώσεις, με σχετικά μικρότερο μοριακό βάρος σε σχέση με το ένζυμο, οι οποίοι είτε ελευθερώνουν στην αντίδραση ισοδύναμα – οξυγόνου, υδρογόνου ή και ηλεκτρονίων - για να πραγματοποιηθεί μία οξείδωση ή μία

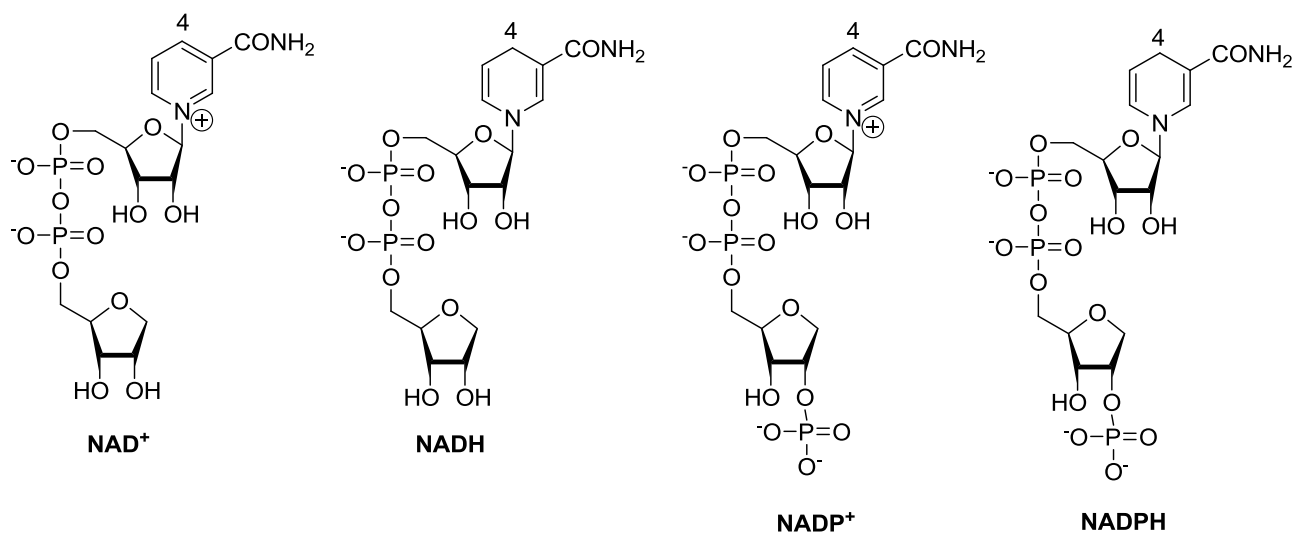
αναγωγή, είτε αποθηκεύουν ενέργεια σε ενεργειακά πλούσιες ομάδες (ανυδρίτες οξέων). Έτσι τα ένζυμα είναι αδρανή χωρίς την παρουσία των συμπαραγόντων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συμπαραγόντες και το είδος της αντίδρασης που χρησιμοποιούνται.^{4,10}

Συμπαραγόντας	Τύπος Αντίδρασης	Ανακυκλωτικό Σύστημα
NAD ⁺ /NADH	προσθήκη ή αφαίρεση H ή e ⁻	+
NADP ⁺ /NADPH	προσθήκη ή αφαίρεση H	+
ATP	Φωσφορυλίωση	+
SAM	C1-αλκυλίωση	+
Acetyl-Coa	C2-αλκυλίωση	+
Flavins	Οξυγόνωση	-
Pyridoxal-phosphate	Τρανσαμίνωση	-
Biotin	Καρβοξυλίωση	-
Metal-porphyrin complexes	Υπεροξειδωση, οξυγόνωση	-

Υπάρχει πληθώρα συμπαραγόντων ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που πρόκειται να πραγματοποιηθεί. Όπως παρατηρούμε, αρκετοί συμπαραγόντες απαιτούν ανακυκλωτικό σύστημα και κάποιοι άλλοι όχι. Πιο αναλυτικά, οι NAD(P)H και ATP συνήθως είναι ευαίσθητοι και καταστρέφονται κατά την διάρκεια της αντίδρασης λόγω παράπλευρων μη επιθυμητών αντιδράσεων, οπότε, λόγω κόστους, χρησιμοποιούνται σε καταλυτικές ποσότητες και απαιτούν ένα ανακυκλωτικό σύστημα για την αναγέννηση τους *in situ*.

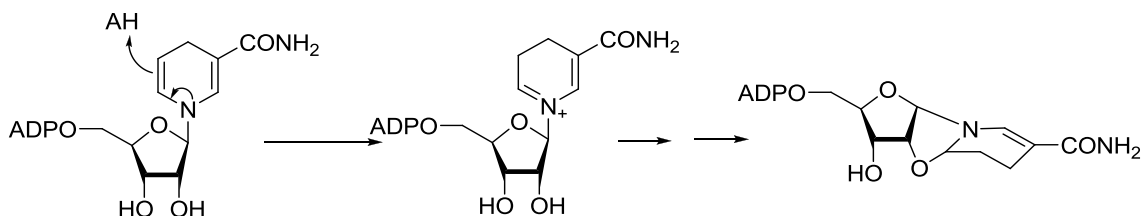
Το νικοτιναμιδο αδενο δινουκλεοτίδιο (NAD⁺) και το 2'-φωσφορυλιωμένο άλας (NADP⁺) (Σχήμα 24) συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από αφυδρογονάσες. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος των ενώσεων αυτών είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, μπορώντας να δεχτεί ένα υδρίδιο (ή δυο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο) για το σχηματισμό των υδρογονωμένων παραγώγων NADH και NADPH. Η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο NAD(P)⁺, και αυτή από το NAD(P)H σε ένα οξειδωτικό, είναι στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο. Κάθε ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από τα

διαστερεοτοπικά υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση C-4 του NAD(P)H σε μια καρβονυλομάδα ενός υποστρώματος.³¹



Σχήμα 24. Νικοτιναμίδιο αδενινο δινουκλεοτίδιο και 2'-φωσφορυλιωμένο άλας

Η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή των νικοτιναμιδιακών συμπαραγόντων είναι και οι δυο αποικοδομίσιμες σε υδατικά διαλύματα. Γενικά οι ανηγμένες μορφές είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, σε αντίθεση με τις οξειδωμένες μορφές που είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα και ασταθείς σε βασικά.³² Γι' αυτό οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7, σε μια ενδιάμεση δηλαδή τιμή σταθερότητας. Η αποικοδόμηση του NAD(P)H σε pH 5-9 κυρίως οφείλεται σε όξινη κατάλυση (Σχήμα 25).^{32,33}



Σχήμα 25. Αποικοδόμηση NADPH

Σε αυτή την περίπτωση, πραγματοποιείται πρωτονίωση του νικοτιναμιδιακού δακτυλίου στον άνθρακα-5, ακολουθούμενη από γρήγορη μετάθεση σχηματίζοντας κυκλικό αιθέρα.³³ Στην περίπτωση του NADPH πραγματοποιείται μια επιπλέον ενδομοριακή κυκλοποίηση στη θέση της 2-φωσφορικής ομάδας.³² Έτσι σε ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής των συνενζύμων είναι περιορισμένοι. Οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M φωσφορικό νάτριο, σε pH 7.0, 25 °C είναι 27 και 13 ώρες αντίστοιχα. Σε οργανικά όμως ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής αυξάνονται αρκετά. Τέτοια διαλύματα είναι imidazole, triethanolamine, Hepes και Tris. Έτσι οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M Tris σε pH 7.0 και 25 °C είναι 330 και 31 ώρες αντίστοιχα.

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

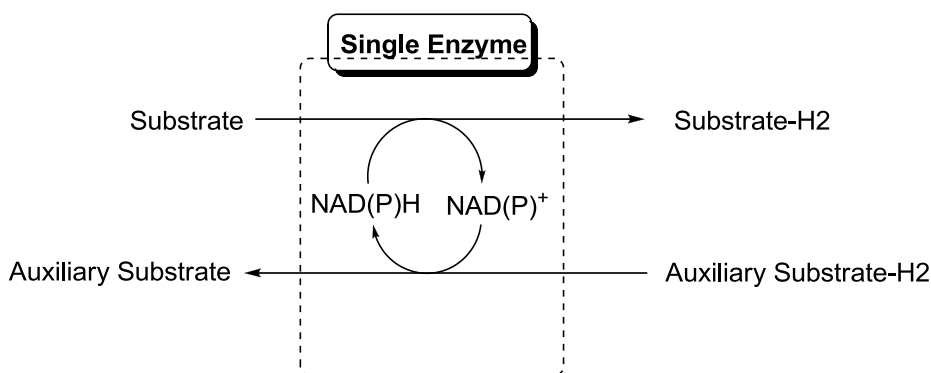
Τα συνένζυμα είναι ενώσεις εμπορικά διαθέσιμες εδώ και πολλά χρόνια. Παρόλα αυτά το κόστος τους είναι αρκετά υψηλό και για αυτό το λόγο απαιτούνται τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού. Ένας τέτοιος τρόπος είναι τα συστήματα αναγέννησης των συνενζύμων.

1.6.1 Συστήματα αναγέννησης των νικοτιναμιδικών συνενζύμων

Έχουν αναφερθεί πολλά συστήματα ανακύκλωσης των νικοτιναμιδικών συνενζύμων στην βιβλιογραφία, όπως το θειοθειικό νάτριο, ηλεκτροχημικοί και φωτοχημικοί μέθοδοι, αλλά όλα αυτά επιδεικνύουν χαμηλή τοποεκλεκτικότητα, και πραγματοποιούν πλευρικές αντιδράσεις. Τα τελευταία χρόνια, για την αναγέννηση του NAD(P)H υπάρχουν δύο σημαντικές κατηγορίες ανακυκλωτικών συστημάτων, πιο

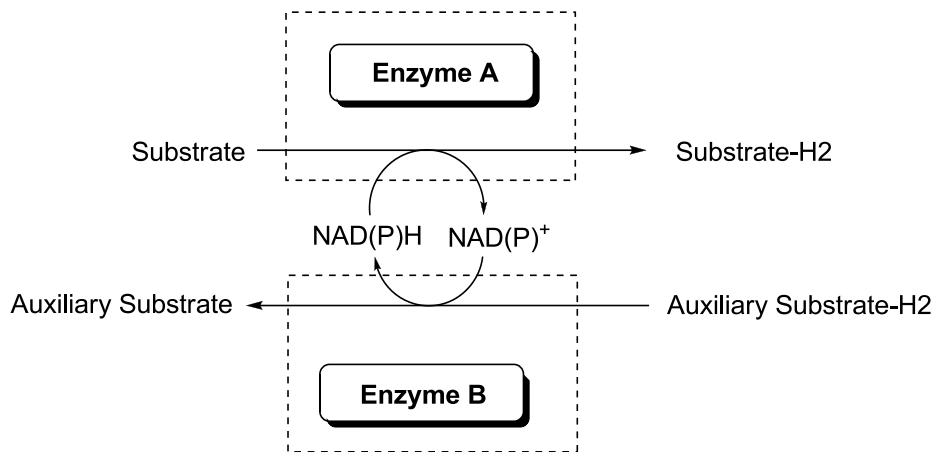
αποτελεσματικές και πιο εύκολες στην εφαρμογή. Συγκεκριμένα, το σύστημα όπου χρησιμοποιούνται δύο υποστρώματα με ένα ένζυμο και αυτό όπου χρησιμοποιούνται δύο ένζυμα με δύο υποστρώματα.¹⁰

Στην πρώτη περίπτωση, όπου χρησιμοποιούνται δύο υποστρώματα με ένα ένζυμο, η μετατροπή του πρώτου υποστρώματος πραγματοποιείται συνεχώς εφόσον το δεύτερο υπόστρωμα, που δρα ως δότης, μετατρέπεται εξίσου από το ίδιο ένζυμο, πραγματοποιώντας την αντιθετη αντίδραση (Σχήμα 26). Για να μετατοπιστεί η ισορροπία της αντίδρασης προς το επιθυμητό προϊόν, το δεύτερο υπόστρωμα πρέπει να βρίσκεται σε περίσσεια σε σχέση με το βασικό υπόστρωμα, με σκοπό να αναγεννάται συνεχώς ο συμπαράγοντας. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική.



Σχήμα 26. Ανακυκλωτικό σύστημα NAD(P)H με χρήση ενός μόνο ενζύμου

Η δεύτερη περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά ένζυμα σε μία αντίδραση, ένα για την μετατροπή του υποστρώματος και ένα για την αναγέννηση του συμπαράγοντα, θεωρείται πιο απαιτητική μέθοδος (Σχήμα 27). Στην ουσία, πραγματοποιούνται δύο παράλληλες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Για καλύτερα αποτελέσματα πρέπει τα ένζυμα να παρουσιάζουν συγκεκριμένη δραστηριότητα στα αντίστοιχα υποστρώματα, ώστε οι δυο ενζυμικές αντιδράσεις να πραγματοποιούνται ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Συνεπώς, τα υποστρώματα δεν πρέπει να δρουν ανταγωνιστικά προς τις ενεργές πλευρές των ενζύμων.

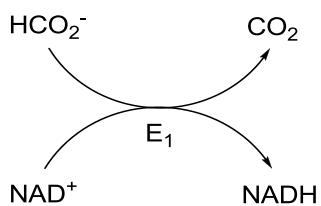


Σχήμα 27. Ανακυκλωτικό σύστημα με χρήση δύο διαφορετικών ενζύμων για κάθε υπόστρωμα

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

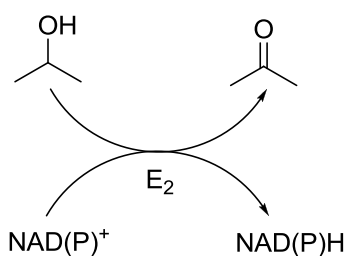
Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση του NADH και NADPH. Τα πιο χρήσιμα συστήματα αναγέννησης είναι:

1. Άλας του μυρμηκικού οξέος/αφυδρογονάση του μυρμηκικού (E₁) από *Candida boidinii* (Σχήμα 28),³⁴



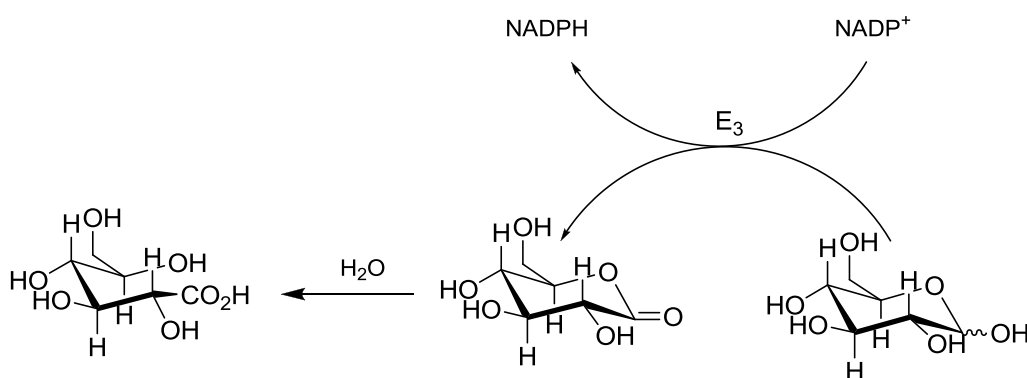
Σχήμα 28

2. Ισοπροπανόλη/αλκοολική αφυδρογονάση (E_2) από *Thermoanaerobium Brockii* (για NADP),³⁵ ή *Pseudomonas* sp (για NAD)¹⁸ (Σχήμα 29)



Σχήμα 29

3. Γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης (E_3) από *Bacillus*³⁶ (για NAD(P)H) (Σχήμα 30).



Σχήμα 30

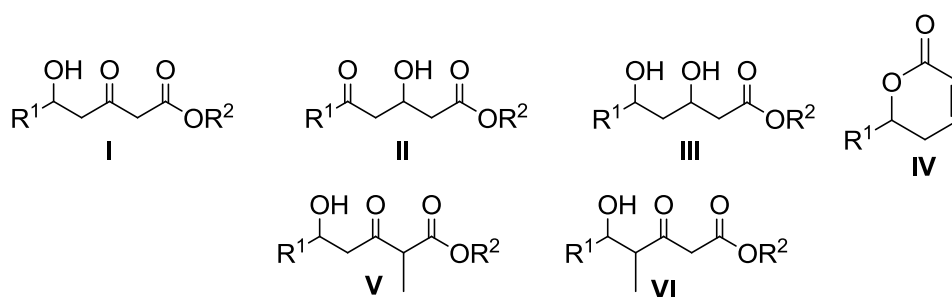
Α' ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Στόχος της ερευνητικής εργασίας

Ο βασικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής στα πλαίσια του προγράμματος «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II» είναι η σύνθεση χρήσιμων, οπτικώς ενεργών ενδιαμέσων και πρόδρομων ενώσεων για πλήθος φυσικών προϊόντων και φαρμακευτικών συστατικών με βιοκαταλυτικές μεθόδους.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ολοκληρώθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές β,δ-δικετοεστέρων με πιθανά προϊόντα αναγωγής δ-υδροξυ-β-κετο εστέρες **I**, β-υδροξυ-δ-κετο εστέρες **II**, β,δ-διυδροξυ εστέρες **III** και δ-λακτόνες **IV** (Σχήμα 31) και πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές α-υποκατεστημένων-β,δ-δικετοεστέρων και γ-υποκατεστημένων-β,δ-δικετοεστέρων. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν σημαντικά πρόδρομα μόρια στην οργανική σύνθεση καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση διαφόρων φυσικών προϊόντων και φαρμάκων.

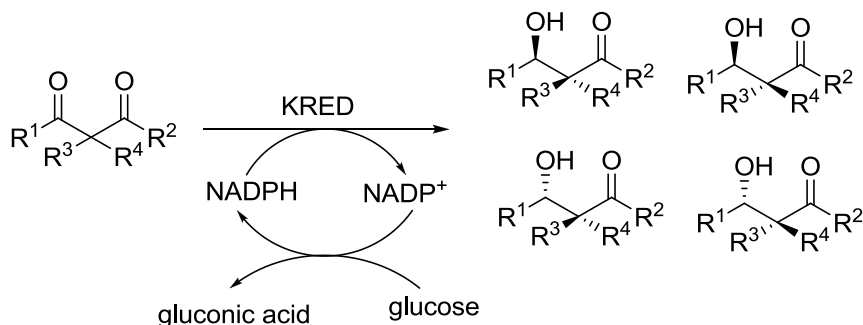
Οι βιοκαταλύτες που επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό, είναι τα αναγωγικά ένζυμα, NAD(P)H εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες (KRED), οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες. Η επιλογή τους στηρίχθηκε στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που συγκεντρώνουν, όπως υψηλή καταλυτική ικανότητα, στερεοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα, χημειοεκλεκτικότητα, καθώς και στην ικανότητά τους να δέχονται ως υποστρώματα μεγάλο αριθμό μορίων με διαφορετικά στερεοχημικά χαρακτηριστικά, όπως δικετόνες, υδροξυ κετόνες και β-κετοεστέρες.



Σχήμα 31. Γενική δομή των δ-υδροξυ-β-κετο εστέρων **I**, β-υδροξυ-δ-κετο εστέρων **II**, β,δ-διυδροξυ εστέρων **III**, δ-λακτονών **IV**, α-υποκατεστημένων δ-υδροξυ-β-κετο εστέρων **V** και γ-υποκατεστημένων δ-υδροξυ-β-κετο εστέρων **VI**

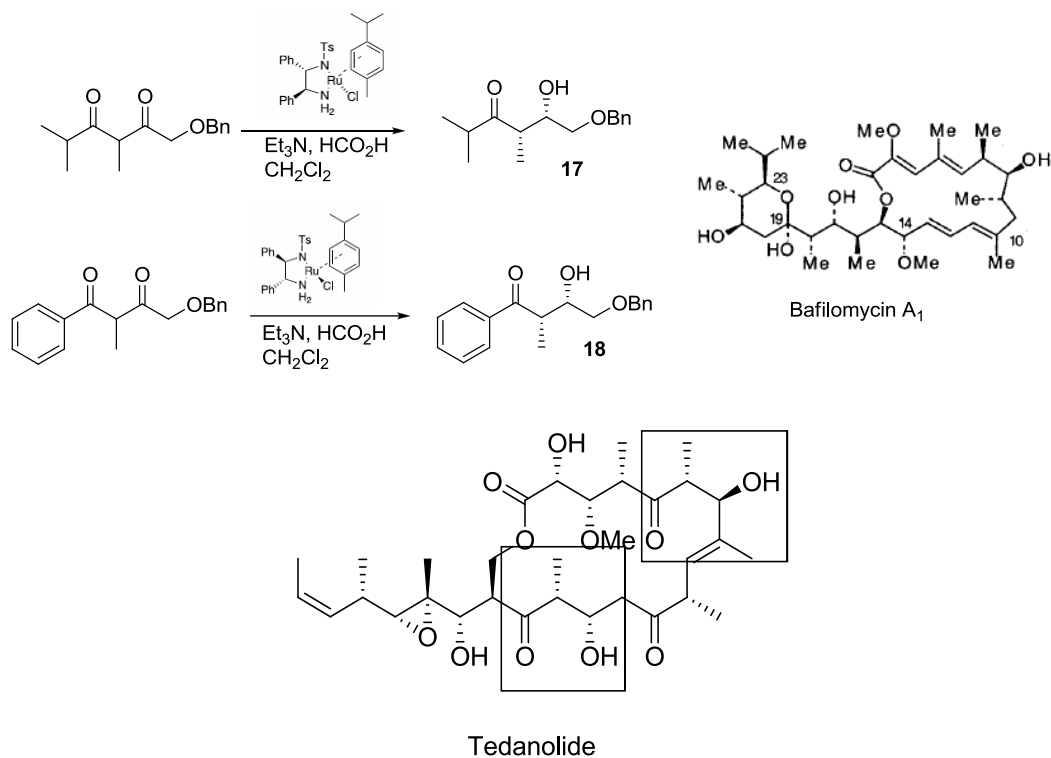
2.1 Σύνθεση χειρόμορφων ενδιάμεσων με χρήση κετορεδουκτασών

Η ερευνητική ομάδα Βιοκατάλυσης διαθέτει τεχνογνωσία και εμπειρία στην σύνθεση χειρόμορφων μορίων με χρήση κετορεδουκτασών. Το 2005, η ομάδα του εργαστηρίου πραγματοποίησε βιοαναγωγές α-υποκατεστημένων-1,3-δικετονών και α-υποκατεστημένων-β-κετο εστέρων με χρήση NADPH εξαρτώμενων, απομονωμένων κετορεδουκτασών (Σχήμα 32).³⁷ Δοκιμάστηκαν οι βιοκαταλυτικές αναγωγές α-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών και κετο-εστέρων με 20 διαφορετικές κετορεδουκτάσες προς τον σχηματισμό αντίστοιχων οπτικά ενεργών υδροξυ κετονών και υδροξυεστέρων. Με την μεθοδολογία η οποία αναπτύχθηκε αποδείχθηκε ότι οι KRED είναι εξαιρετικοί καταλύτες για την σύνθεση οπτικά ενεργών α-υποκατεστημένων υδροξυ κετονών και υδροξυ εστέρων με υψηλή οπτική καθαρότητα (>99% ee και >99% de) και χημική απόδοση (99%). Το σημαντικότερο όμως αποτέλεσμα είναι ότι με την μεθοδολογία αυτή είναι δυνατή η σύνθεση διαφορετικών στερεοϊσομερών της ίδιας ένωσης κατά βούληση, ανάλογα με την επιλογή κατάλληλου ενζύμου. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρασκευάστηκαν τα 3 από τα 4 δυνατά στερεοϊσομερή.



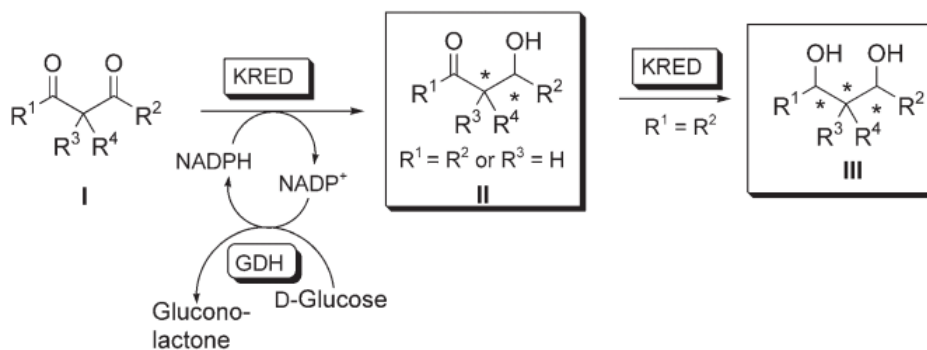
Σχήμα 32. Ενζυμική αναγωγή α-μονο- ή δι-υποκατεστημένων-1,3-δικετονών και β-κετο εστέρων

Οι α-υποκατεστημένες-β-υδροξυ-κετόνες και εστέρες αποτελούν δομικές μονάδες σε πολυκετίδια, στατίνες, αναστολείς πρωτεάσης και πολλά φαρμακευτικά προϊόντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση του νέου αντιβακτηριακού και αντιμυκητιακού φαρμάκου BafilomycinA₁, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι δυο α-μεθυλο-β-υδροξυ κετόνες **17** και **18**,³⁸ καθώς και το αντικαρκινικό tedanolide,³⁹ τμήμα του οποίου αποτελείται από υδροξυ-κετόνες (Σχήμα 33).



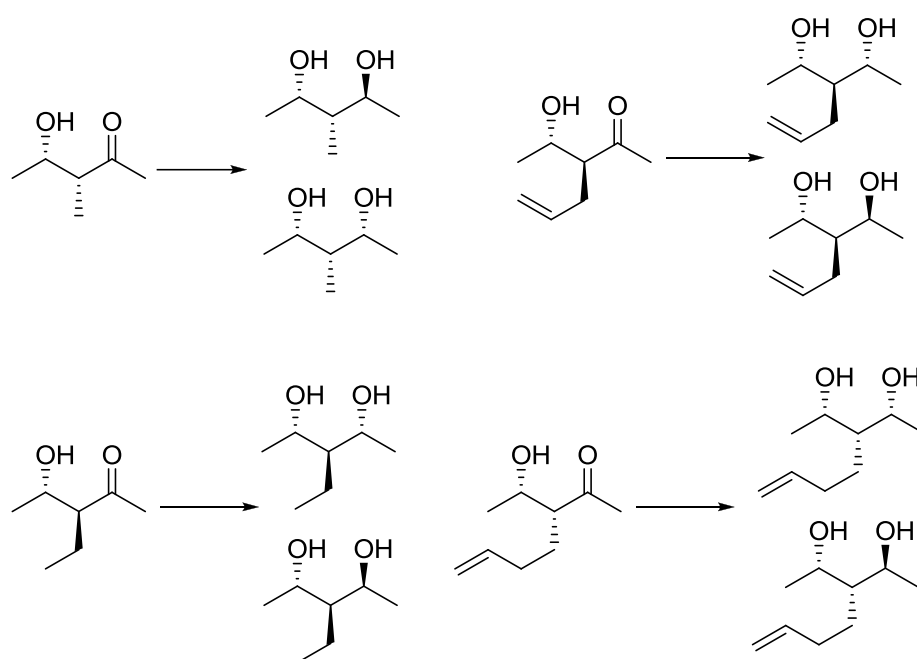
Σχήμα 33. Δομές φαρμάκου bafilomycin A_1 και αντικαρκινιού φαρμάκου tedanolide

Το 2006 παρουσιάστηκαν επίσης εκτενώς οιστεροεκλεκτικές βιοαναγωγές στην σύνθεση α -υποκατεστημένων- β -υδροξυ κετονών και 1,3-διολών (Σχήμα 34).⁴⁰ Με την χρήση κετορεδουκτασών πραγματοποιήθηκε η τοπο- και στερεοεκλεκτική αναγωγή σειράς α -υποκατεστημένων-1,3-δικετονών με υψηλή οπτική και χημική καθαρότητα. Στις περισσότερες περιπτώσεις συντέθηκαν όλα τα πιθανά διαστερομερή. Οι 1,3-διόλες είναι πολύ σημαντικές, αφού αποτελούν σημαντικό μέρος φυσικών προϊόντων όπως τα Macrolides.^{41,42}



Σχήμα 34. Ενζυμική αναγωγή α -υποκατεστημένων- β -υδροξυ κετονών και διαδοχική αναγωγή τους προς 1,3-διόλες

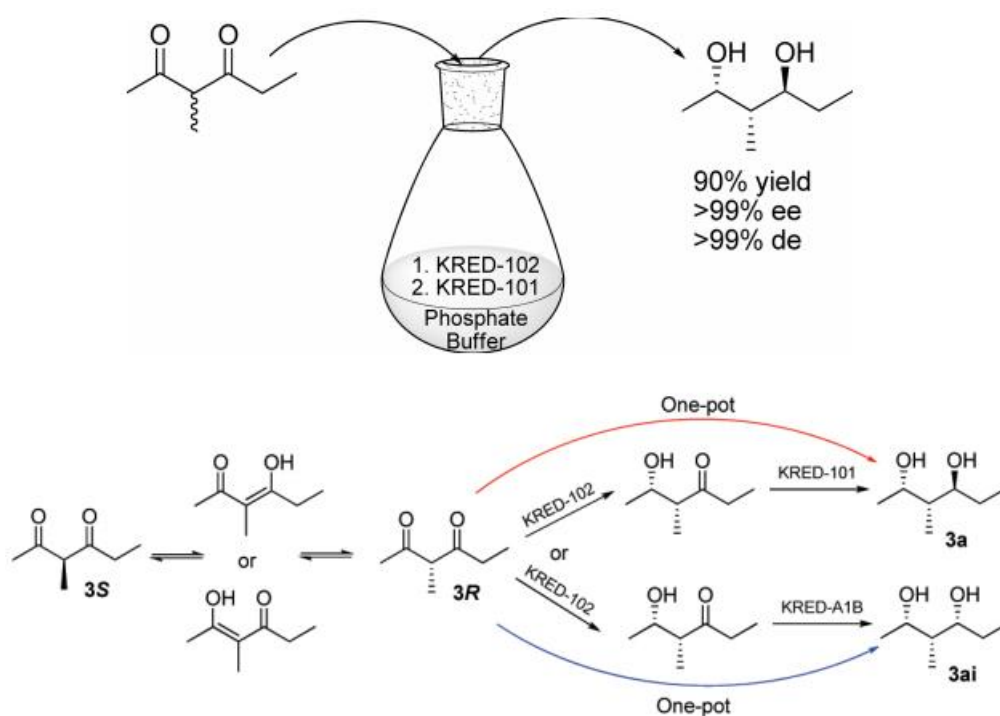
Το 2010 επιτεύχθηκε ακόμη η ενζυμική αναγωγή 2-μονο- και δι-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών με το ίδιο ενζυμικά καταλυόμενο αναγωγικό σύστημα, προς τον σχηματισμό μονο- και δι-υποκατεστημένων διολών (Σχήμα 35).⁴³ Η σύνθεση 1,3-διολών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από διαδοχικές ενζυμικές αναγωγές 1,3-δικετονών, είτε από ενζυμική αναγωγή οπτικά καθαρών β-υδροξυ-κετονών. Τα υποστρώματα αυτής της εργασίας ήταν εννέα α-υποκατεστημένες β-υδροξυ-κετόνες, δύο α-διυποκατεστημένες β-υδροξυ-κετόνες και μία 2-μονουποκατεστημένη προστατευμένη υδροξυ-κετονη και δοκιμάστηκαν τριάντα δύο διαφορετικές κετορεδουκτάσες. Στο παρακάτω Σχήμα φαίνονται μερικά χαρακτηριστικά αποτελέσματα αυτών των αναγωγών.



Σχήμα 35. Ενζυμική αναγωγή οπτικά ενεργών α-αλκυλο-β-υδροξυ κετονών προς το σχηματισμό οπτικά ενεργών α-αλκυλο-1,3-διολών

Όλα τα προϊόντα που προέκυψαν εμφανίζουν υψηλή οπτική και χημική καθαρότητα, επιτυγχάνοντας παράλληλα την σύνθεση των *syn* και *anti* διολών, υποστρώματα πολύ σημαντικά αφού αποτελούν δομικές μονάδες φυσικών προϊόντων καθώς και πρόδρομες ενώσεις στην σύνθεση φαρμάκων και φυσικών προϊόντων με υψηλή βιολογική δραστηριότητα.

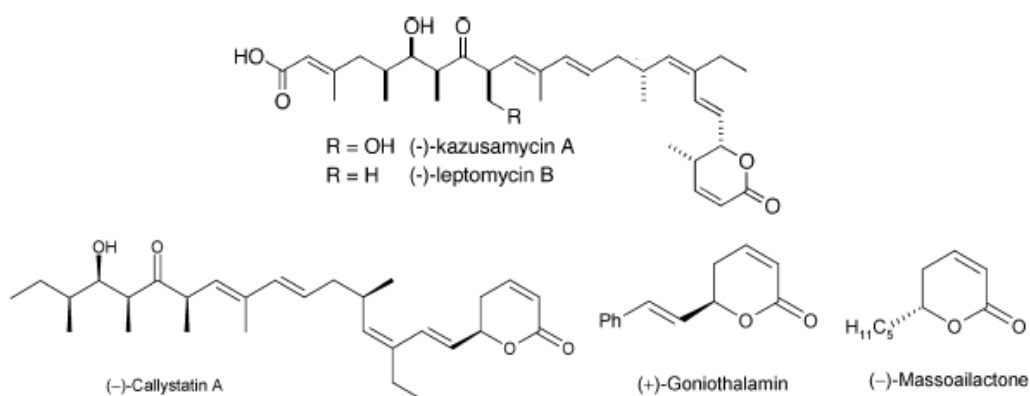
Την ίδια χρονιά, παρουσιάστηκε η εξέλιξη της παραπάνω μεθοδολογίας σύνθεσης των 1,3-διολών με την χρήση δύο κατάλληλων κετορεδουκτασών, σε ένα βήμα, στην ίδια φιάλη (one-pot).⁴⁴ Πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι αποφεύγεται με αυτόν τον τρόπο η απομόνωση της ενδιάμεσης οπτικά ενεργής υδροξυ κετόνης, μειώνοντας έτσι τον χρόνο και τον κόπο για μια τέτοια σύνθεση. Η προσθήκη των ενζύμων γίνεται διαδοχικά, επιτρέποντας στο πρώτο ένζυμο να δράσει και να παράγει την οπτικά ενεργή υδροξυ-κετόνη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε διόλη, με την προσθήκη του δεύτερου ενζύμου (Σχήμα 36). Στην συγκεκριμένη μεθοδολογία επιτυγχάνεται η σύνθεση οπτικά ενεργών α-υποκατεστημενων-1,3-διολών με υψηλή εναντιοεκλεκτική και διαστερεοεκλεκτική περίσσεια, χωρίς την απομόνωση της ενδιάμεσης υδροξυ-κετόνης, πραγματοποιώντας δύο διαδοχικές αναγωγικές αντιδράσεις.



Σχήμα 36. “Onepot” ενζυμική αναγωγή 2-αλκυλο-1,3-δικετονών προς το σχηματισμό οπτικά ενεργών 2-αλκυλο-1,3-διολών

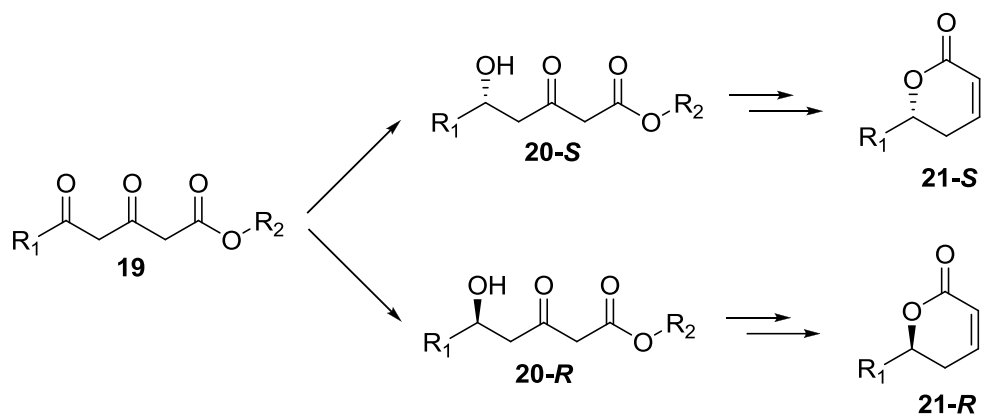
2.2 Βιοκαταλυτικές αναγωγές α-υποκατεστημένων ή γ-υποκατεστημένων β,δ-δικετοεστέρων

Οι οπτικώς ενεργοί δ-υδροξυ-β-κετοεστέρες και οι β,δ-διυδροξυ εστέρες είναι πολύτιμες ενώσεις καθώς μπορούν να μετατραπούν εύκολα στις αντίστοιχες α,β-ακόρεστες-δ-λακτόνες. Οι τελευταίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές, υψηλής προστιθέμενης αξίας ενώσεις, καθώς αποτελούν φυσικά προϊόντα ή τμήματα σημαντικών ενώσεων με βιολογική δραστικότητα.⁵ Για παράδειγμα ορισμένα φυσικά προϊόντα που περιλαμβάνουν ως δομική μονάδα α,β-ακόρεστες-δ-λακτονές είναι η (-)-callystatin A,⁹ (-)-kazusamycin A,¹⁵ leptomycin B,¹⁶ (+)-goniothalamine¹⁷ και (-)-massoialactone¹⁸ (Σχήμα 37).



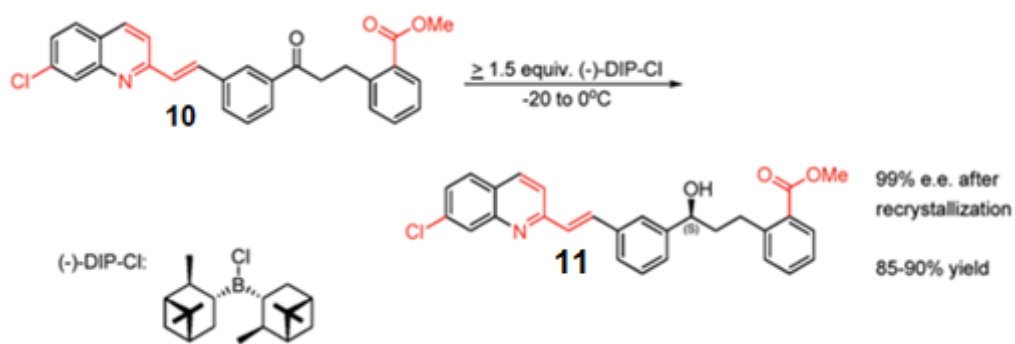
Σχήμα 37. α,β-Ακόρεστες-δ-λακτόνες

Οι οπτικώς καθарές α,β-ακόρεστες-δ-λακτόνες **21** (*R* ή *S*) μπορούν να σχηματιστούν εύκολα από τους αντίστοιχους δ-υδροξυ-β-κετοεστέρες **20** (*R* ή *S*), οι οποίοι μπορούν να προκύψουν από τους αντίστοιχους β,δ-δικετοεστέρες **19** με στερεοεκλεκτική και τοποεκλεκτική αναγωγή (Σχήμα 38).



Σχήμα 38. Σύνθεση δ-λακτονών από δικετο εστέρες

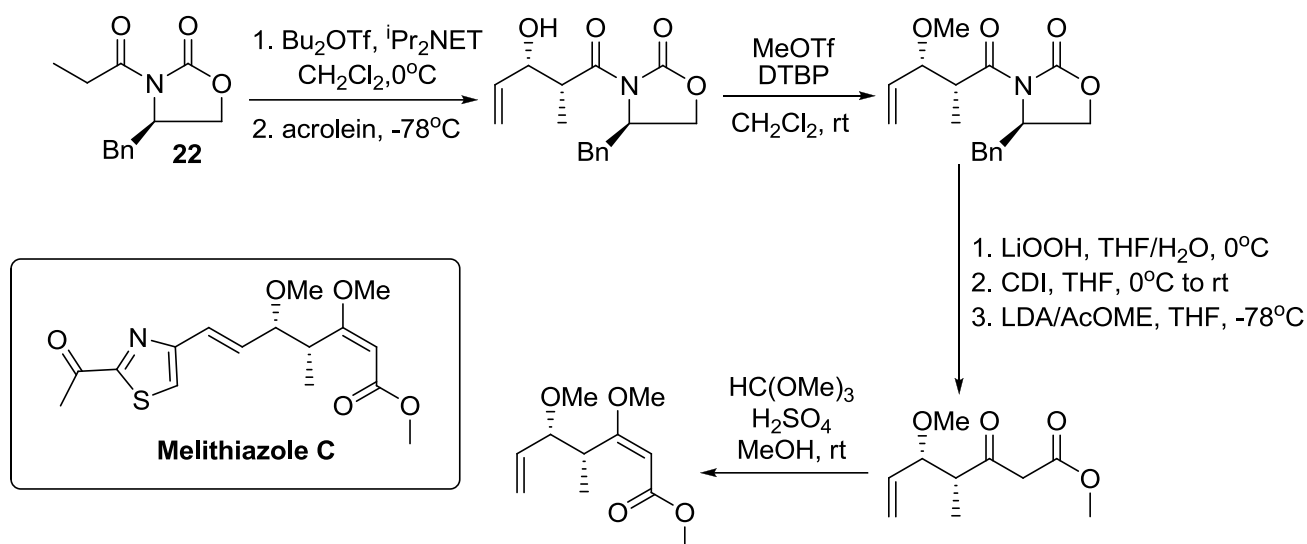
Συνήθως οι συνθετικές μέθοδοι από την κλασική οργανική σύνθεση για την εισαγωγή στερεογονικού κέντρου περιλαμβάνουν στάδια προστασίας, αποπροστασίας και αντιδράσεις απαιτητικές σε συνθήκες και αντιδραστήρια. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα σύνθεσης με απαιτητικές συνθήκες είναι στη σύνθεση του montelukast **12**, όπου αρχικά πραγματοποιείται η αναγωγή της κετόνης **10** προς την οπτικά ενεργή αλκοόλη **11**, με το χειρόμορφο αντιδραστήριο χλωρο-δι(2,6,6-τριμεθυλο-δικυκλο[3.1.1]-3-επτανιλο)βοράνιο ((+)-DIP-Cl) (Σχήμα 39).⁴⁵



Σχήμα 39. Σύνθεση ενδιάμεσου **11** στην πορεία σύνθεσης του montelukast

Μία ακόμη χαρακτηριστική σύνθεση οπτικά ενεργού υποστρώματος χρησιμοποιώντας κλασική χημική μεθοδολογία, αναφέρθηκε στη σύνθεση του αντιβιοτικού melithiazole C, από την ομάδα της Cossy.⁴⁶ Συγκεκριμένα για την εισαγωγή δύο στερεογονικών

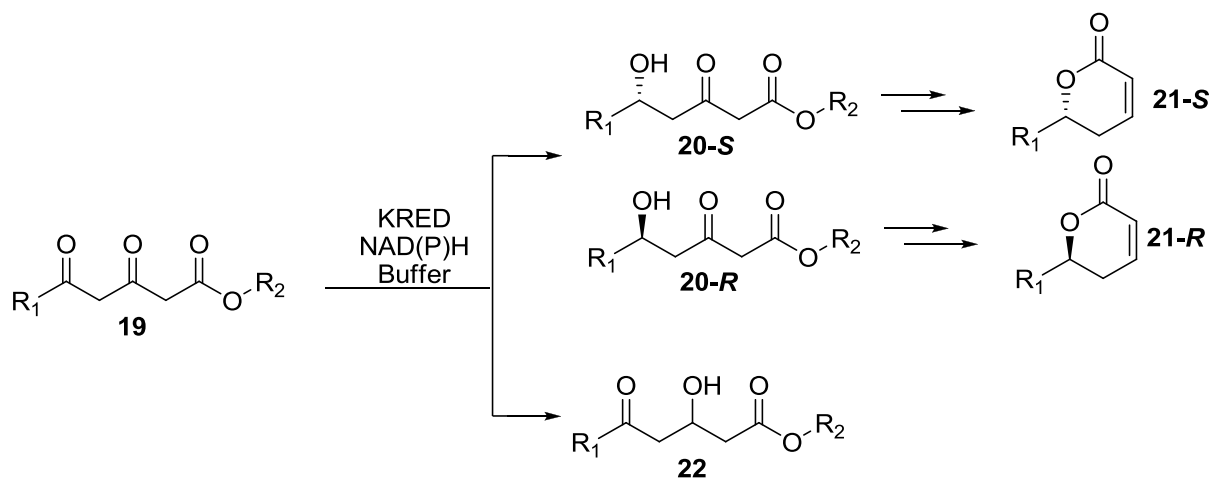
κέντρων, μιας μεθοξυ-ομάδας και μιας μεθυλομάδας, σε διπλανές θέσεις, πραγματοποίησαν επτά συνολικά βήματα, ξεκινώντας από το ήδη υπάρχον οπτικά ενεργό υπόστρωμα **22**, το οποίο έχει συντεθεί ξεχωριστά με χημικό τρόπο. Η απόδοση για αυτά τα βήματα ήταν 50% (Σχήμα 40).



Σχήμα 40. Σύνθεση ενδιάμεσου για την τελική σύνθεση του προϊόντος melithiazoleC

Ελάχιστες είναι οι δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία για την παρασκευή οπτικώς καθαρών υδροξυκετο-εστέρων **20** μέσω αναγωγής των αντίστοιχων δικετοεστέρων **19**.^{26,47} Τα προβλήματα στην περίπτωση της αναγωγής των δικετοεστέρων **19** είναι η μικρή τοποεκλεκτικότητα, η μικρή εναντιοεκλεκτικότητα καθώς και οι χαμηλές χημικές αποδόσεις.

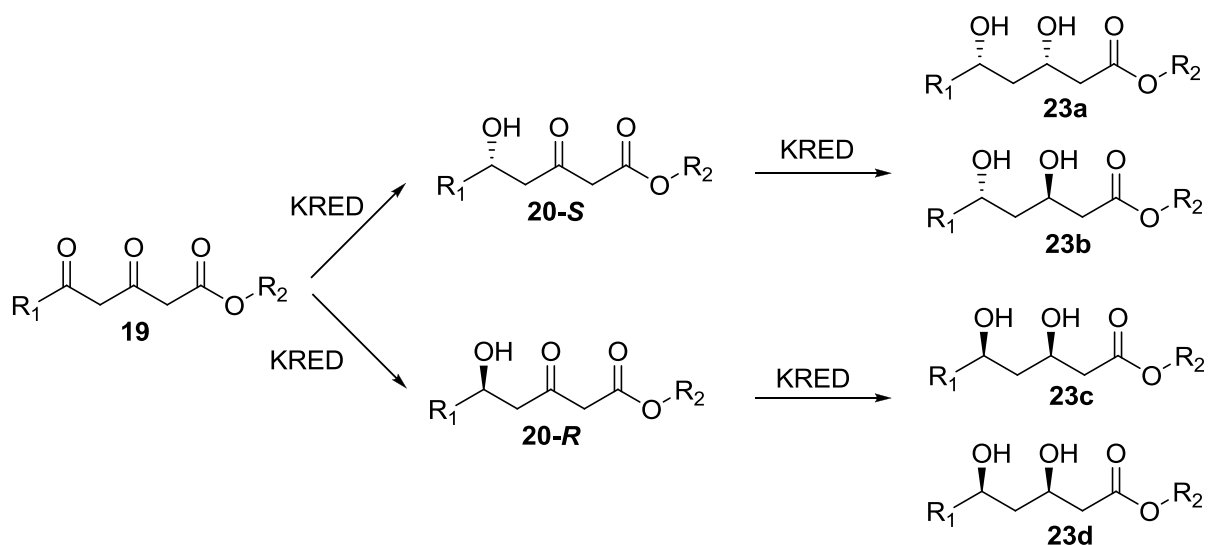
Η χρήση των απομονωμένων ενζύμων πιθανώς να συμβάλει στην εναντιοεκλεκτική και τοποεκλεκτική σύνθεση των πολύτιμων υδροξυκετο εστέρων **20**, **22** και τελικώς στην παρασκευή των α,β -ακόρεστων- δ -λακτονών **21** (Σχήμα 41).



Σχήμα 41. Υδροξύ κετοεστέρες και α,β-Ακόρεστες-δ-λακτόνες από δικετο-εστέρες

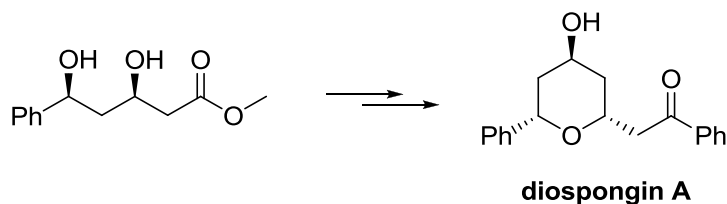
Μια εξίσου σημαντική κατηγορία ενώσεων είναι οι β,δ-διυδροξυεστέρες, καθώς αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την σύνθεση μιας πολύ σημαντικής κατηγορίας φαρμάκων που λέγονται στατίνες.²⁴ Οι στατίνες είναι ουσίες που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου αναγωγάση HMG-CoA η οποία είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Μειώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων καθώς επίσης αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (βλ. Σχήμα 17 σελ. 42).

Όπως παρατηρούμε, όλες οι στατίνες περιλαμβάνουν στη δομή τους β,δ-διυδροξυ οξέα ή τις αντίστοιχες β-υδροξυ-δ-λακτόνες. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να προκύψουν από τους αντίστοιχους β,δ-διυδροξυ εστέρες **23**, οι οποίοι μπορούν να σχηματιστούν από τους β,δ-δικετοεστέρες **19** με διπλή αναγωγή (Σχήμα 42). Ελάχιστες είναι οι δημοσιεύσεις στη βιβλιογραφία για την χημική παρασκευή των οπτικώς καθαρών διυδροξυ-εστέρων **23**.⁴⁸ Επίσης ελάχιστες είναι η περιπτώσεις όπου βιοκαταλύτες μπορούν να καταλύσουν την απευθείας σύνθεση των διυδροξυ εστέρων **23** ξεκινώντας από τους β,δ-δικετοεστέρες **19** ή από τους δ-υδροξυ-β-κετο εστέρες **20**.⁴⁹ Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η αναγωγή των β,δ-δικετοεστέρων **19** ή των δ-υδροξυ-β-κετο εστέρων **20**, χρησιμοποιώντας απομονωμένες κετορεδουκτάσες, έχοντας ως στόχο τη σύνθεση των β,δ-διυδροξυ εστέρων **23**.



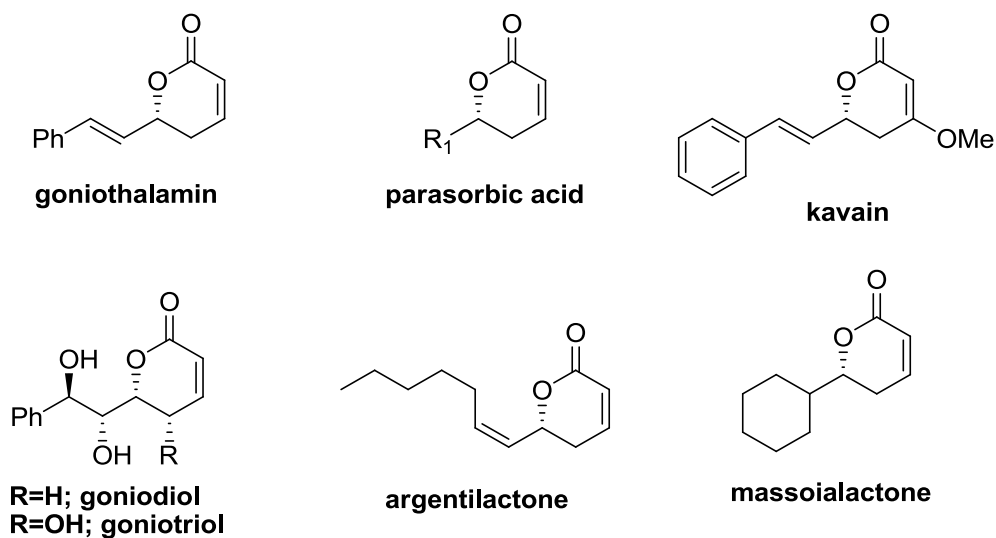
Σχήμα 42. Διυδροξυ-εστέρες και υδροξυ-κετο εστέρες από δικετο-εστέρες

Οι β,δ-διυδροξυεστέρες αποτελούν πρόδρομες χειρόμορφες ενώσεις φυσικών προϊόντων, όπως η diospongina A (Σχήμα 43).⁵⁰



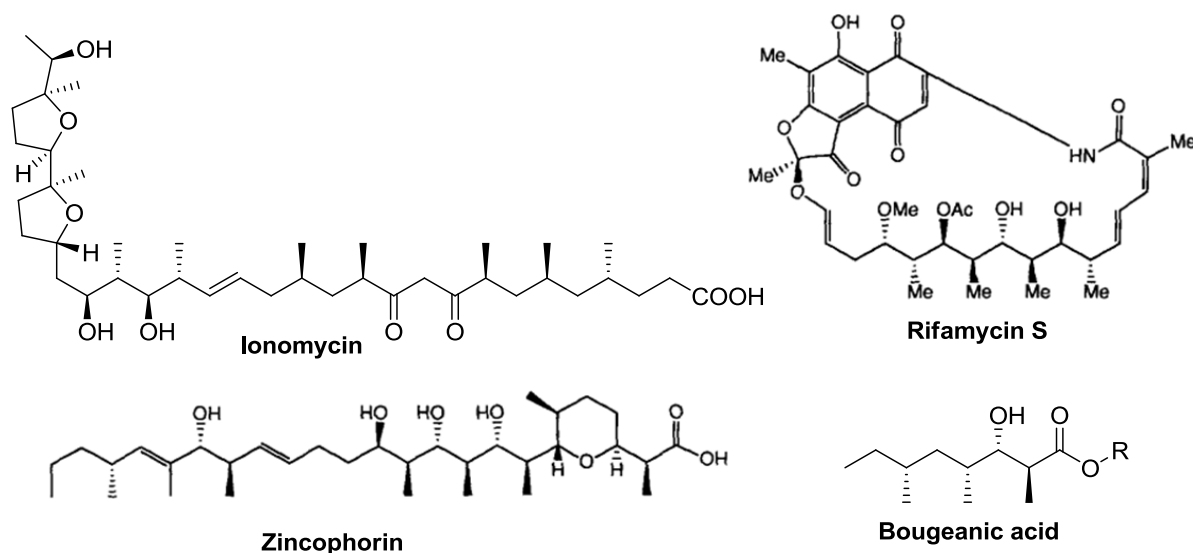
Σχήμα 43. Σύνθεση DiosponginaA μέσω οπτικά ενεργού διυδροξυ-εστέρα

Οι δ-λακτόνες αποτελούν δομικές μονάδες μιας μεγάλης κατηγορίας φυσικών προϊόντων (Σχήμα 44).⁵¹



Σχήμα 44. Φυσικά προϊόντα που περιέχουν δομή δ-λακτόνης

Οι α-υποκατεστημένοι ή γ-υποκατεστημένοι δ-υδροξυ-β-κετοεστέρες συναντώνται-και είναι πολύ σημαντικές δομικές μονάδες-σε διάφορα φυσικά προϊόντα και βιολογικά δραστικές ενώσεις. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων δομών παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 45).

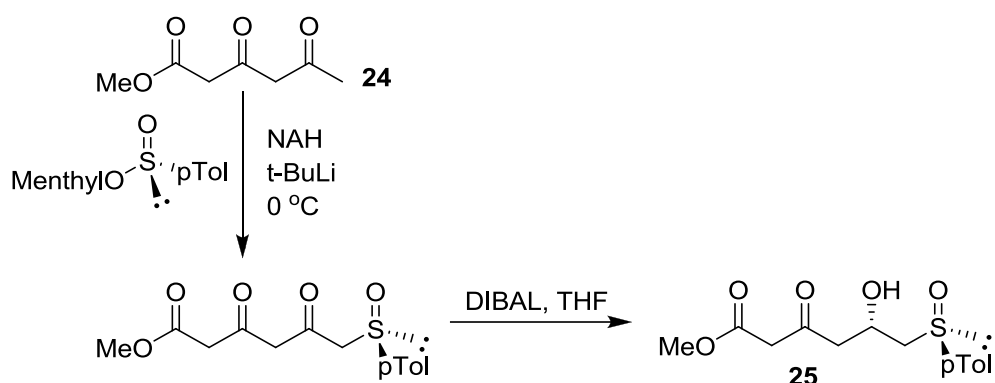


Σχήμα 45. Προϊόντα που περιέχουν μονάδα α- ή γ-υποκατεστημένων υδροξυ-κετοεστέρων

Συγκεκριμένα η ιονομυκίνη αποτελεί ένα ιονοφόρο, το οποίο παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces conglobatus*. Έχει αποδειχθεί ότι επάγει κεντρικά την απομυελίνωση και ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση των ώριμων ανθρώπινων β-κυττάρων. Επίσης διεγείρει την ενδοκυτταρική παραγωγή κυτοκινών, ιντερφερόνης και περφορίνης. Η rifamycin S, ανήκει στην γενική κατηγορία αντιβιοτικών με την ονομασία "rifamycins", τα οποία συντίθενται από το βακτήριο *Amicolatopsis Rifamycinica*. Τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά χορηγούνται για την καταπολέμηση των μυκοβακτηρίων, και ως εκ τούτου για την θεραπεία της φυματίωσης, της λέπρας και για λοιμώξεις του συμπλέγματος *Mycobacterium avium*. Η zincophorin αποτελεί ένα ιονοφόρο αντιβιοτικό, το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο *Streptomyces griseus*, το 1984 και παρουσιάζει ισχυρή *in vivo* δραστικότητα έναντι Gram-θετικών βακτηριδίων. Επίσης παρουσιάζει ισχυρές ανασταλτικές ιδιότητες ενάντια στην γρίπη Α (με υποκατηγορία των ιού H₁N₁).

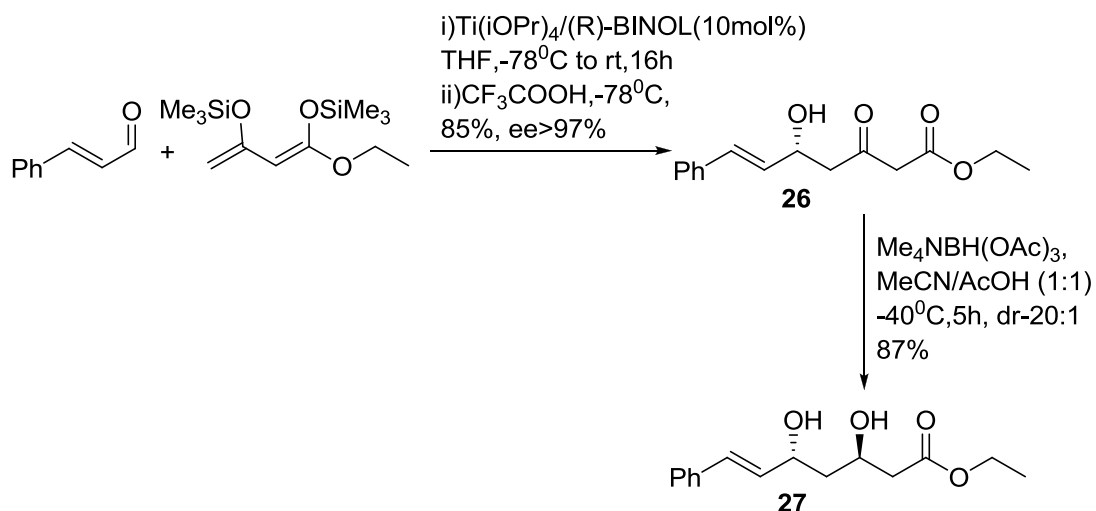
Τέλος το bougeanic acid, αποτελεί ένα μεταβολίτη από το είδος των λειχήνων, ο οποίος απομονώθηκε από το είδος *Ramalina*.⁵²

Αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση οπτικής ενεργών δ-υδρόξυ-β-κέτο εστέρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί κατ'αρχήν η συμπύκνωση Claisen ενός δικετοεστέρα **24** με χειρόμορφο αντιδραστήριο 5-1-ρ-τολουο-σουλφονικό μενθυλεστέρα και η αναγωγή στη συνέχεια με υδρίδιο του δι-ισοβούτυλο αργιλίου (DIBAL) προς το σχηματισμό της οπτικά ενεργής αλκοόλης **25** (Σχήμα 46).⁵³



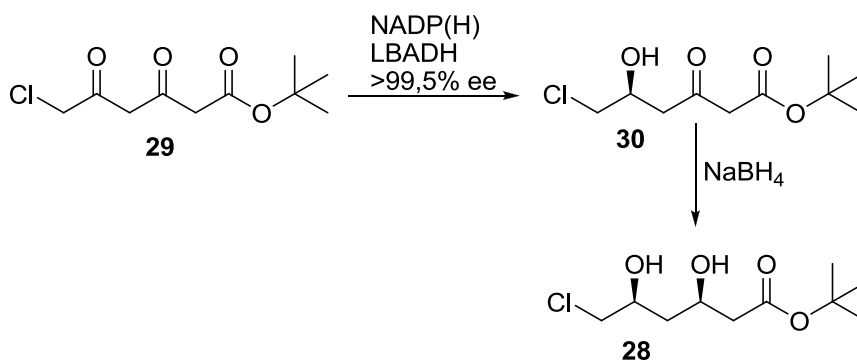
Σχήμα 46. Χημική αναγωγή με οπτικά ενεργό αντιδραστήριο

Αρκετές μέθοδοι έχουν επινοηθεί για τη σύνθεση οπτικής ενεργών β,δ-διυδρόξυ εστέρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πυρηνόφιλη προσθήκη με χρήση χειρόμορφου καταλύτη για τον σχηματισμό του δ-υδρόξυ-β-κέτο εστέρα **26** ακολουθούμενη από εκλεκτική χημική αναγωγή προς το β,δ-διυδρόξυ εστέρα **27** (Σχήμα 47).⁵⁴



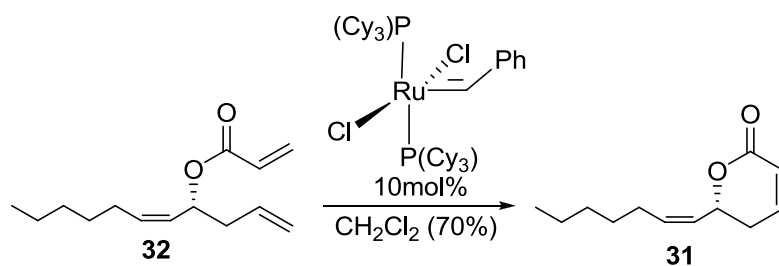
Σχήμα 47. Αλδολική συμπύκνωση με χρήση οπτικά ενεργού καταλύτη

Ορισμένοι β,δ-διυδροξυ εστέρες όπως ο **28** έχουν συντεθεί τα τελευταία χρόνια βιοκαταλυτικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγωγή με *Lactobacillus brevis* (LBADH) του δικετο εστέρα **29** ακολουθούμενη από χημική αναγωγή του **30** (Σχήμα 48).⁵⁵



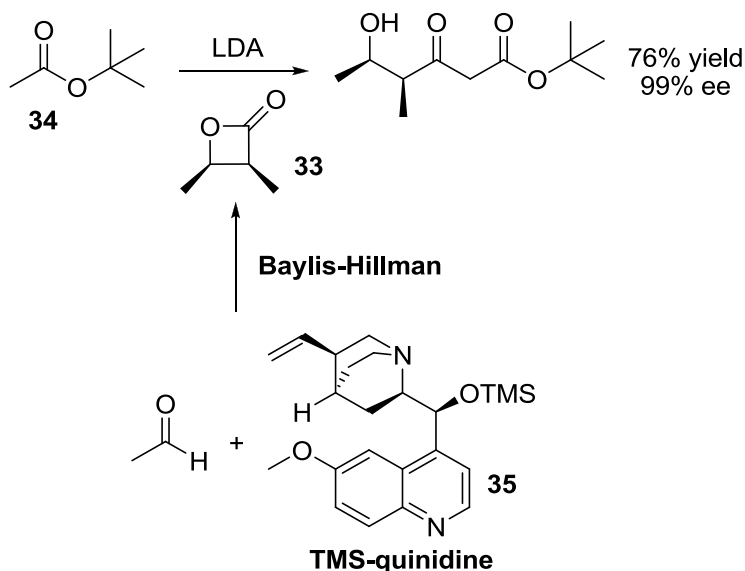
Σχήμα 48. Βιοκαταλυτική αναγωγή ενός χλωρο-δικετο εστέρα με ολόκληρο μικροοργανισμό και στη συνέχεια χημική αναγωγή προς διυδροξυ εστέρα

Τέλος, δ-λακτόνες όπως η **31** έχουν συντεθεί με ολεφινική μετάθεση του υποστρώματος **32** με καταλύτη Grubbs πρώτης γενιάς (Σχήμα 49).⁵⁶



Σχήμα 49. Ολεφινική μετάθεση με καταλύτη Grubbs

Υποκατεστημένοι υδροξυ-κετο εστέρες έχουν συντεθεί χημικά, όπως παραδείγματος χάριν μέσω αλδολικής συμπύκνωσης, μεταξύ μίας β-λακτόνης **33** και του οξικού τριτ-βουτυλεστέρα **34**. Η β-λακτόνη έχει συντεθεί με αντίδραση Baylis-Hillman με χρήση οπτικά ενεργού και ενεργοποιημένου α-αλκενίου, της προστατευμένης quinidine **35**, με ακεταλδεΐδη (Σχήμα 50).⁵⁷

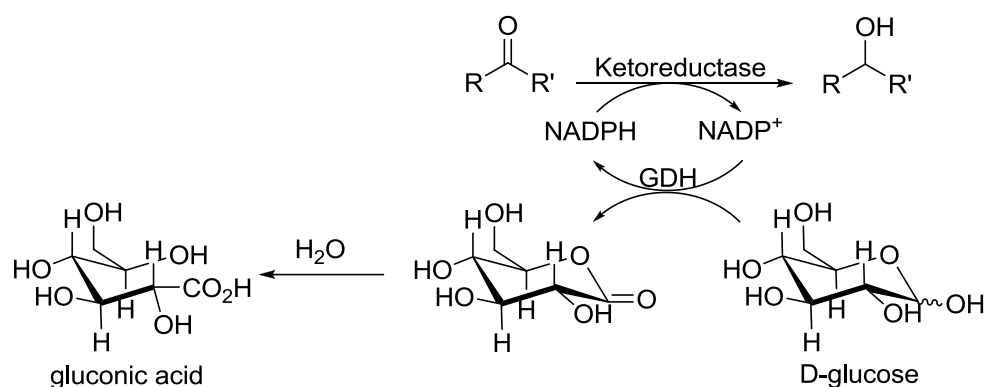


Σχήμα 50. Χημική σύνθεση οπτικά ενεργού γ-υποκατεστημένου-δ-υδροξυ-β-κετο εστέρα

2.3 Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων

Οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν απομονωμένες κετορεδουκτάσες, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία BioCatalytics και καθαρότητα 70%. Όλες οι κετορεδουκτάσες αποδείχτηκαν εξαιρετικά σταθερές για πολλούς μήνες κατά την αποθήκευσή τους στους -20°C.

Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 64 σε αριθμό (KRED-101-131, KRED-A1A-A1Z, KRED-B1A-B1G) και όλες ήταν NADPH-εξαρτώμενες. Και τα δυο συνένζυμα είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρία ProzoMix και SyncoZymes. Για την αναγέννηση και των δυο μορφών συνενζύμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανακύκλωσης γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης. Στο σύστημα αυτό έλαβαν μέρος η D-γλυκόζη και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH), ένζυμο το οποίο και αυτό είναι διαθέσιμο από την SyncoZymeS. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνει τη D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ ανάγοντας ταυτόχρονα το NADP⁺ σε NADPH (Σχήμα 51). Η GDH είναι καθαρά εξειδικευμένο ένζυμο στην D-γλυκόζη, οπότε δεν οξειδώνει το προϊόν της αντίδρασης (αλκοόλη). Έτσι με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων.



Σχήμα 51. Γενική αντίδραση αναγωγής με τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες.

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

Πριν από τις ενζυμικές αντιδράσεις, για λόγους ταυτοποίησης, παρασκευάστηκε όλη η σειρά των προϊόντων αναγωγής σε ρακεμική μορφή, με χημική μέθοδο.

Για την εύρεση των πιο δραστικών και εκλεκτικών ενζύμων, όλα τα υποστρώματα εξετάστηκαν με όλη τη σειρά των κετορεδουκτασών.

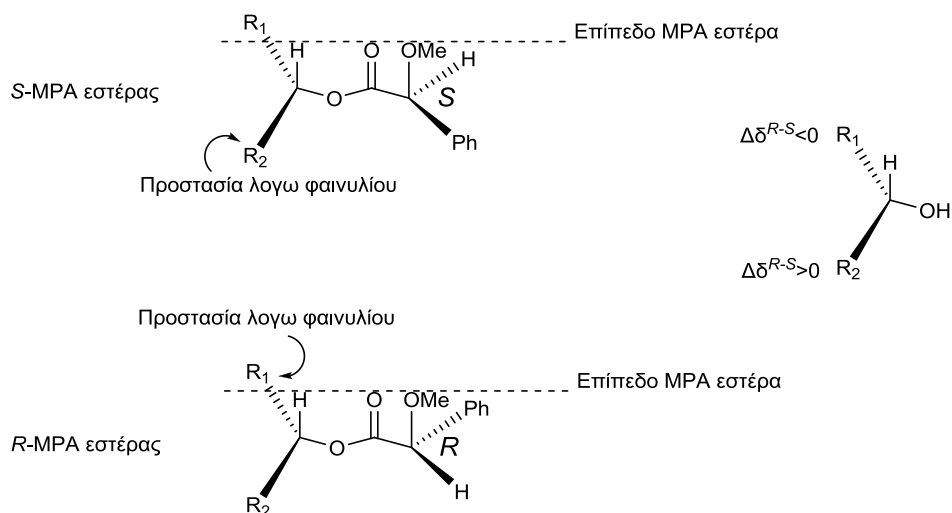
Ο έλεγχος της πορείας των ενζυμικών αντιδράσεων, της εναντιοεκλεκτικότητας και της διαστερεοεκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε είτε με αέρια χρωματογραφία, είτε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και στις δύο περιπτώσεις με χειρόμορφη κολώνα χρωματογραφίας. Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

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

Ακολουθώντας την παραπάνω μεθοδολογία οι ενζυμικές αναγωγές πραγματοποιήθηκαν με μεγάλη ευκολία συνθέτοντας πολύτιμες χειρόμορφες ενώσεις, αποδεικνύοντας την μεγάλη σημασία των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.

2.4 Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων βασίζεται ολοένα και περισσότερο σε απλές και αξιόπιστες μεθόδους. Η κλασική μέθοδος ανισοτροπίας, την οποία εισήγαγαν και αξιοποίησαν οι Dale και Mosher,⁵⁸ ο Trost και οι συνεργάτες του⁵⁹ και άλλοι,⁶⁰ συνεχίζει να αποτελεί την απλούστερη και πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων (στο φάσμα ^1H NMR) των δυο διαστερομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστηρίου ανισοτροπίας, όπως το α-μεθοξυ-α-τριφθορο-μεθυλο-φαινυλο-οξικό οξύ (MTPA) ή α-μεθοξυ-φαινυλο-οξικό οξύ (MPA).^{58,60}



Σχήμα 52. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (*R*)-MPA και (*S*)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

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

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 52, μετά την εστεροποίηση της δευτεροταγούς αλκοόλης και με τα δυο εναντιομερή του MPA, στη διαμόρφωση των MPA-εστέρων το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και η μεθύoxy ομάδα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι κάθε ομάδα της αλκοόλης (R_1 , R_2) έχει απέναντί της ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, είτε υδρογόνο, είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα η ομάδα R_1 του (*R*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα φαινύλιο, ενώ η R_2 ένα υδρογόνο. Αντιθέτως η ομάδα R_1 του (*S*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η R_2 ένα φαινύλιο.

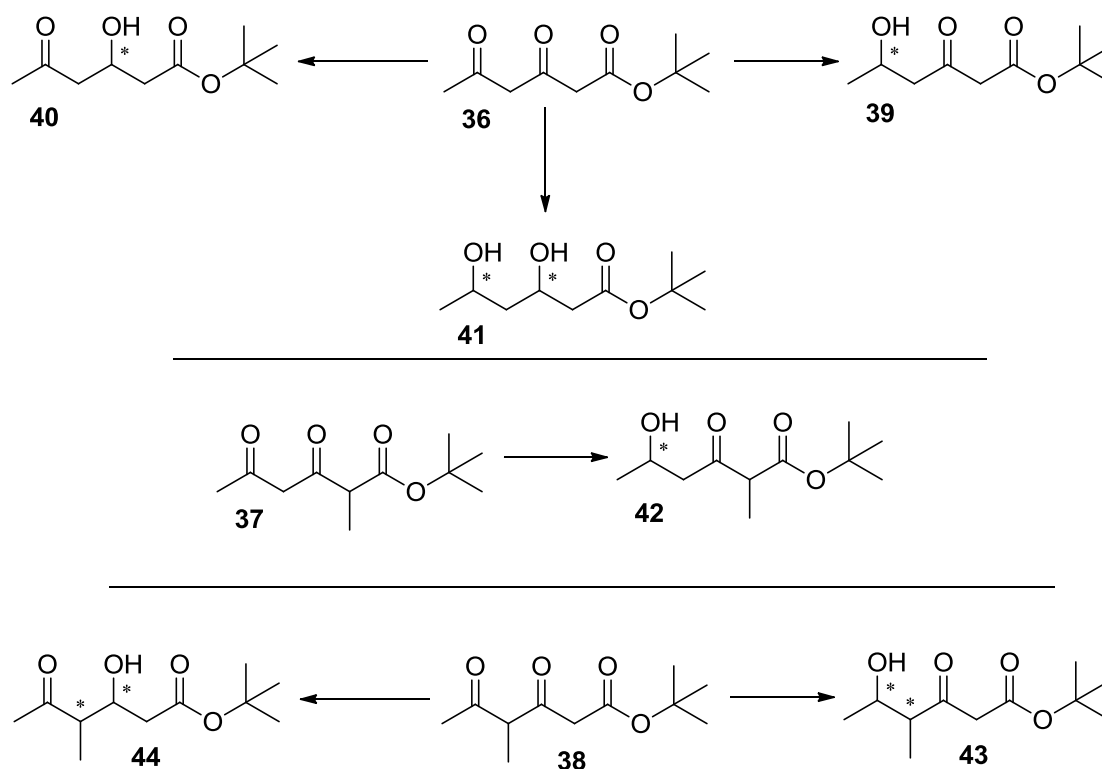
Γενικά οι ομάδες οι οποίες είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα ^1H NMR, λόγω προστασίας. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομάδα R_1 του (*R*)-MPAεστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλότερα ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη του (*S*)-MPA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

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

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

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία ολοκληρώθηκε η μελέτη των βιοκαταλυτικών αναγωγών με κετορεδουκτάσες του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **36**. Στη συνέχεια επεκτάθηκε η μελέτη με αντίστοιχα υποστρώματα αυξημένης υποκατάστασης και συγκεκριμένα διερευνήθηκαν εκτενώς οι βιοαναγωγές του 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **37** και του 4-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **38**. Πιο συγκεκριμένα με αναγωγή των παραπάνω μπορούν να προκύψουν οι δ-υδροξυ-β-κετο εστέρες **39**, ο β-υδροξυ-δ-κετο εστέρας **40**, οι β,δ-διυδροξυ εστέρες **41**, οι α-μεθυλο-δ-υδροξυ-β-κετο εστέρες **42**, οι γ-μεθυλο-δ-υδροξυ-β-κετο εστέρες **43** και ο γ-μεθυλο-β-υδροξυ-δ-κετο εστέρας **44** σε δυο διαδοχικά βήματα ή σε ένα βήμα. Πιο αναλυτικά στο παρακάτω Σχήμα (Σχήμα 53) φαίνονται όλα τα πιθανά προϊόντα αναγωγής που μπορούν να προκύψουν από τα παραπάνω υποστρώματα.

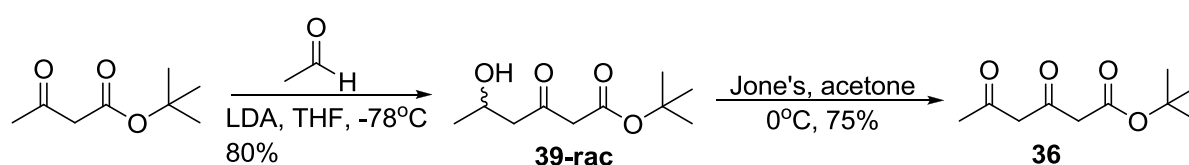


Σχήμα 53. Προϊόντα αναγωγής δικετο εστέρων με καταλύτη κετορεδουκτάση

Για τον σχηματισμό των υδροξυ-κετο εστέρων απαιτείται τοποεκλεκτική αναγωγή ενός εκ των δύο καρβόνυλο ομάδων, ενώ για τον σχηματισμό διυδροξυ-

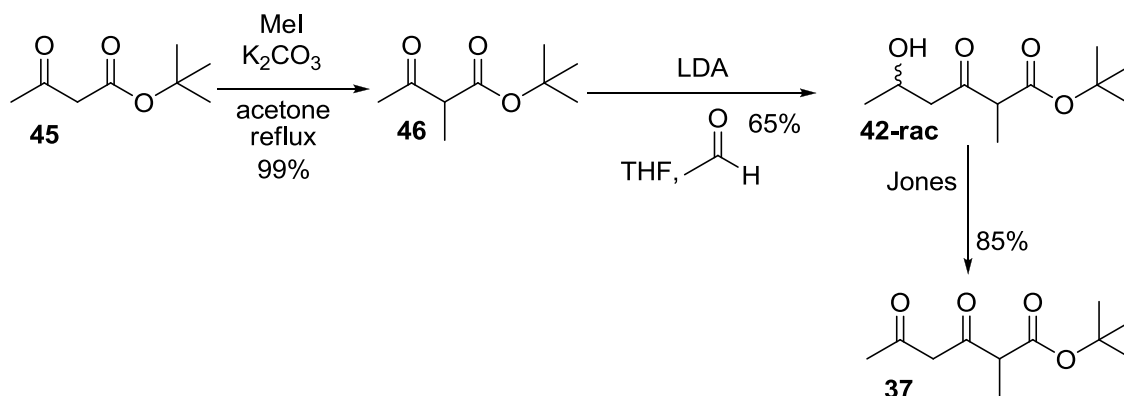
εστέρων απαιτείται αναγωγή και των δυο καρβόνυλο ομάδων. Η σύνθεση ενός ή περισσοτέρων διαφορετικών διαστερεομερών από τους παραπάνω δικετο-εστέρες, με μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, πραγματοποιήθηκε βιοκαταλυτικά με χρήση NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών.

Η σύνθεση του 3,5-διοξοεξανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **36** πραγματοποιήθηκε με πολύ απλές αντιδράσεις. Αρχικά παρασκευάστηκε ο ρακεμικός δ-υδροξυ-β-κέτο εστέρας **39-rac** με αλδολική συμπύκνωση του δικετοεστέρα με ακεταλδεύδη ακολουθούμενη από αντίδραση οξείδωσης προς το σχηματισμό του υποστρώματος (Σχήμα 54).



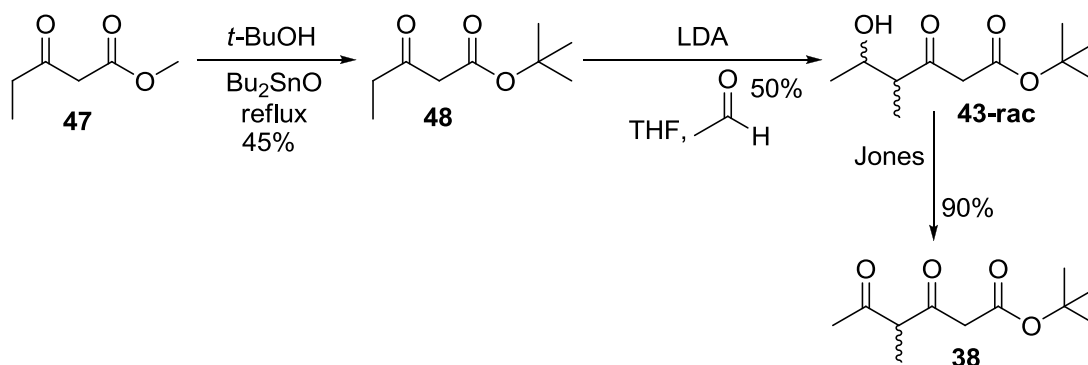
Σχήμα 54. Σύνθεση του 3,5-διοξοεξανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **36**

Επίσης η σύνθεση του α-μεθυλο-β,δ-δικετο εστέρα πραγματοποιήθηκε με απλά βήματα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε αντίδραση αλκυλίωσης του 3-οξοβουτανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **45**, προς το σχηματισμό του 2-μεθυλο-3-οξοβουτανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **46**. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλδολική συμπύκνωση με ακεταλδεύδη προς τον σχηματισμό του ρακεμικού 5-υδροξυ-3-οξοεξανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **42-rac**. Τέλος, με μια αντίδραση οξείδωσης με το αντιδραστήριο Jones, επιτεύχθηκε η σύνθεση του 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **37** (Σχήμα 55).



Σχήμα 55. Σύνθεση του 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **37**

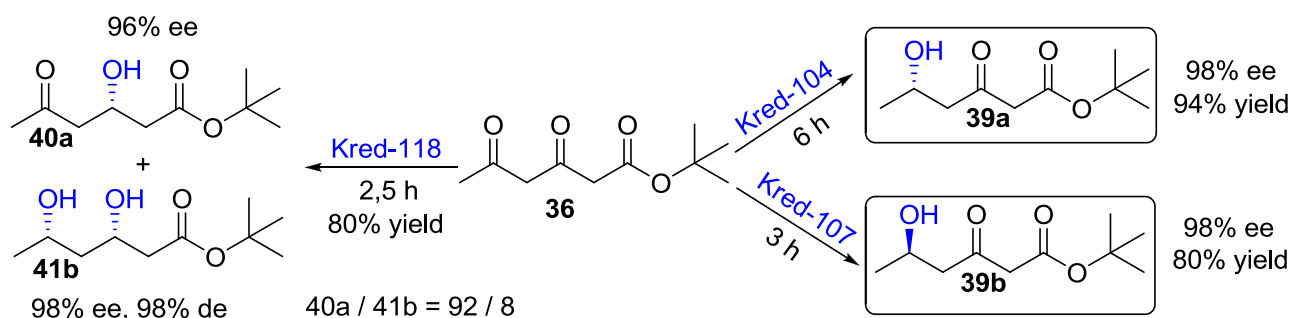
Τέλος, η σύνθεση του γ-μεθυλο-β,δ-δικετο εστέρα πραγματοποιήθηκε αρχικά με μια αντίδραση μετεστεροποίησης του 3-οξο-πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **47** με τριτ-βουτανόλη, προς τον εστέρα **48**. Στην συνέχεια με μια αλδολική συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του ρακεμικού γ-μεθυλο-δ-υδροξυ-β-κετο-εστέρα **43-rac**. Στο τελικό στάδιο σύνθεσης του υποστρώματος **38** πραγματοποιήθηκε αντίδραση οξείδωσης με το αντιδραστήριο Jones (Σχήμα 56).



Σχήμα 56. Σύνθεση του 4-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **38**

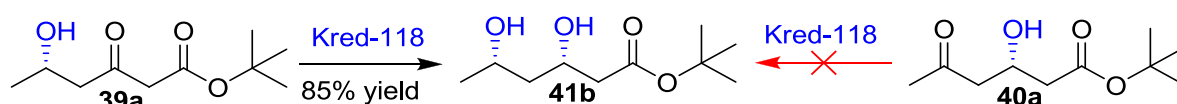
Ακολουθώντας την μεθοδολογία των ενζυμικών αναγωγών που περιγράφηκε αναλυτικά προηγουμένως, συντέθηκαν με μεγάλη ευκολία πολύτιμες χειρόμορφες ενώσεις, αποδεικνύοντας έτσι την μεγάλη σημασία των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.

Στο Σχήμα 57 παρουσιάζονται συνοπτικά τα καλύτερα αποτελέσματα (όσον αφορά στην στερεοεκλεκτικότητα και στο ποσοστό μετατροπής) της ενζυμικής αναγωγής του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **36**.⁶¹



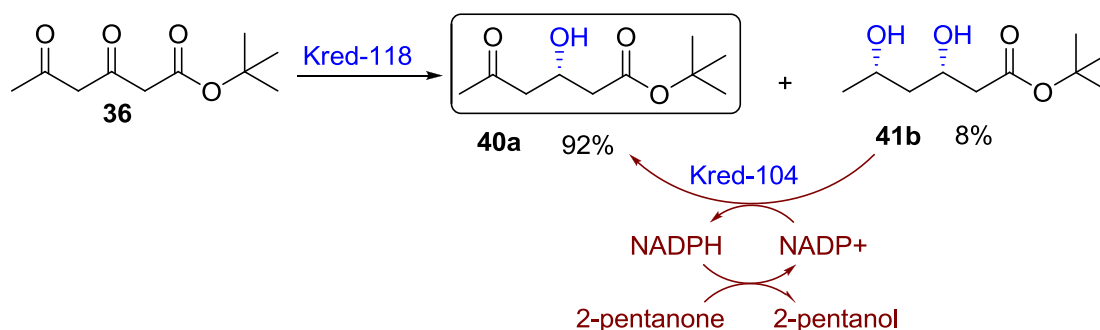
Σχήμα 57. Ενζυμικές αναγωγές 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα προς υδροξυ-κετο εστέρες

Σημαντικό αποτέλεσμα αποτέλεσε η βιοκαταλυτική αναγωγή με το ένζυμο 118, κατά την οποία ανάγεται η 3-κετο ομάδα του δικετοεστέρα σε πολύ υψηλό ποσοστό, 92%, δίνοντας όμως ένα μικρό ποσοστό 8% *syn*-διόλης. Η συγκεκριμένη ενζυμική αναγωγή μελετήθηκε περαιτέρω ούτως ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή πορεία που οδηγεί στο παραπροϊόν του διυδροξυ εστέρα. Οι πιθανές πορείες είναι: α) πρώτη αναγωγή στην 5 θέση και δεύτερη αναγωγή στην 3 θέση, β) το αντίστροφο, δηλαδή πρώτα η αναγωγή στην 3 θέση και μετά στην 5 θέση. Οπότε σε καθαρό δείγμα του (*S*)-3-υδροξυ-5-κέτο εστέρα **40a** που προέκυψε από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του μίγματος από την ενζυμική αναγωγή με το ένζυμο KRED-118, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αναγωγή πάλι με την KRED-118, όπου διαπιστώθηκε ότι δεν σχηματίζεται η διόλη. Έτσι στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αναγωγή του (*S*)-5-υδροξυ-3-κέτο εστέρα **39a** με το ίδιο ένζυμο (KRED-118), και το προϊόν της αναγωγής ήταν η *syn*-διόλη **41b** (Σχήμα 58).



Σχήμα 58. Πορεία σύνθεσης παραπροϊόντος διυδροξυ εστέρα **41b**

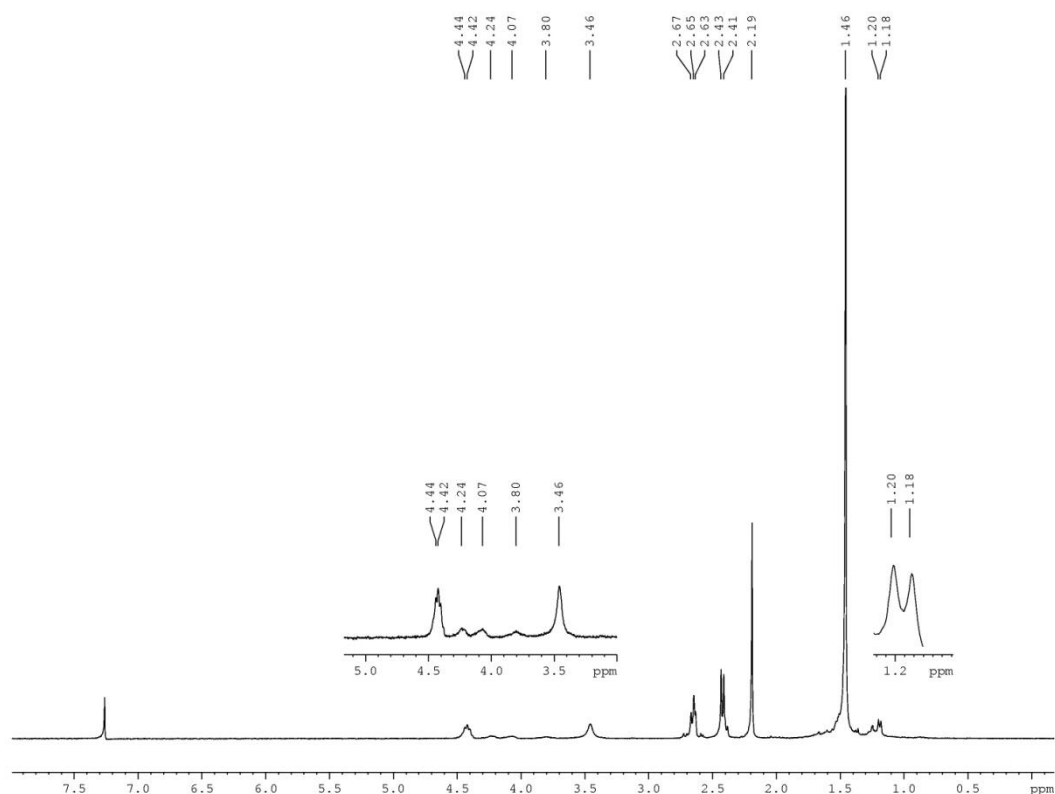
Η μη αναμενόμενη συμπεριφορά του ενζύμου KRED-118 και η εντυπωσιακή τοποεκλεκτικότητα του οδήγησε σε μια σειρά πειραμάτων για την μείωση του ποσοστού του παραπροϊόντος της διόλης (Σχήμα 59).



Σχήμα 59. Ενζυμική αναγωγή της ένωσης **36** με το ένζυμο KRED-118 και διαδοχική ενζυμική οξείδωση της **41b** με το ένζυμο KRED-104 προς το σχηματισμό οπτικά καθαρού 3-υδροξυ-5-κέτο εστέρα **40a**, ως το μοναδικό προϊόν

Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από το φάσμα ^1H NMR, όπου η διπλή κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου της διόλης στα $\sim 1,2$ ppm, έχει εξαφανιστεί (Σχήμα 60).

Θα πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι είναι εξαιρετικά δύσκολη η τοποεκλεκτική σύνθεση του προϊόντος **40** όπως αποδεικνύεται από τη βιβλιογραφική έρευνα, γεγονός που καθιστά το παραπάνω αποτέλεσμα ιδιαίτερα σημαντικό.

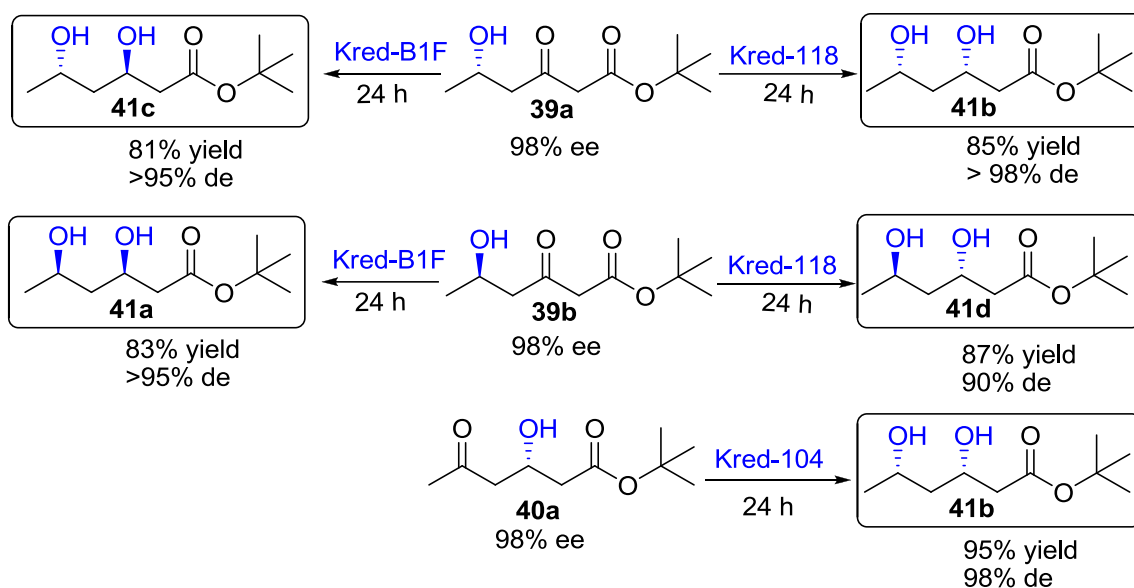


Σχήμα 60. Στα παραπάνω φάσματα ^1H NMR φαίνεται ότι έχει εξαφανιστεί η διπλή κορυφή του παραπροϊόντος της διόλης στα $\sim 1,2$ ppm.

Διαδοχική ενζυμική αναγωγή προς το σχηματισμό οπτικά καθαρών 1,3-διολών

Στη συνέχεια μελετήθηκε η περαιτέρω ενζυμική αναγωγή των οπτικά καθαρών και ενζυμικά παραγόμενων υδρόξυ-κέτο-εστέρων προς τον σχηματισμό β,δ-διυδροξυ-

εστέρων. Στο Σχήμα 61 φαίνονται τα αποτελέσματα καθώς και τα ποσοστά στερεοεκλεκτικότητας και τα ποσοστά μετατροπής.⁶¹



Σχήμα 61. Ενζυμική αναγωγή οπτικά ενεργών υδροξυ-κετο εστέρων προς το σχηματισμό διυδροξυ-εστέρων

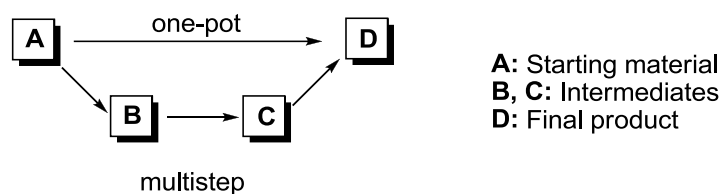
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι είναι δυνατή η σύνθεση και των τεσσάρων διαστερεομερών της **41** σε μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα με χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων. Παραδείγματος χάριν πραγματοποιήθηκε ενζυμική αναγωγή του (*S*)-5-υδρόξυ-3-κετο εστέρα **39a** με το ένζυμο KRED-118 προς τον σχηματισμό της *syn*-διόλης (*S,S*) **41b**, διαδικασία που πραγματοποιήθηκε και αντίστροφα, δηλαδή στον (*S*)-3-υδρόξυ-5-κέτοεστέρα **40a** πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αναγωγή με την κετορεδουκτάση 104, που οδήγησε στο ίδιο προϊόν **41b**.

Σύνθεση οπτικά καθαρών 3,5-διυδροξυ εστέρων σε δύο στάδια και μια φιάλη αντίδρασης

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητικές προσπάθειες τόσο στον ακαδημαϊκό χώρο όσο και στην χημική βιομηχανία επικεντρώνονται στο σχεδιασμό συνθετικών μεθόδων στα πλαίσια περιβαλλοντικής αποδεκτών συνθηκών και γενικότερα στα πλαίσια της πράσινης χημείας. Σε μία αντίδραση πολλών σταδίων, πρόκληση αποτελεί ο συνδυασμός πολλών καταλυτικών βημάτων, στην ίδια φιάλη αντίδρασης, διαδικασία γνωστή ως

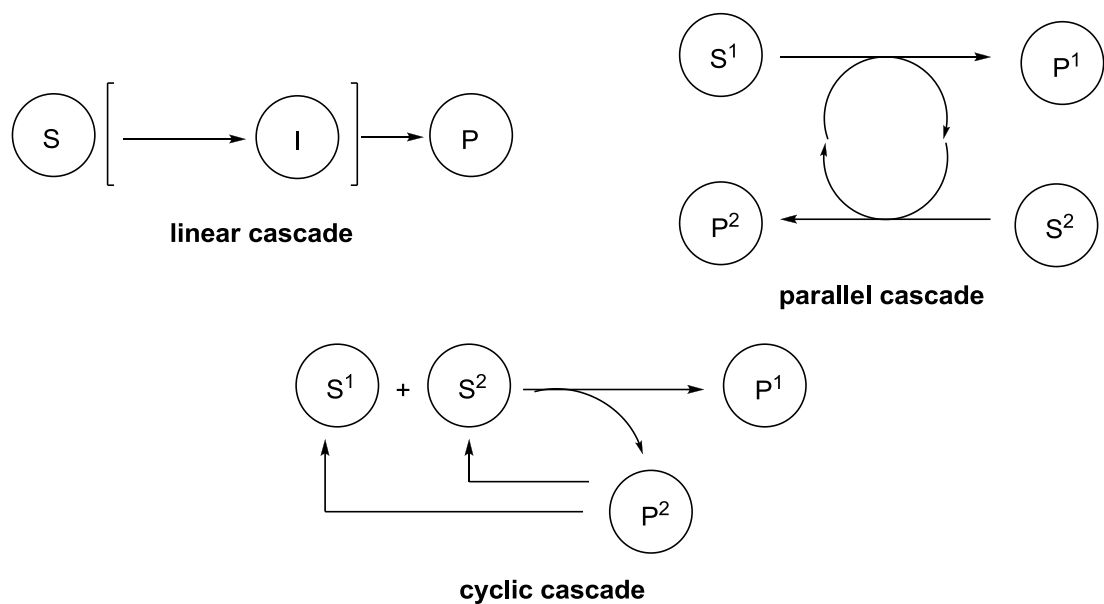
«καταλυτική διαδικασία πολλαπλών βημάτων» (cascade). Σε αυτό το είδος αντιδράσεων συμβαίνουν πολλές διαδοχικές αντιδράσεις στην ίδια φιάλη, χωρίς την απομόνωση του ενδιάμεσου (Σχήμα 62), με αποτέλεσμα να αποφεύγεται επιπλέον προσπάθεια, χρόνος και κατανάλωση διαλυτών. Κατά συνέπεια, οι διαδοχικές αντιδράσεις με πολλά ένζυμα απλοποιούν μια συνθετική πορεία προς το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.^{44a}

Υπάρχουν τρεις τύποι ενζυμικών αντιδράσεων “cascade”, η ευθεία αντίδραση, η μέθοδος που εφαρμόσαμε και στις δικές μας συνθέσεις, όπου ξεκινάμε από ένα αρχικό υπόστρωμα, και μέσω ενός ενδιάμεσου καταλήγουμε στο προϊόν (Σχήμα 63).



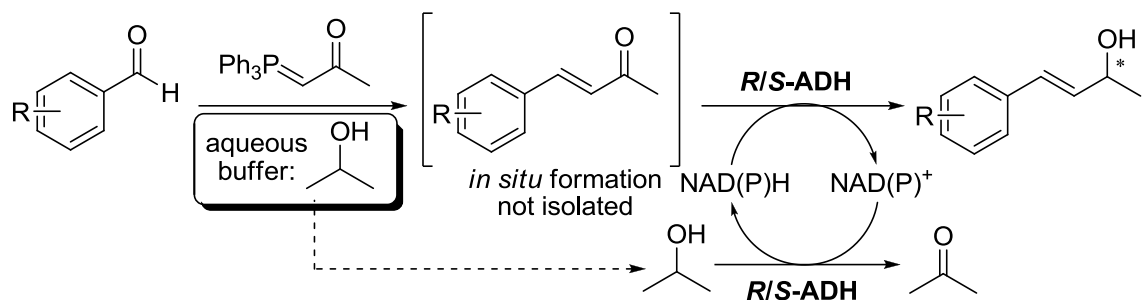
Σχήμα 62. Διαδοχικές αντιδράσεις στην ίδια φιάλη οδηγούν στο τελικό προϊόν, χωρίς την απομόνωση των διαφόρων ενδιάμεσων

Υπάρχει επίσης η παράλληλη αντίδραση και η κυκλική. Η παράλληλη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, όπου ο σχηματισμός του προϊόντος συνδέεται με μια δεύτερη παράλληλη αντίδραση ενός δεύτερου υποστρώματος, που πραγματοποιείται ταυτόχρονα, ώστε να συνεισφέρει στην μεταφορά υδριδίου για την ανακύκλωση του συμπαραγόντα. Ενώ στην κυκλική αντίδραση, ένα από τα σχηματιζόμενα προϊόντα, μετατρέπεται σε ένα από τα αρχικά υποστρώματα και αρχίζει πάλι ο καταλυτικός κύκλος(Σχήμα 63).^{44b}



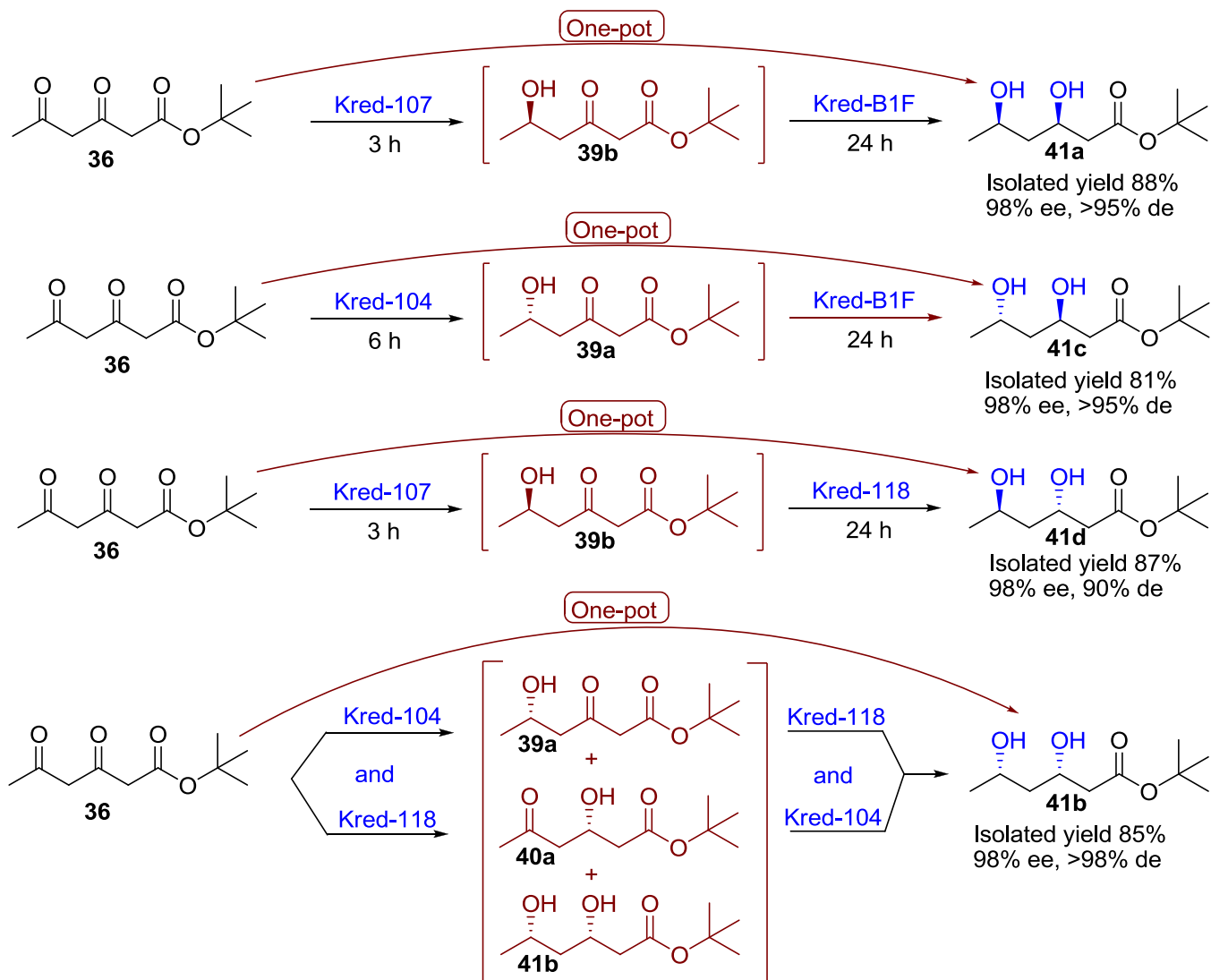
Σχήμα 63. Τύποι ενζυμικών αντιδράσεων “cascade”

Συγκεκριμένα, οι βιοκαταλυτικές αναγωγές κετονών αποτελούν υψηλής αξίας μέθοδο, αφού αποσκοπούν στην ασύμμετρη σύνθεση οπτικά ενεργών αλκοολών.^{44c,47} Επίσης παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά εναντιοεκλεκτικότητας και υψηλά ποσοστά μετατροπής και απόδοσης, καθιστώντας αυτές τις μεθόδους ιδανικές για μεγάλης κλίμακας αντιδράσεις. Ο Gröger και η ομάδα του, το 2007, δημοσίευσαν την εναντιοεκλεκτική σύνθεση μιας αλλυλικής αλκοόλης, συδυάζοντας δύο βήματα, μια αντίδραση Wittig και μια ενζυμική αναγωγή (Σχήμα 64).^{44d} Μέχρι τότε στην βιβλιογραφία υπήρχαν μέθοδοι “one-pot, twostep” με διφασικά συστήματα (υδατική και οργανική φάση) ή με χρήση δυναμικού κινητικού διαχωρισμού, αλλά καμία χημειοενζυμική μέθοδος.



Σχήμα 64. Χημειοενζυμική σύνθεση οπτικά ενεργών αλκοολών σε ένα βήμα, χωρίς την απομόνωση της ενδιάμεσης κετόνης

Έχοντας λοιπόν μελετήσει την ενζυμική αναγωγή του β,δ-δικετοεστέρα **36** και έχοντας προσδιορίσει τους κατάλληλους βιοκαταλύτες για τον σχηματισμό των *syn*- και *anti*-διυδροξυ εστέρων, προχωρήσαμε στην διερεύνηση της δυνατότητας να πραγματοποιηθεί αυτό το Σχήμα σε μία φιάλη, χωρίς απομόνωση του ενδιάμεσου. Πραγματοποιήσαμε την δύο σταδίων αναγωγή στην ίδια φιάλη (*one-pot*), χωρίς να απομονωθεί το ενδιάμεσο προϊόν, ξεκινώντας από το δικετοεστέρα **36** (Σχήμα 65). Με τον τρόπο αυτό συντέθηκαν απευθείας οι *syn* και οι *anti*-διυδροξυ εστέρες **41a-d**.⁶¹

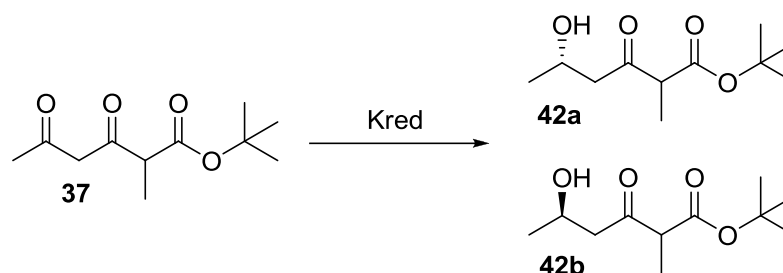


Σχήμα 65. Απευθείας σύνθεση οπτικά ενεργών διυδροξυ-εστέρων σε δύο στάδια, στην ίδια φιάλη αντίδρασης, χωρίς την απομόνωση του ενδιάμεσου

Εφόσον ολοκληρώθηκε με επιτυχία η διερεύνηση των ενζυμικών αναγωγών του 3,5-διόξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, προχωρήσαμε στη μελέτη των ενζυμικών αναγωγών των υποκατεστημένων δικετο εστέρων, στην α και στην γ θέση αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα (όσον αφορά στην στερεοεκλεκτικότητα και στο ποσοστό μετατροπής) της ενζυμικής αναγωγής του 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **37**. Πρέπει να αναφερθεί ότι αρχικά συντέθηκε ο 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκός μεθυλεστέρας, ο οποίος όμως στον έλεγχο σταθερότητας που πραγματοποιήθηκε, του υποστρώματος μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα

φωσφορικών pH 7 (τυφλό δείγμα), δεν αποδείχθηκε σταθερός. Για να αυξηθεί η σταθερότητα του εστέρα, αποφασίστηκε να υποκατασταθεί ο μεθυλεστέρας με τριτ-βουτυλεστέρα.



Σχήμα 66. Προϊόντα αναγωγής 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **37**

Πίνακας 1. Ενzymική αναγωγή 2-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα

KRED	Conversion (%)	42a-S (ee %)	42b-R (ee %)
102	>99	99 (>99)	-
104	>99	99 (>99)	-
106	>99	99 (>99)	-
107	>99	-	99 (>99)
118	>99	99 (>99)	-
131	76	99 (>99)	-
B1F	60	99 (>99)	-

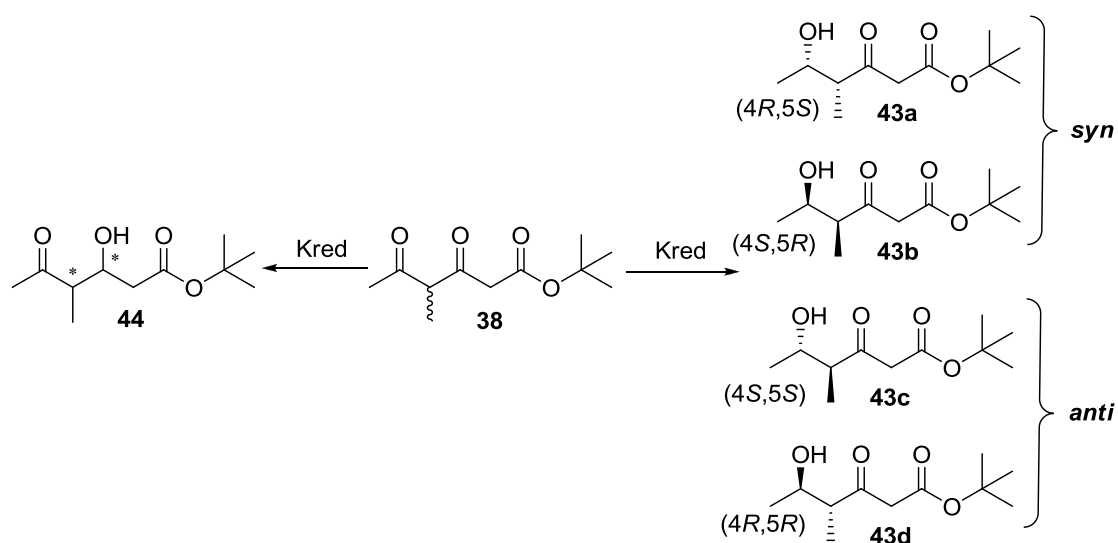
* Όλα τα παραπάνω προϊόντα εμφανίζουν >99% ee, βάσει GC-chiral

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα ένζυμα KRED-102, 104, 106, 119, 131 και B1F εμφανίζουν Prelog δραστηριότητα, ενώ το ένζυμο KRED-107 *anti*-Prelog, συνθέτοντας τα 2 εναντιομερή σε μεγάλη οπτική καθαρότητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δράσεις των ενζύμων KRED-118, 131 και B1F. Συγκεκριμένα τα ένζυμα KRED-118 και 131 δεν πραγματοποιούν αναγωγή στην 3 κετο-ομάδα, όπως παρατηρήσαμε με το προηγούμενο εστέρα, τον 3,5-διοξοεξανοϊκό τριτ-βουτυλεστέρα **36**. Επίσης, με την KRED-131 παρατηρήσαμε μετατροπή 60% και αναγωγή στην 5 κετο-ομάδα μόνο, χωρίς να προχωρήσει σε αναγωγή της 3 κετο ομάδας.

Εφόσον πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η σύνθεση οπτικά ενεργών α-μεθυλο-δ-υδροξυ-β-κετο εστέρων με μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα, συνεχίσαμε στην

σύνθεση α-υποκατεστημένων-β,δ-διυδροξυ-εστέρων με χρήση κετορεδουκτασών. Στις προσπάθειες αυτές, παρατηρήσαμε ότι δεν μετατρέπεται ο υδροξυ-κετο εστέρας σε διυδροξυ-εστέρα, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεθυλομάδα στην 2-θέση, δρα παρεμποδιστικά στο σύστημα ενζυμικής αναγωγής και δεν επιτρέπει την περαιτέρω αναγωγή του.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα (όσον αφορά στην στερεοεκλεκτικότητα και στο ποσοστό μετατροπής) της ενζυμικής αναγωγής του 4-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **38**.



Σχήμα 67. Προϊόντα αναγωγής 4-μεθυλο- 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **38**

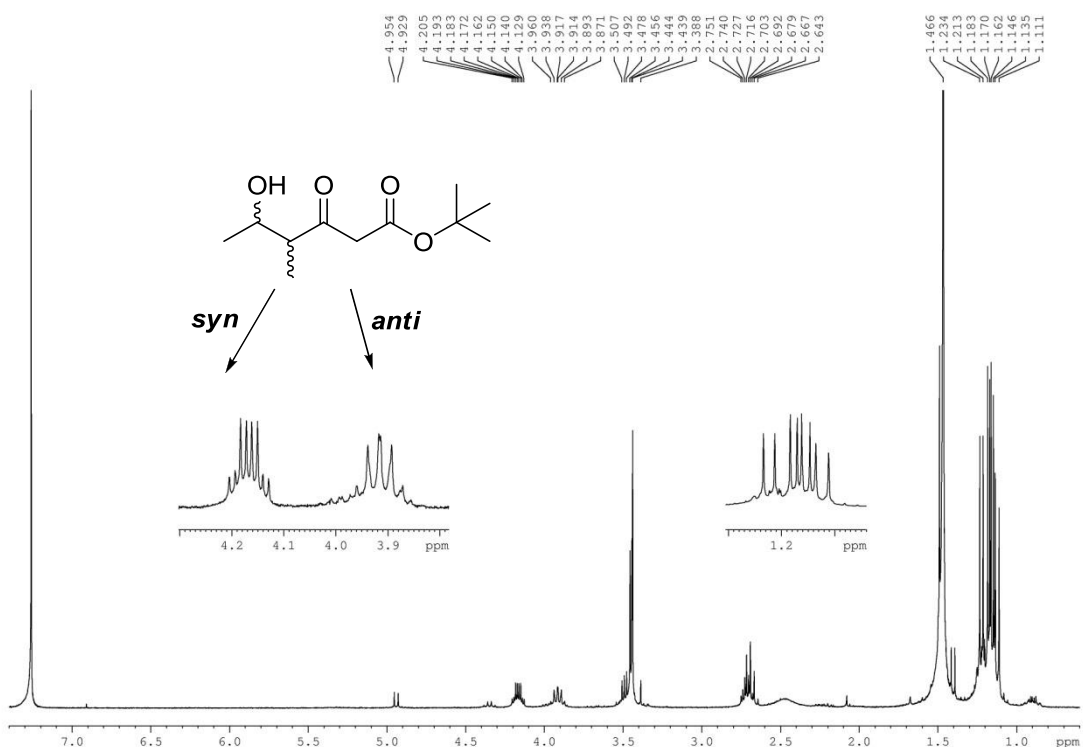
Τα πιθανά προϊόντα που μπορούν να προκύψουν από την ενζυμική αναγωγή είναι δύο *syn* **43a-b** και 2 *anti* **43c-d** υδροξυ-κετο εστέρες, *syn* και *anti* η υδροξυλομάδα στην 5 ή 3 θέση με την μεθυλομάδα στην 2 θέση. Συγκεκριμένα οι 4*R*-μεθυλο-5*S*-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **43a**, 4*S*-μεθυλο-5*R*-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **43b**, 4*S*-μεθυλο-5*S*-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **43c**, 4*R*-μεθυλο-5*R*-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **43d**, όταν πραγματοποιηθεί, δίνουν προϊόντα αναγωγής στην 5 κετο ομάδα. Ενώ, εάν η αναγωγή πραγματοποιηθεί στην 3 κετο ομάδα, τότε θα προκύψει ένας οπτικά ενεργός υδροξυ-κετο εστέρας, ο 3-υδροξυ-4-μεθυλο-5-οξο-βουτανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **44** (Σχήμα 67).

Πίνακας 2. Ενζυμική αναγωγή 4-μεθυλο-3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα

KRED	conv. (%)	<i>syn</i>		<i>anti</i>		ee %, de %	44 (yield %)
		diastereomeric ratio					
		43a	43b	43c	43d		
102	>99	4	96	-	-	92, >99	-
103	>99	4	94	-	2	90, 92	-
104	75	10	88	-	2	78, 86	-
106	>99	4	96	-	-	92, >99	-
118	83	71	29	-	-	42, >99	77
123	>99	-	-	85	15	70, >99	-
131	>99	-	-	-	-	-	95
B1F	>99	17	83	-	-	66, >99	60

Οι KRED-102, 103, 104 και 106 πραγματοποιούν αναγωγή αποκλειστικά και μόνο στην 5 κετο ομάδα, με Prelog εκλεκτικότητα. Πιο συγκεκριμένα οδηγούν στον σχηματισμό της *syn* αλκοόλης **43b** με υψηλό ποσοστό μετατροπής, βάσει ¹H NMR και αέριας χρωματογραφίας με χειρόμορφη κολώνα (GC-chiral) (βλ. Παράρτημα 2).

Οι κορυφές του καρβινολικού ¹H και του μεθυλίου στην 4 θέση, στο *syn* και στο *anti* προϊόν είναι εμφανώς διαχωρισμένες, βάσει και της ήδη δημοσιευμένης βιβλιογραφίας.²⁷ Στο Σχήμα 68 φαίνονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των *syn* και *anti* προϊόντων.



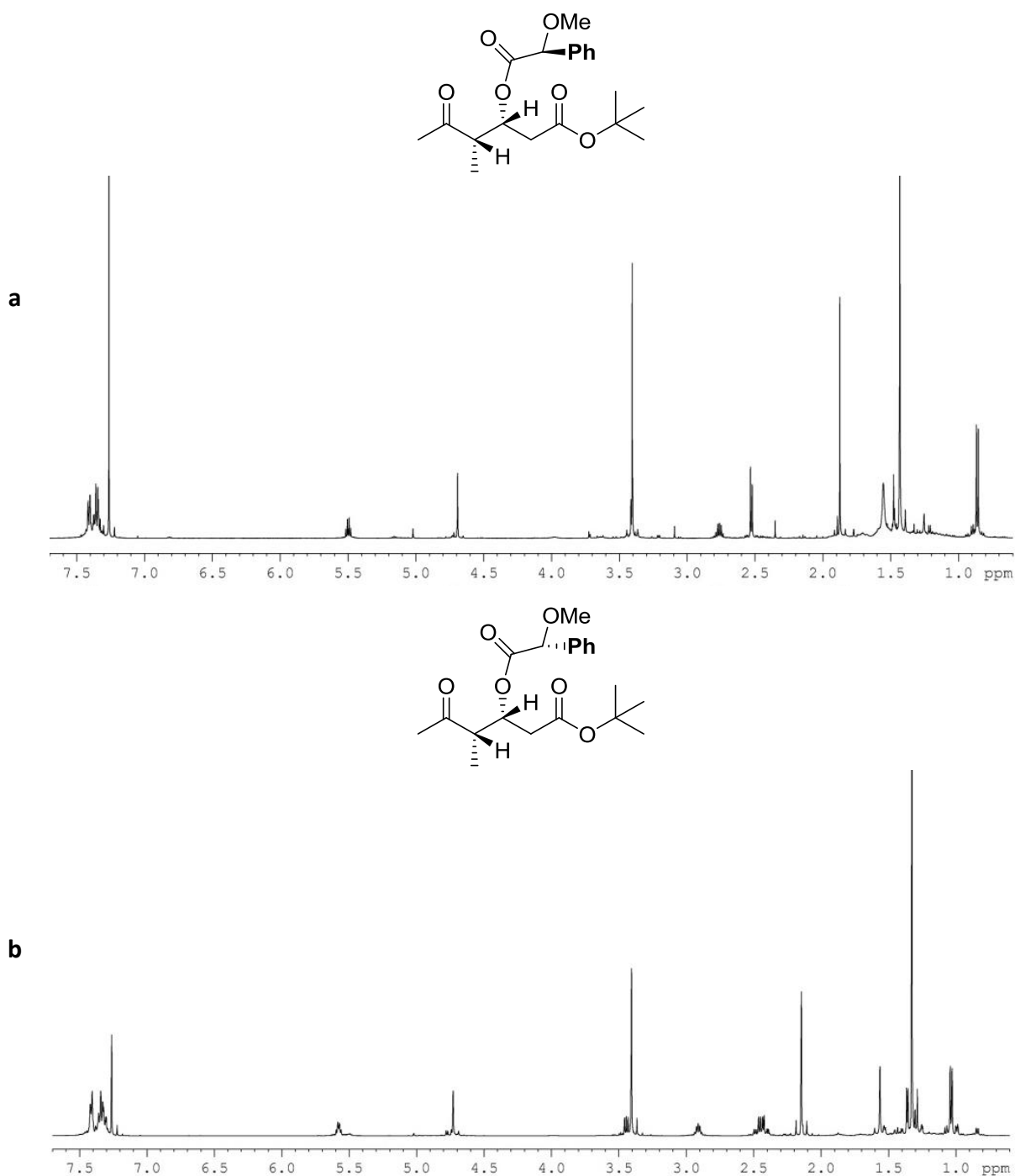
Σχήμα 68. Φάσμα ¹HNMR ρακεμικού 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-κετο εστέρα **43-rac**

Συγκεκριμένα το καρβινολικό ¹H της *syn* αλκοόλης εμφανίζεται στα 4.12-4.20 ppm και η αντίστοιχη μεθυλομάδα με μία διπλή της διπλής (dd) στα 1.14-1.18 ppm, ενώ το καρβινολικό¹H της *anti* αλκοόλης εμφανίζεται στα 3.87-3.96 ppm με την αντίστοιχη μεθυλομάδα στα 1.12 και στα 1.22 ppm με δύο διαφορετικές διπλές κορυφές.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την τοποεκλεκτικότητα τους παρουσίασαν οι KRED-118, 131 και B1F, οι οποίες πραγματοποίησαν αναγωγή στην 3 κετο ομάδα, σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με την αναγωγή στην 5 κετο ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, η KRED-118, πραγματοποίησε αναγωγή στην 5 θέση, σχηματίζοντας την *syn* αλκοόλη σε ποσοστό 23%, ενώ η αναγωγή στην 3 θέση, οδήγησε στον σχηματισμό της αλκοόλης **44** σε ποσοστό 77%, βάσει ¹HNMR, με υψηλό ποσοστό εναντιοεκλεκτικής και διαστερεοεκλεκτικής περίσσειας 71% ee και >99% de, βάσει GC-chiral.

Η KRED-131 παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό σχηματισμού αποκλειστικά της **44** αλκοόλης με υψηλό ποσοστό μετατροπής >99% και εξαιρετική οπτική καθαρότητα >99% ee και 99% de. Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί ότι η συγκεκριμένη

τοποεκλεκτική αναγωγή παρουσιάζεται για πρώτη φορά και δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις εστεροποίησης της αλκοόλης **44** με τα δυο εναντιομερή οπτικώς ενεργά οξέα, τον *S*-μεθοξυ-φαινυλο-οξικό οξύ (*S*-MPA) και τον αντίστοιχο *R* (*R*-MPA). Παρακάτω φαίνονται τα φάσματα ¹HNMR των διαστερομερών προϊόντων εστεροποίησης (Σχήμα 69).



Σχήμα 69. Φάσματα $^1\text{H NMR}$: a) εστεροποίηση του υδροξυ-κετο εστέρα **44** με τον *S*-MPA εστέρα και b) με τον *R*-MPA εστέρα

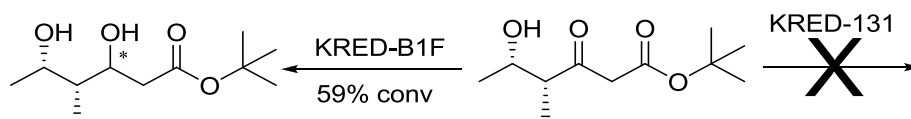
Βάσει των παραπάνω φασμάτων $^1\text{H NMR}$, από τις αντιδράσεις εστεροποίησης με τους *S*-MPA και *R*-MPA, συμπεραίνουμε ότι η αλκοόλη **44** είναι ο 3*R*-υδροξυ-4*S*-μεθυλο-

5-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας. Στο Σχήμα 69a, φαίνεται η εστεροποίηση με τον *S*-MPA εστέρα και στο Σχήμα 69b, αυτή με τον *R*-MPA εστέρα.

Παρατηρούμε λοιπόν ότι στον *S*-MPA εστέρα, προκαλείται μετατόπιση, λόγω του φαινυλίου του εστέρα, προς χαμηλότερα πεδία του καρβινολικού ^1H , από 4.3 ppm στα 5.5 ppm, και μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία της μεθυλομάδας, από 1.18 ppm στα 0.85 ppm. Στο Σχήμα b, παρατηρούμε ότι η εστεροποίηση προς τον *R*-MPA εστέρα, προκαλεί μετατόπιση του καρβινολικού ^1H , από τα 4.3 ppm στα 5.6 ppm, λόγω του φαινυλίου του εστέρα, και μετατόπιση της μεθυλομάδας από τα 1.18 ppm στα 1.04 ppm. Επίσης η σύγκριση των μετατοπίσεων στους δυο εστέρες για το καρβινολικό πρωτόνιο είναι $\Delta^{\delta R-S} > 0$, ενώ για την μεθυλενική ομάδα (C_2) $\Delta^{\delta R-S} < 0$, γεγονός που μας επιβεβαιώνει την στερεοδομή της αλκοόλης σε 3*R*-υδροξυ-4*S*-μεθυλο-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας.

Τέλος, η KRED-B1F, επίσης πραγματοποίησε αναγωγή στην 3 θέση σε ποσοστό 60% ενώ στην 5 θέση σε ποσοστό 40% προς τον σχηματισμό της *syn* αλκοόλης. Η αλκοόλη **44** σχηματίστηκε με υψηλή εναντιοεκλεκτική και διαστεροεκλεκτική περίσσεια 83%ee και >99%de.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, και δεδομένου ότι η KRED-131 και B1F πραγματοποιούν αναγωγή στην 3 θέση σε ποσοστό 60% και >99%, αντίστοιχα, δοκιμάστηκαν οι περαιτέρω ενζυμικές αναγωγές των οπτικά ενεργών υδροξυ-κετο εστέρων προς τον σχηματισμό διυδροξυ-εστέρων (Σχήμα 70). Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση με την KRED-131 δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός διυδροξυ-εστέρα, ενώ στην δεύτερη περίπτωση με την KRED-B1F παρατηρήθηκε μετατροπή προς διυδροξυ-εστέρα, 59%.



Σχήμα 70. Ενζυμική αναγωγή οπτικά ενεργών υδροξυ-κετο εστέρων προς σχηματισμό διυδροξυ-εστέρων

Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής ολοκληρώθηκε η μελέτη αναγωγής του 3,5-διοξοεξανικού τριτ-βουτυλεστέρα καθώς και οι ενζυμικές αναγωγές των α- και γ-υποκατεστημένων 3,5-διοξοεξανικών τριτ-βουτυλεστέρων προς τον σχηματισμό υδροξυ-κετο εστέρων και διυδροξυ εστέρων, σε υψηλά ποσοστά χημικής και οπτικής καθαρότητας. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν: α) τα κατάλληλα ένζυμα που πραγματοποιούν απλή και διπλή αναγωγή αλλά και β) ο συνδυασμός των κατάλληλων ενζύμων, για την απευθείας αναγωγή και των δύο καρβόνυλο-ομάδων. Από τις παραπάνω αναγωγές προέκυψε επίσης ο 3-υδροξυ-5-κετο εστέρας και ο 4-μεθυλο-3-υδροξυ-5-κετο εστέρας, δομές ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς ο τρόπος σύνθεσης τους αναφέρεται πρώτη φορά στην μέχρι πρότινος βιβλιογραφία και οι οποίες παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά εναντιοεκλεκτικής και διαστερεοεκλεκτικής περίσσειας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδροφουρανιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Επίσης στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ξηρή δισοπροπυλαμίνη, έγινε με απόσταξη δισοπροπυλαμίνης παρουσία NaOH και μοριακών κοσκίνων. Επίσης η ξηρή ακεταλδεΐδη όπου χρησιμοποιήθηκε, έγινε με απόσταξη και στην συνέχεια διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -20°C . Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.⁶²

Οι κετορεδουκτάσες ήταν της εταιρίας BioCatalytics, η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) ήταν της εταιρίας SyncoZymes και το NADPH της εταιρίας Prozomix, και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Όργανα

Τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR ελήφθησαν με φασματόμετρα 300 MHz και 500 MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμέθυλοσιλανιο (TMS) σε διαλύτη CDCl_3 . Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με τον αέριο χρωματογράφο της Shimadzu 2014 με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα Hewlett-Packard fused silica capillary column HP CHIRAL (20% permethylated beta-cyclodextrin) 30m x 0.25mm x 0.25 μm και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης UFLC της Shimadzu με ανιχνευτή UV-VIS και χειρόμορφη κολώνα Daicel Chiralcel OD column 0.46mm x 0.25cm.

Γενικές συνθετικές μέθοδοι

Αλδολική συμπύκνωση

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (5 mL) διαλύεται ξηρή δισοπροπυλαμίνη (4.4 mmol, 621 μL) και αφού ψύχεται στους 0°C σε παγόλουτρο,

προστίθεται στάγδην το BuLi 1,6M σε εξάνιο (4.4 mmol, 2.75 mL). Το μίγμα αναδεύεται για 20 λεπτά στους 0°C και στη συνέχεια ψύχεται στους -20°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος δικετοεστέρα (1.6 mmol) σε ξηρό THF και ανάδευση για 60 λεπτά. Ακολούθως το διάλυμα ψύχεται περαιτέρω στους -78°C και προστίθεται διάλυμα ξηρού THF που περιέχει αλδεΐδη (3 mmol) και το μίγμα αναδεύεται έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το οποίο ανιχνεύεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), ενώ η θερμοκρασία παραμένει στους -78°C.

Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και 2 εκχυλίσεις του μίγματος με EtOAc. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με MgSO₄ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με χρωματογραφία στήλης (Hex/EtOAc, v/v, 5/1).

Αντίδραση οξείδωσης αλκοολών με Jones (διάλυμα CrO₃ σε διάλυμα θειϊκού οξέος)

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύεται η αλκοόλη (0.5 mmol) σε 2.5 mL ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0°C με παγόλουτρο και τίθεται υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται προσθήκη σταγόνων του αντιδραστήριου Jones (180 μL), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε 0.5 mL ακετόνης, οπότε το διάλυμα θα χρωματιστεί αρχικά καστανοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Jones προστίθεται στάγδην στους 0°C στο διάλυμα της αλκοόλης έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC).

Η απομόνωση του προϊόντος γίνεται ως εξής: Το διάλυμα αραιώνεται στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8). Στη συνέχεια εκχυλίζεται 2 φορές με Et₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄. Ακολουθεί διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση.

Αντίδραση αναγωγής κετόνης με NaBH₄

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε 10 mL άνυδρης αιθανόλης προστίθενται 0.098 mmol NaBH₄. Στους 0°C και σε διάρκεια 5 λεπτών προστίθενται στάγδην 0.3 mmol

δικετοεστέρα ή υδροξυ-κετο εστέρα διαλυμένα σε 5 mL άνυδρης αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 2-4 ώρες στους 0°C, ελέγχοντας την πρόοδο της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται αργά στους 0°C περίπου 1 mL κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Κατόπιν προστίθενται 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 6/1). Απόδοση 70 – 80%.

Ενζυμική αναγωγή δικετοεστέρα ή υδρόξυ-κετο εστέρα

Σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH=6.9) προστίθενται υπόστρωμα δικετοεστέρα ή υδροξυ-κετο εστέρα (25 mM), κετορεδουκτάση (2 mg/mL), NADPH (2.5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Η αντίδραση επωάστηκε στους 37°C και ο έλεγχος αυτής γίνεται, ανάλογα με την κετορεδουκτάση, κάθε 1 ώρα ή μετά από 24 ώρες, με αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc.

Εστεροποίηση υδρόξυ-κετο εστέρων (ρακεμικών και οπτικά καθαρών) με οξικό ανυδρίτη

Σε υπόστρωμα υδρόξυ-κετο εστέρα (25mM) διαλυμένο σε 1 mL ξηρό CH₂Cl₂ στους 0°C, προστίθεται οξικός ανυδρίτης (30μL) και καταλυτική ποσότητα tert-butylidimethylsilyltrifluormethansulfonat (TBDMSOTF) (1μL). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι το πέρας της, το οποίο διαπιστώνεται με αέριο χρωματογράφο μετά από αραίωση του μίγματος με EtOAc και 2 εκχυλίσεις του μίγματος με διάλυμα υδροχλωρίου.

Σύνθεση των MPA εστέρων

Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1mmol), σε άνυδρο CH₂Cl₂, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC(0.11 mmol, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmol, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 90%.

Σύνθεση Υποστρωμάτων και Ενζυμικές Αναγωγές

Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο-βουτανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με αλκυλίωση 46

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ο3-οξο-βουτανοϊκός τριτβουτυλεστέρας **45** (2 g, 6.3 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (10 mL) και προξηραμένο ανθρακικό κάλιο (968 mg, 7mmol) προστέθηκε στο διάλυμα. Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν, σε διάρκεια 2 λεπτών, το μεθυλοιωδίδιο (440 μL, 7mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά από συμπύκνωση του μίγματος, προστέθηκε αιθέρας (10 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό, για την απομάκρυνση των αλάτων και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση >99% (1.145 g) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

¹HNMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.27 (d, 3H, J = 7 Hz), 1.45 (s, 9H), 2.22 (s, 3H) και 3.39 (q, 1H, J = 7 Hz).

¹³C NMR (125 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 12.59, 27.83 (3C), 28.34, 54.64, 81.72, 169.70 και 204.10.

Σύνθεση του 2-μεθυλο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με αλδολική συμπύκνωση 42-rac

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (5 mL) διαλύθηκε ξηρή διισοπροπυλαμίνη (6.7 mmol, 944 μ L) και αφού ψύχθηκε στους 0°C σε παγόλουτρο, προστέθηκε στάγδην το BuLi 1,6M σε εξάνιο (6.7 mmol, 4.4 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά στους 0°C και στη συνέχεια ψύχθηκε στους -20°C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 2-μεθυλο-3-οξο-βουτανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **46** (2,9mmol, 500mg) σε ξηρό THF και ανάδευση για 60 λεπτά. Ακολούθως το διάλυμα ψύχθηκε περαιτέρω στους -78°C και προστέθηκε διάλυμα ξηρού THF που περιείχε ξηρή ακεταλδεΐδη (4.35 mmol, 255 μ L) και το μίγμα αναδεύτηκε έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ανιχνεύτηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), ενώ η θερμοκρασία παρέμεινε στους -78°C. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένο NH₄Cl και 2 εκχυλίσεις του διαλύματος με EtOAc. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO₄ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 30/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 70% (439 mg).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.19 (dd, 3H, J = 6.3 Hz), 1.28 (dd, 3H, J = 7.2 Hz), 1.44 (s, 9H), 2.52-2.78 (m, 2H), 2.97 (brs, 1H), 3.41 (q, 1H, J = 7.2 Hz) και 4.21-4.25 (m, 1H).

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 13.87, 24.13, 27.88 (3C), 50.32, 81.58, 98.72, 170.07, 189.09 και 193.04.

Σύνθεση του 2-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με οδείδωση Jones 37

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύθηκε ο ρακεμικός 2-μεθυλο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **42-rac** (0,46mmol, 100 mg) σε 2,5 mL ακετόνης και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0°C με παγόλουτρο και τέθηκε υπό ανάδευση. Κατόπιν έγινε η προσθήκη σταγόνων του αντιδραστηρίου Jones (167 μ L), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε 0,5 mL ακετόνης, οπότε το διάλυμα χρωματίστηκε αρχικά καστανοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Jones προστίθεται στάγδην στους 0°C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC). Η απομόνωση του προϊόντος έγινε ως εξής: Το διάλυμα αραιώθηκε στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8. Στη

συνέχεια εκχυλίστηκε 2 φορές EtOAc. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄. Ακολούθησε διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 82% (83 mg).

Στη συνέχεια ελήφθησαν τα φάσματα NMR της κετόνης, όπου στο φάσμα ¹H NMR παρατηρήθηκαν κυρίως τα πρωτόνια της ενολικής μορφής της κετόνης.

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.34 (d, 3H, J = 7.5 Hz), 1.45 (s, 9H), 3.27 (q, 1H, J = 7.5 Hz) και 5.57 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 12.40, 12.47, 22.30, 22.35, 27.85 (3C), 49.25, 49.47, 54.32, 54.35, 63.78, 63.89, 82.05, 169.30 και 207.24.

Ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με KRED-102

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 2-μεθυλο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με την κετορεδουκτάση 102 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mg υποστρώματος (25 mM) σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης (100 mM), 2mg ενζύμου KRED-102 (2mg/mL), 2mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (2mg/mL) και 2mg αναγωγικού NADPH (2.5 mM). Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37°C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.2 (d, 3H, J = 6.3 Hz), 1.29 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 1.46 (s, 9H), 2.53-2.80 (m, 2H), 3.42 (q, 1H, J = 7.2 Hz) και 4.18-4.29 (m, 1H).

Ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με KRED-118

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 2-μεθυλο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με την κετορεδουκτάση 118 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο

ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mg υποστρώματος (25 mM) σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης (100 mM), 2mg ενζύμου KRED-118 (2mg/mL), 2mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (2mg/mL) και 2mg αναγωγικού NADPH (2.5 mM). Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37°C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.2 (d, 3H, J = 6.3 Hz), 1.29 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 1.46 (s, 9H), 2.53-2.80 (m, 2H), 3.42 (q, 1H, J = 7.2 Hz) και 4.18-4.29 (m, 1H).

Σύνθεση του 3-οξο-πεντανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με μετεστεροποίηση 48

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρή τριτ-βουτανόλη (10mL) διαλύθηκε 3-οξο-πεντανοϊκός μεθυλεστέρας **47** (5.4 mmol, 700 mg) και 10% δι-βουτυλο-οξείδιο του κασσιτέρου (Bu₂SnO) (0.54 mmol, 135 mg). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη υδατικού διαλύματος Na₂CO₃ 10% (5 mL) και 2 εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλεστέρα. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και φιλτράρισμα από celite. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 50/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 50% (465 mg).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.06 (t, 3H), 1.45 (s, 9H), 2.53 (q, 2H, J = 7.2 Hz) και 3.33 (s, 2H).

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 7.55, 27.94 (3C), 36.14, 50.34, 81.83, 166.56 και 203.85.

Σύνθεση του 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με αλδολική συμπύκνωση 45-rac

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (5 mL) διαλύθηκε ξηρή δισοπροπυλαμίνη (6.6 mmol, 935 μL) και αφού ψύχθηκε στους 0°C σε παγόλουτρο, προστέθηκε στάγδην το BuLi 1,6M σε εξάνιο (6.6 mmol, 4.4 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για

20 λεπτά στους 0°C και στη συνέχεια ψύχθηκε στους -20°C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 3-οξο-πεντανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **48** (3mmol, 522mg) σε ξηρό THF και ανάδευση για 60 λεπτά. Ακολούθως το διάλυμα ψύχθηκε περαιτέρω στους -78°C και προστέθηκε διάλυμα ξηρού THF που περιείχε ξηρή ακεταλδεΐδη (4.5 mmol, 253 μL) και το μίγμα αναδεύτηκε έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ανιχνεύτηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), ενώ η θερμοκρασία παρέμεινε στους -78°C. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένο NH₄Cl και 2 εκχυλίσσεις του διαλύματος με EtOAc. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO₄ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 70/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 50% (325mg).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.12 (d, 3H-syn, J = 7.2 Hz), 1.16 (d, 3H-anti, J = 7.2 Hz), 1.17 (d, 3H-anti, J = 6.3 Hz), 1.22 (d, 3H-anti, J = 6.3 Hz), 1.47 (s, 9H), 2.37-2.75 (m, 1H και 1-OH), 3.38-3.50 (m, 3H), 3.87-3.97 (m, 1H-anti) και 4.13-4.20 (m, 1H-syn).

¹³C NMR (125 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 9.77, 13.52, 19.86, 20.90, 27.95(3C), 49.81, 50.40, 51.75, 53.51, 67.23, 69.70, 82.21, 166.47 και 207.93.

Σύνθεση του 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με οξειδωση Jones **38**

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύθηκε ο ρακεμικός 4-μεθυλο-5-υδροξύ-3-οξο-εξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας **43-rac** (0,46mmol, 100 mg) σε 2,5 mL ακετόνης και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0°C με παγόλουτρο και τέθηκε υπό ανάδευση. Κατόπιν έγινε η προσθήκη σταγόνων του αντιδραστήριου Jones (167 μL), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε 0,5 mL ακετόνης, οπότε το διάλυμα χρωματίστηκε αρχικά καστανοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Jones προστίθεται στάγδην στους 0°C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC). Η απομόνωση του προϊόντος έγινε ως εξής: Το διάλυμα αραιώθηκε στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8. Στη συνέχεια εκχυλίστηκε 2 φορές EtOAc. Η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄. Ακολούθησε διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 91% (90mg).

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.33 (d, 3H, J = 7 Hz), 1.45 (s, 9H), 2.21 (s, 3H), 3.42-3.43 (m, 2H) και 3.85 (q, 1H, J = 7 Hz).

¹³C NMR (75 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 12.50, 27.89 (3C), 28.56, 49.11, 60.80, 82.35, 166.17, 200.26 και 204.89.

Ενζυμική αναγωγή του 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με KRED-102

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-οξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με την κετορεδουκτάση 102 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mg υποστρώματος (25 mM) σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης (100 mM), 2mg ενζύμου KRED-102 (2mg/mL), 2mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (2mg/mL) και 2mg αναγωγικού NADPH (2.5 mM). Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37°C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.16 (t, 6H), 1.46 (s, 9H), 2.51 (br s, 1H), 2.68-2.73 (m, 1H), 3.45 (q, 2H, J = 15.5 Hz) και 4.14-4.19 (m, 1H).

Ενζυμική αναγωγή του 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με KRED-131

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 4-μεθυλο-3-υδροξυ-5-οξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα με την κετορεδουκτάση 131 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mg υποστρώματος (25 mM) σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης (100 mM), 2mg ενζύμου KRED-131 (2mg/mL), 2mg αφυδρογονάση της γλυκόζης (2mg/mL) και 2mg αναγωγικού NADPH (2.5 mM). Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37°C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): 1.16 (d, 3H, J = 7.5 Hz), 1.46 (s, 9H), 2.22 (s, 3H), 2.34-2.43 (m, 2H), 2.64-2.69 (m, 1H), 3.31 (br s, 1H) και 4.29 (m, 1H).

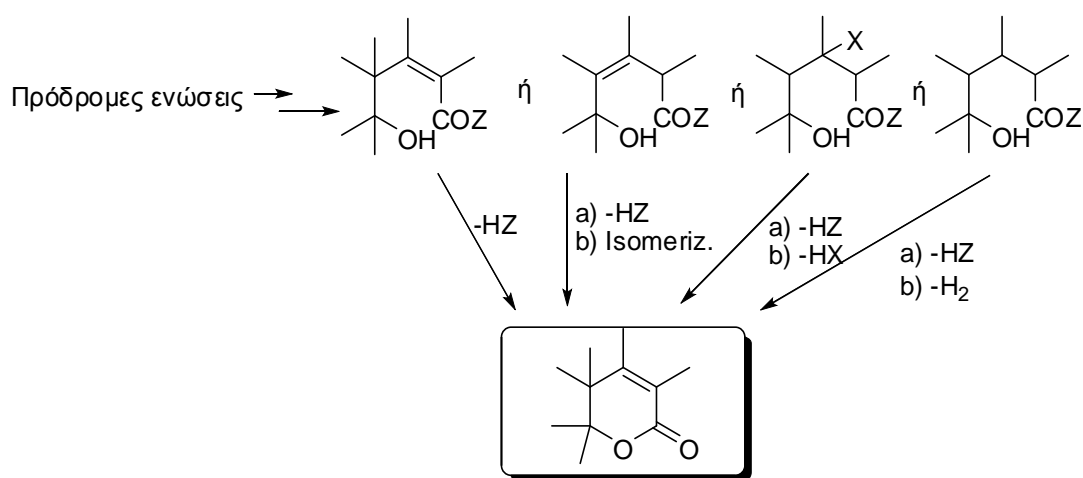
Β' ΚΕΦΑΛΑΙΟ

3.1 Λακτόνες

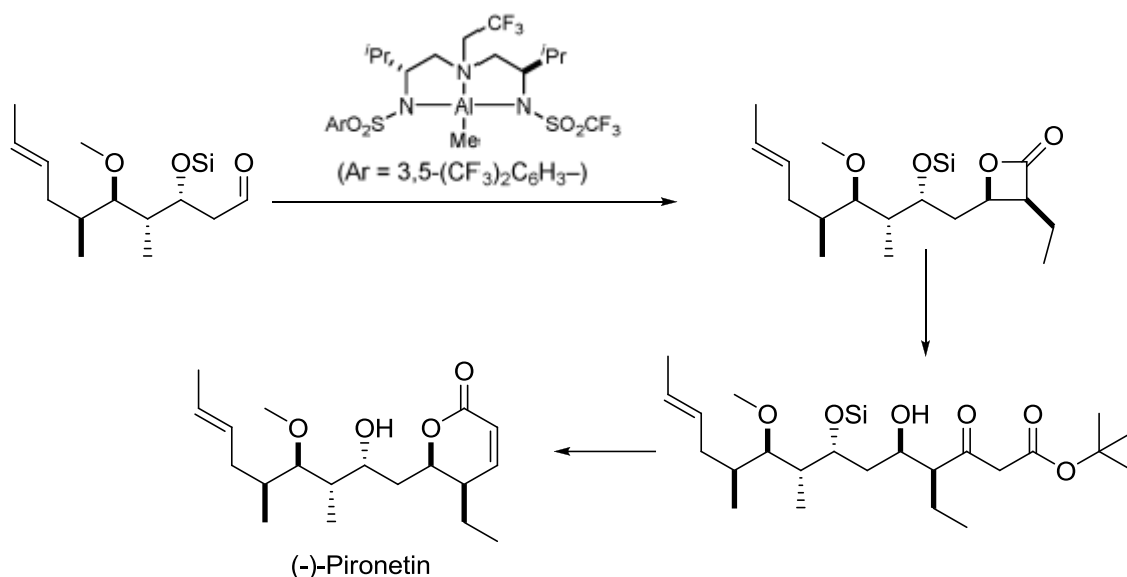
Οι λακτόνες είναι κυκλικοί εστέρες των αντίστοιχων υδροξυ-οξέων. Οι λακτονικοί δακτύλιοι περιέχονται σαν δομικές μονάδες σε πολλά φυσικά προϊόντα, που εμφανίζουν πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Γι'αυτό το λόγο αποτελούν δομές με μεγάλο ενδιαφέρον για τους συνθετικούς χημικούς ιδιαίτερα για τον φαρμακευτικό κλάδο. Πιο συγκεκριμένα, οι 5,6-διυδρο-2-πυρανόνες, λακτονικοί δακτύλιοι που περιέχουν ένα διπλό δεσμό σε α-θέσηως προς την καρβονυλική ομάδα, είναι φυσικά ή συνθετικά υποστρώματα τα οποία παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα.⁶³ Επιπλέον, παρεμποδίζουν την HIV πρωτεάση, προκαλούν απόπτωση και έχουν δείξει δράση ενάντια στην λευχαιμία. Κάποιες από τις αναφερόμενες ιδιότητες συνδεόνται με το γεγονός ότι μπορούν να δράσουν ως δέκτες κατά Michael, λόγω του συζευγμένου διπλού δεσμού του δακτυλίου. Πολλές μέθοδοι υπάρχουν στην βιβλιογραφία για την δημιουργία τέτοιων δακτυλίων, ορισμένες εκ των οποίων θα αναφερθούν στη συνέχεια.

3.1.1 Λακτονοποίηση υποκατεστημένων δ-υδροξυ-οξέων

Όταν το δ-υδροξυ οξύ περιλαμβάνει ήδη συζευγμένο Z διπλό δεσμό, το τελικό προϊόν, μετά την κυκλοποίηση έχει την επιθυμητή δομή. Εάν ο διπλός δεσμός δεν περιλαμβάνεται, αλλά ένα αλογόνο συνδέεται στον β άνθρακα, η αποβολή του υδραλογόνου από τον ενδιάμεσο λακτονικό δακτύλιο κάτω από ήπιες συνθήκες, αποδίδει τον επιθυμητό διπλό δεσμό (Σχήμα 71).⁶³



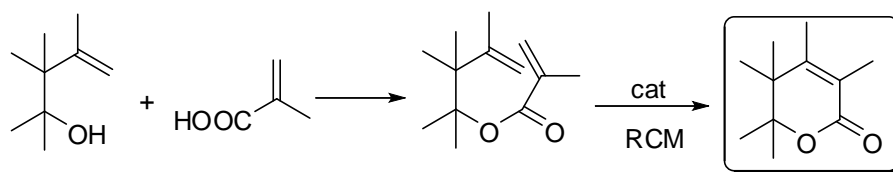
Πιο διαδεδομένη και εύχρηστη μέθοδος για τον σχηματισμό λακτονικών δακτυλίων απαιτεί έναν υδροξυ-κετο εστέρα, όπου πραγματοποιείται υδρόλυση του εστέρα και ενδομοριακή εστεροποίηση μεταξύ του οξέος και της ομάδας υδροξυλίου, ακολουθούμενη από αφυδάτωση του υδροξυλίου στην β-θέση και ενός υδρογόνου στην γ-θέση για την δημιουργία του διπλού δεσμού. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσιάστηκε παρακάτω από τον Nelson και τους συνεργάτες του, το 2006, στη σύνθεση του φυσικού προϊόντος (-)-pironetin, ενός φαρμάκου το οποίο είναι ισχυρός αναστολέας στην σύνθεση της τουμπουλίνης, αναστέλλοντας την δράση της (Σχήμα 72).⁶⁴ Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η ταξόλη ή το tasetaxel έχουν επίσης σαν στόχο τις τουμπουλίνες.



Σχήμα 72. Σύνθεση (-)-pironetin

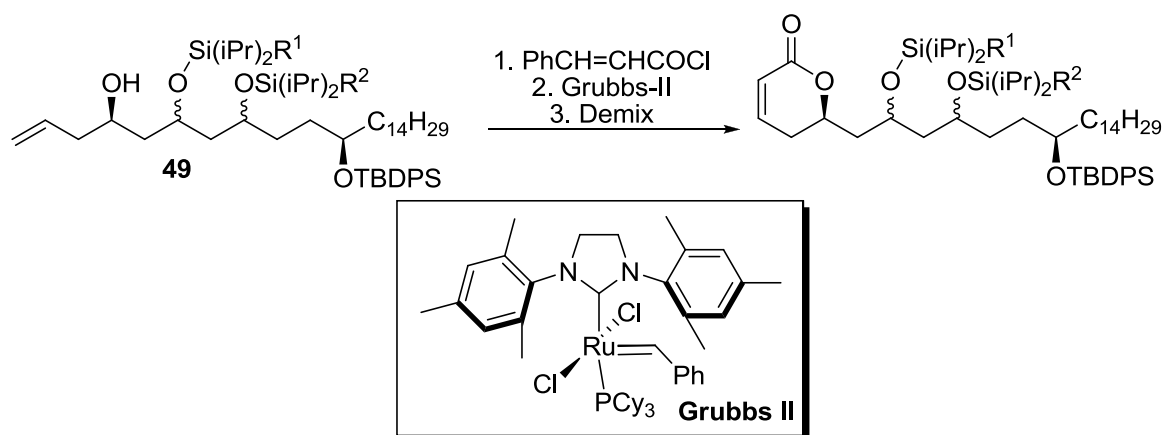
3.1.2 Κλείσιμο του δακτυλίου με μετάθεση RCM

Η καταλυόμενη ολεφινική μετάθεση (Ring Closing Metathesis) από μέταλλο μετάπτωσης, είναι μια μέθοδος ιδιαίτερα χρήσιμη τα τελευταία 20 χρόνια στη σύνθεση λακτονών (Σχήμα 73). Στην περίπτωση των 5,6-διυδρο-2-πυρανόνων, ετεροκυκλικών δηλαδή συστημάτων, η RCM χρησιμοποιείται ευρέως.



Σχήμα 73. Δημιουργία λακτονικού δακτυλίου με καταλυόμενη ολεφινική μετάθεση

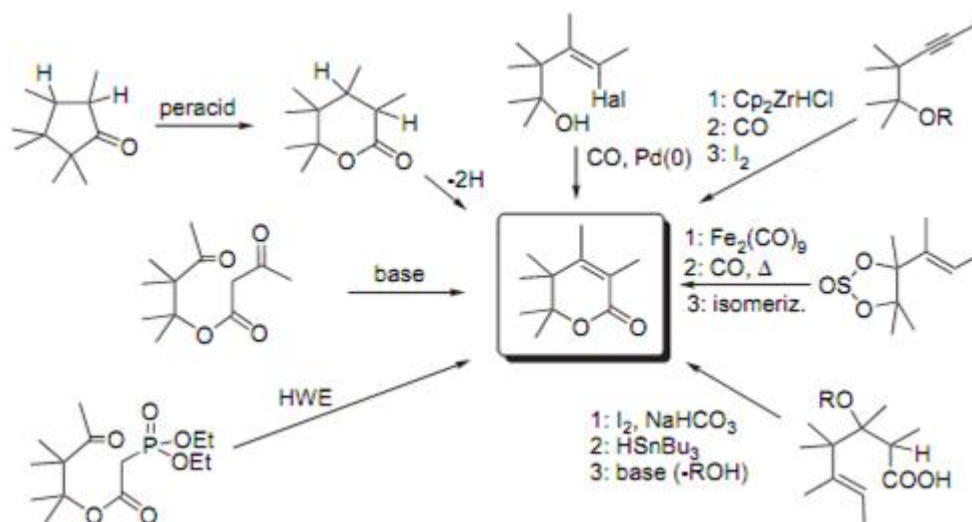
Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η σύνθεση των φυσικών προϊόντων passifloricins, από την ομάδα του Curran το 2006 (Σχήμα 74). Συγκεκριμένα στο οπτικά ενεργό αλκένιο **49**, πραγματοποιήθηκε κατεργασία με 3-φαιnyλο-ακρυλοϊλοχλωριδίο (cinnamoyl chloride) και στην συνέχεια κλείσιμο και δημιουργία του δακτυλίου με καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς.⁶⁵



Σχήμα 74. Σύνθεση passifloricins με δημιουργία λακτονικού δακτυλίου μέσω ολεφινικής μετάθεσης.

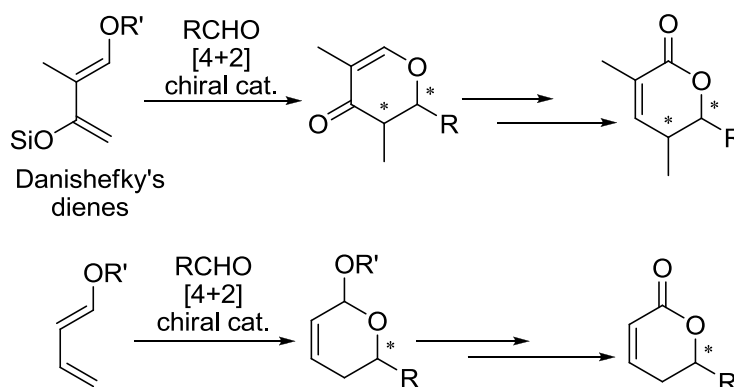
3.1.3 Κλείσιμο του δακτυλίου με διάφορες μεθόδους

Υπάρχουν επίσης μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν ενδομοριακή ολεφινοποίηση Horner-Wadsworth-Emmons, αντιδράσεις Baeyer-Villiger, αλογονο-λακτονοποίηση, κυκλοπροσθήκες και διαμοριακές αλδολικές αντιδράσεις. Οι παραπάνω μέθοδοι απαιτούν διαφορετικά εναρκτήρια υποστρώματα, διαφορετικών τύπων και οδηγούν στον σχηματισμό διαφορετικών προϊόντων (Σχήμα 75).⁶⁶



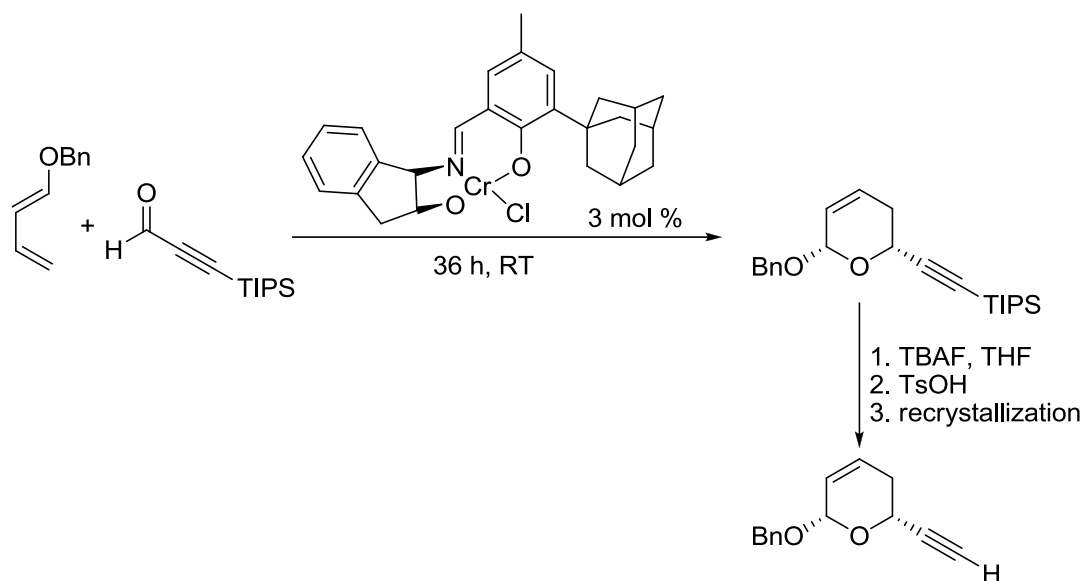
Σχήμα 75. Διάφορες μεθοδολογίες κυκλοποίησης και δημιουργίας λακτονικού δακτυλίου

Η ολεφινοποίηση Horner-Wadsworth-Emmons οδηγεί στον σχηματισμό 5,6-διυδρο-2-πυρανονών, ενώ η αντίδραση Baeyer-Villiger, οδηγεί στο σχηματισμό τετραϋδρο-2-πυρανονών, δηλαδή ετεροκυκλικών εξαμελών δακτυλίων με ετεροάτομο ένα άτομο οξυγόνου. Ασύμμετρη κυκλοπροσθήκη [4+2] οδηγεί στον σχηματισμό οπτικά καθαρών πυρονών (Σχήμα 76).⁶⁷



Σχήμα 76. [4+2] κυκλοπροσθήκη προς το σχηματισμό πυρονών

Πιο συγκεκριμένα στο παρακάτω Σχήμα παρουσιάζεται μέρος από την σύνθεση του φυσικού προϊόντος fostriecin (CI-920), ενός αντικαρκινικού φαρμάκου (Σχήμα 77).⁶⁷



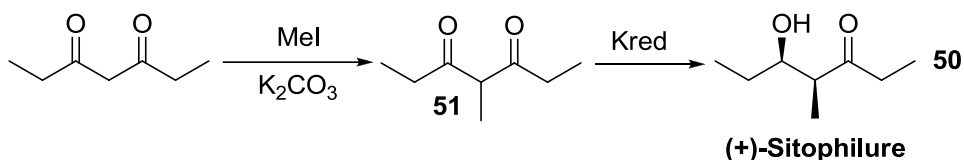
Σχήμα 77. Εισαγωγή στερεογονικού κέντρου στο λακτονικό δακτύλιο με χρήση χειρόμορφου αντιδραστηρίου

Οι 5,6-διυδρο-2-πυρανόνες που περιέχονται σε φυσικά προϊόντα, συνήθως περιέχουν ένα στερεογονικό κέντρο. Η εισαγωγή του στερεογονικού κέντρου, σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορεί να γίνει είτε από το αρχικό υπόστρωμα, είτε από χειρόμορφα υδροξυ-οξέα, χειρόμορφα εποξειδία, ή χειρόμορφα ενδιάμεσα. Σε άλλες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται μονοσακχαρίτες σαν χειρόμορφα πρόδρομα υποστρώματα.

3.2 Σύνθεση φυσικών προϊόντων με χρήση κετορεδουκτασών

Το 2006, η ερευνητική ομάδα μας, παρουσίασε τη χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης (+)-sitophilure **50** με την χρήση απομονωμένων NADPH εξαρτώμενων κετορεδουκτασών.⁶⁸ Το στάδιο «κλειδί» για αυτή τη σύνθεση είναι η στερεοεκλεκτική αναγωγή του πρόδρομου υποστρώματος, 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη (**51**) από απομονωμένη, NADPH εξαρτώμενη, κετορεδουκτάση, παρουσία του ανακυκλωτικού συστήματος γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης (Σχήμα 78). Η φερομόνη αυτή έχει απομονωθεί από εκατοντάδες έντομα του γένους *Sitophilusoryzae* L. και *Sitophiluszeamais* M. οι οποίες προκαλούν μεγάλες ζημιές σε αραβόσιτα, ρύζι και σιτηρά. Η γρήγορη ανίχνευση της παρουσίας αυτών των εντόμων σε αποθήκες,

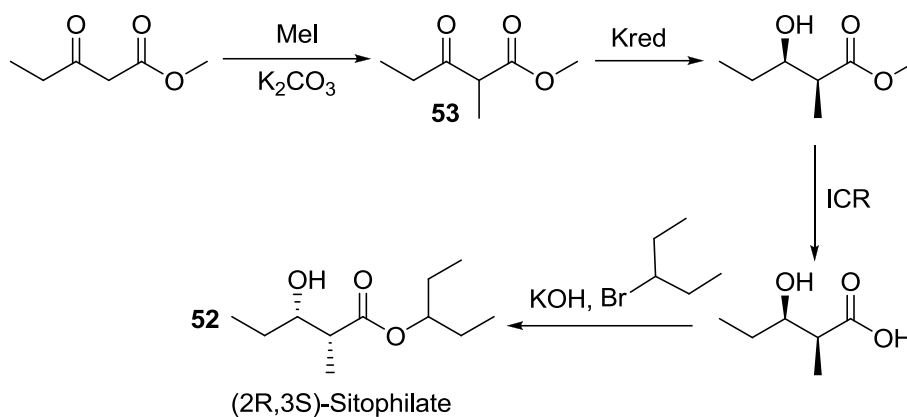
προλαμβάνει μεγάλες οικονομικές καταστροφές. Οι παγίδες που χρησιμοποιούνται συνήθως βασίζονται στο φαγητό τους, ενώ μία παγίδα, η οποία θα περιέχει την φερομόνη αυτών των εντόμων είναι πιο ασφαλής και πιο αποτελεσματικός τρόπος για την απομάκρυνση τους από τα σιτηρά.



Σχήμα 78. Χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης (+)-sitophilure

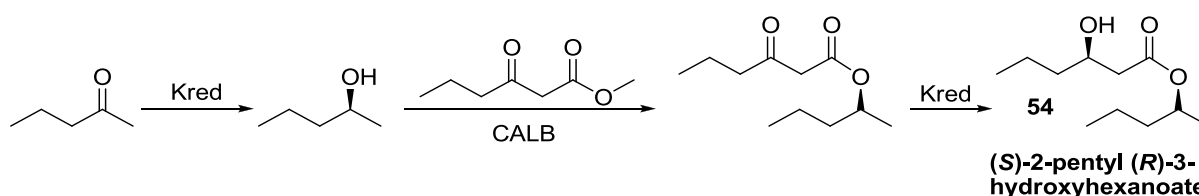
Την επόμενη χρονιά, το 2007, δημοσιεύτηκε η χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης sitophilate (**52**),⁶⁹ η οποία εκκρίνεται από έντομα του γένους *Sitophilus granarius*, οι οποίες καταστρέφουν αποθήκες δημητριακών. Παρόλο που τα δημητριακά διατηρούνται σε ξηρές συνθήκες και χαμηλές θερμοκρασίες, τα συγκεκριμένα έντομα καταφέρνουν να αναπτύξουν, σε διάφορα σημεία των σιλό (κυλινδρικές αποθήκες σιτηρών), ιδανικές συνθήκες υγρασίας για την επιβίωση τους, μέσω των μεταβολικών τους δραστηριοτήτων. Η σύνθεση της φερομόνης πραγματοποιήθηκε, ξεκινώντας από τον α-μεθυλο-β-κετο εστέρα **53** με χημειοενζυμική ασύμμετρη σύνθεση και καταλύτη κετορεδουκτάση (Σχήμα 79).

Στην σύνθεση της Sitophilate υπάρχουν δύο στάδια κλειδιά, μια ενζυμική αναγωγή με κετορεδουκτάση ακολουθούμενη από μια ενζυμική υδρόλυση με λιπάση ICR.



Σχήμα 79. Χημειοενζυμική σύνθεση sitophilate

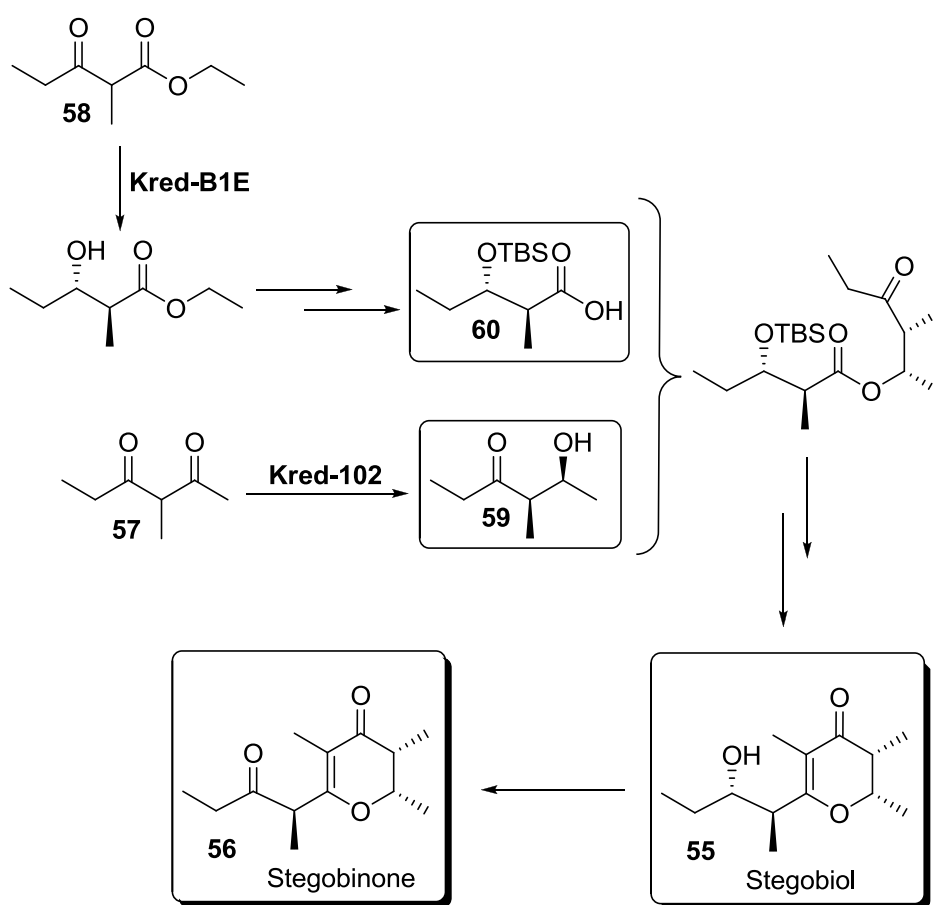
Το 2011, η ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε τη σύνθεση ενός πτητικού αρωματικού εστέρα, του 3-υδροξυ-επτανικού 2-πεντυλο εστέρα (**54**) (Σχήμα 80).⁷⁰ Οι πτητικοί εστέρες εκκρίνονται από πολλά φρούτα και λαχανικά και προσελκύουν έντομα. Για την απομάκρυνση αυτών των εντόμων από σπίτια, εστιατόρια, αγορές και γενικά όπου υπάρχουν φρούτα και λαχανικά, χρησιμοποιούνται παγίδες για την προσέλκυση τους. Οι πτητικοί εστέρες όχι μόνο προσελκύουν άλλα έντομα, αλλά και απομακρύνουν με σκοπό την προστασία από παθογόνους παράγοντες. Η σύνθεση του εστέρα πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια, με δύο στάδια «κλειδιά». Μια ενζυμική αναγωγή, με χρήση κετορεδοκτασών για την επιθυμητή στερεοδομή του εστέρα, και μια ενζυμική μετεστεροποίηση με λιπάση *Candida antractica* (CAL B).



Σχήμα 80. Χημειοενζυμική σύνθεση πτητικού εστέρα (S)-2-υδροξυ-(R)-3-εξανοϊκού πεντυλεστέρα

Πιο πρόσφατα, το 2012, δημοσιεύτηκε η σύνθεση των φυσικών φερομονών stegobiol **55** και stegobinone **56** του σκαθαριού *Stegobium raniceum*, όπως είναι γνωστό (Σχήμα 81).⁷¹ Τα συγκεκριμένα σκαθάρια είναι πολύ γνωστά, λόγω της ζημιάς που

προκαλούν σε ξύλινες κατασκευές και αποθηκευμένα προϊόντα. Το συναντάμε σε ζεστά κλίματα και τρέφεται με οτιδήποτε φαγητό ή καρύκευμα υπάρχει σε ένα σπίτι, επίσης με μαλλί, δέρμα, κέρας, μουσειακά δείγματα και φάρμακα. Οι ζημιές που προκαλούν έχουν τεράστιο οικονομικό κόστος. Το στάδιο κλειδί για την σύνθεση αυτών των τόσο σημαντικών δομών, είναι η ενζυμική αναγωγή μιας α-μεθυλο-1,3-δικετόνης **57** προς την αλκοόλη **59** και ενός α-μεθυλο-β-κετο εστέρα **58** προς το προστατευμένο οξύ **60**, με την χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών.

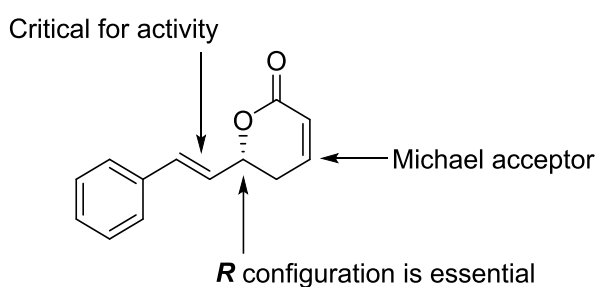


Σχήμα 81. Χημειοενζυμική σύνθεση των stegobinone και stegobiol

3.3(R)-Goniothalamine

Η (R)-goniothalamine έχει δομή α,β-ακόρεστης δ-λακτόνης και απομονώθηκε το 1967 από τους Hlubucek και Robertson από τον ξηρό φλοιό του φυτού *Cryptocarya caloneura*, αλλά αργότερα απομονώθηκε και από άλλα είδη *Cryptocarya moschata* και

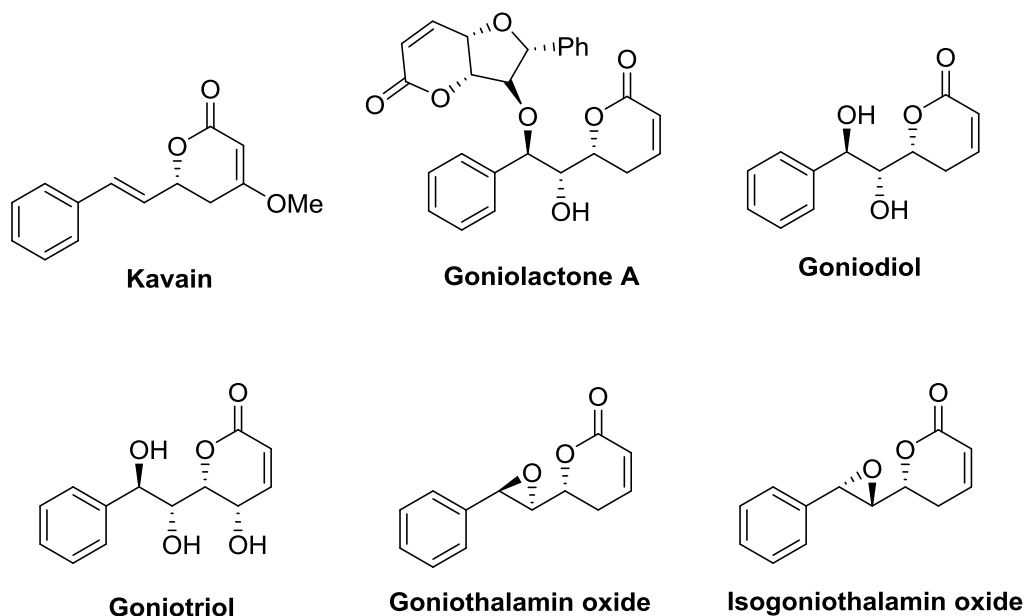
Bryonopsis laciniosa του γένους *Goniothalamus* της οικογένειας φυτών Annonaceae, τα οποία ευδοκούν σε τροπικά δάση της Αφρικής, Ασίας και Ωκεανίας (εξαιρουμένης της Αυστραλίας και της Νέας Ζηλανδίας). Αρχικά αποδόθηκε *S* στερεοδομή, αλλά από μετέπειτα μελέτες αναθεωρήθηκε και επιβεβαιώθηκε η *R* στερεοδομή του φυσικού προϊόντος. Πολλά φυσικά προϊόντα περιέχουν μονάδα λακτόνης και παρουσιάζουν αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση σε μια μεγάλη ποικιλία θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και μυκήτων. Οι λακτονικοί δακτύλιοι που περιέχουν οπτικά ενεργό κέντρο, αποτελούν δομικές μονάδες σε ένα μεγάλο φάσμα φερομονών, φαρμακευτικών και φυσικών προϊόντων, με αντι-HIV και αντικαρκινική δράση. Τέτοιου είδους ετεροκυκλικοί δακτύλιοι παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ενδιαφέρουσας βιολογικής δραστηριότητας που παρουσιάζουν. Η (*R*)-goniothalamine, η πιο αντιπροσωπευτική λακτόνη του γένους *Goniothalamus*, παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες, ενάντια στον καρκίνο του τραχήλου, τον γαστρικό, του μαστού, την λευχαιμία και τον καρκίνο των ωοθηκών εμφανίζοντας κυτταροτοξική δράση ενάντια στους όγκους, λόγω της απόπτωσης που παρουσιάζει σε καρκινικές σειρές κυττάρων και αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες, γι'αυτό και κατατάσσεται στα antiproliferative agents, όπως και το Tamoxifen. Πολλές από αυτές τις βιολογικές δραστηριότητες οφείλονται στην ικανότητα του μορίου να δρα ως δέκτης Michael, εφόσον από τον διπλό δεσμό του λακτονικού δακτυλίου μπορούν να προκύψουν μεγαλύτερα μόρια δραστηρότερα από το αρχικό (Σχήμα 82).



Σχήμα 82. (*R*)-goniothalamine

Τα τελευταία χρόνια η (*R*)-goniothalamine προσελκύει το ενδιαφέρον των συνθετικών οργανικών χημικών, αφού από αυτήν προέρχονται πολλά φυσικά προϊόντα με ανάλογες ιδιότητες, όπως φαίνονται και στο παρακάτω Σχήμα. Αυτά τα μικρού

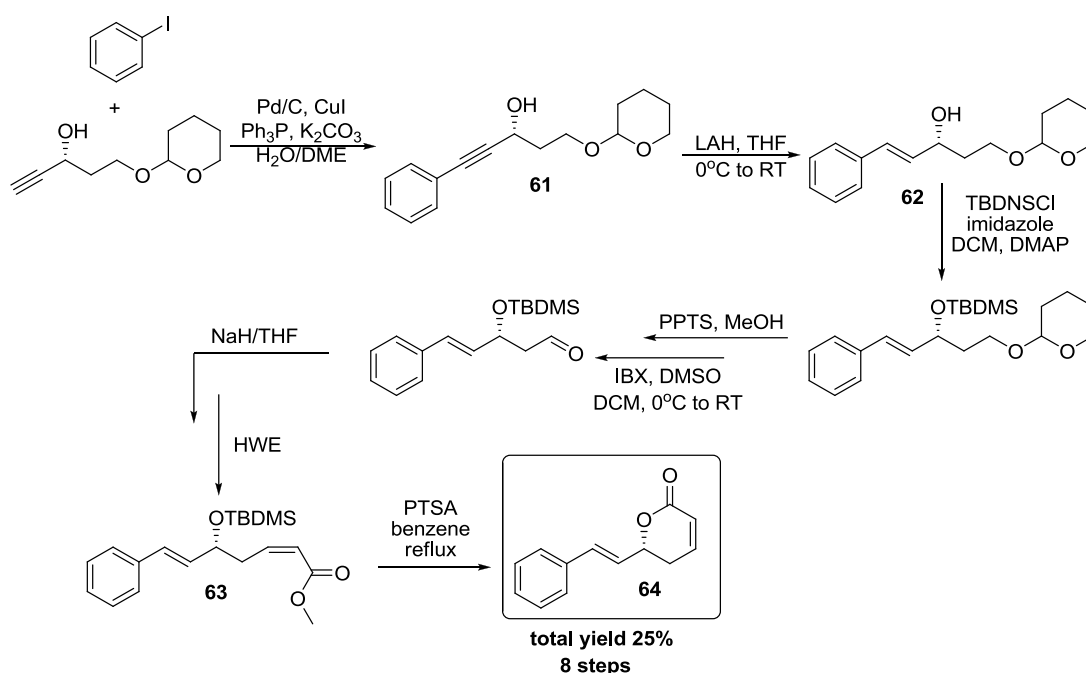
μοριακού βάρους μόρια μπορούν να ασκήσουν μεγάλη επίδραση στην λειτουργία των κυττάρων έτσι ώστε να κατανοηθούν ορισμένες βιολογικές διαδικασίες με σκοπό να βοηθήσουν στην θεραπεία νοσημάτων πολύ απειλητικών για την ζωή.⁷²



Λόγω του μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η (*R*)-goniothalamin, πολλές επιτυχείς προσεγγίσεις για την σύνθεση της έχουν δημοσιευτεί στην βιβλιογραφία. Μεγάλο εύρος αυτών των εργασιών στοχεύει στην δημιουργία του διπλού δεσμού του λακτονικού δακτυλίου είτε στον διπλό δεσμό μεταξύ του βενζολικού και του λακτονικού δακτυλίου, κυρίως με χρήση καταλύτη Grubbs. Επίσης πολλές συνθέσεις χρησιμοποιούν οπτικά ενεργά αντιδραστήρια από την αρχή, ενώ άλλες ξεκινούν από μη οπτικά ενεργά υποστρώματα και μέσω καταλυτικών αντιδράσεων προσδίδουν την επιθυμητή στερεοδομή στο στερεογονικό κέντρο.

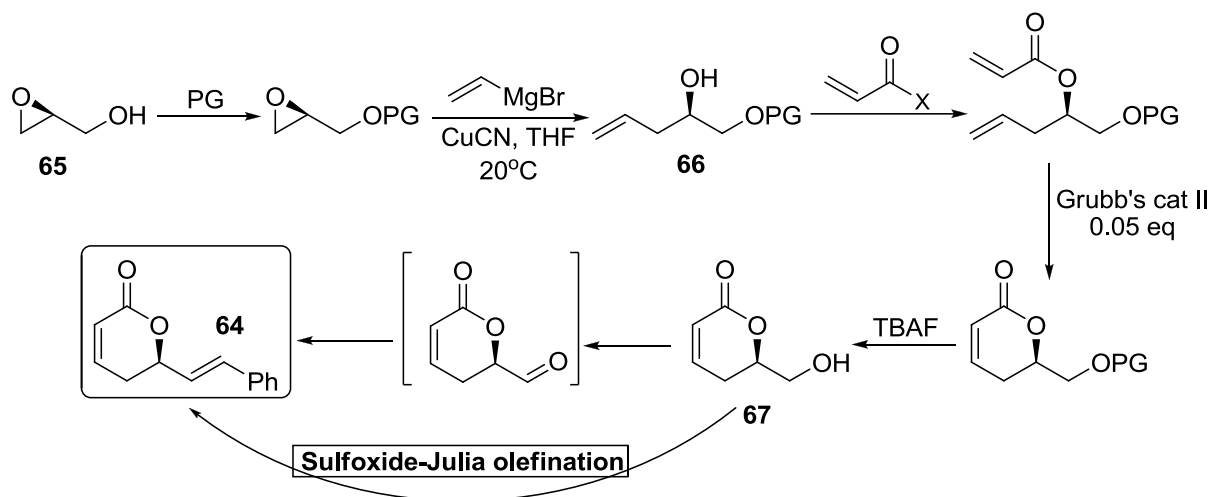
Το 2006 η ερευνητική ομάδα του Sabitha από το Πανεπιστήμιο Χημικής Τεχνολογίας της Ινδίας, παρουσίασε την σύνθεση της (*R*)-goniothalamin.⁷³ Στην συγκεκριμένη εργασία συνέθεσαν αρχικά το αλκύνιο **61** με την χρήση μιας οπτικά ενεργής αλκοόλης, σαν αρχικό υπόστρωμα. Μετέτρεψαν το αλκύνιο στο *trans* αλκένιο **62**, μέσω Sonogashira coupling και αναγωγή με LiAlH_4 , προστάτευσαν την αλκοόλη και ακολούθησε αποπροστασία της πρωτοταγούς αλκοόλης, οξείδωση της και αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας με μία αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons σύμφωνα με την

παραλλαγή Still. Στην συγκεκριμένη αντίδραση επιτυγχάνεται ο σχηματισμός του *cis* αλκένιου **63**. Στο τελευταίο βήμα πραγματοποιείται κυκλοποίηση και σχηματισμός της λακτόνης **64** με αποχωρούσα ομάδα την αιθόξυ ομάδα του εστέρα και ταυτόχρονη προστασία της οπτικά ενεργής αλκοόλης. Η σύνθεση αυτή παρουσιάζει 25% συνολική απόδοση ξεκινώντας από μια οπτικά ενεργή αλκοόλη (Σχήμα 83). Το στάδιο κλειδί στην σύνθεση τους είναι η δημιουργία του *cis* διπλού δεσμού, προϊόν **63**, και αποπροστασία-κυκλοποίηση στο τελευταίο στάδιο για τον σχηματισμό του λακτονικού δακτυλίου, **64**.



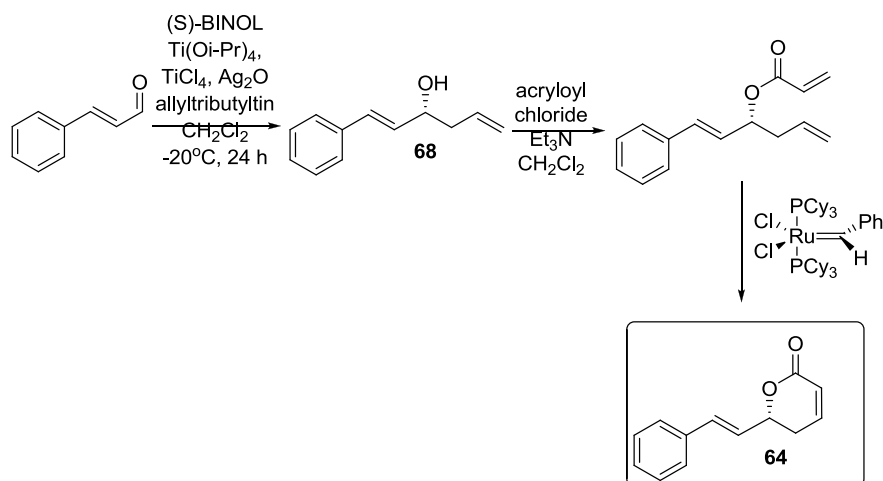
Σχήμα 83. Σύνθεση (*R*)-goniothalamin με αρχικό υπόστρωμα οπτικά ενεργή αλκοόλη

Την ίδια χρονιά, η ομάδα του Markó από το Βέλγιο, συνέθεσε την (*R*)-goniothalamin, σε έξι βήματα και με περίπου 50% συνολική απόδοση.⁷⁴ Ξεκίνησαν από την οπτικά ενεργή 2,3-εποξυ-1-προπανόλη **65**, με προστασία της πρωτοταγούς αλκοόλης και διάνοιξη του εποξειδίου προς τον σχηματισμό ακραίου αλκένιου **66**. Στην συνέχεια πραγματοποίησαν προστασία της αλκοόλης με προπενοϊκό οξύ και κυκλοποίηση-δημιουργία του λακτονικού δακτυλίου με καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς, προς το σχηματισμό της προστατευμένης πρωτοταγούς αλκοόλης **67**. Το κρίσιμο σημείο της σύνθεσης τους ήταν η αποπροστασία της αλκοόλης και ολεφινποίηση Julia, η οποία οδήγησε στον σχηματισμό του επιθυμητού φυσικού προϊόντος **64** (Σχήμα 84).



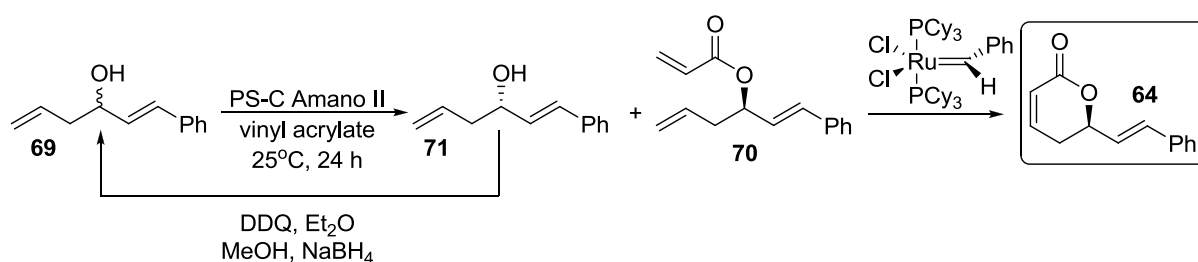
Σχήμα 84. Σύνθεση (*R*)-goniothalamin με αρχικό υπόστρωμα ένα οπτικά ενεργό εποξειδίο

Η ομάδα του Pilli από την Βραζιλία, με αρχικό υπόστρωμα τη κινναλδεΐδη και με την χρήση του οπτικά ενεργού αντιδραστηρίου (*S*)-BINOL, σαν στάδιο κλειδί, δημιούργησαν το επιθυμητό στερεογονικό κέντρο, σχηματίζοντας την ακόρεστη αλκοόλη **68**.⁷⁵ Η (*S*)-BINOL ενεργοποιείται από το τετραΐσοπροποξειδίο του τιτανίου, σχηματίζοντας ένα οπτικά ενεργό σύμπλοκο το οποίο κατευθύνει τον σχηματισμό του επιθυμητού ενεργού κέντρου. Στη συνέχεια πραγματοποίησαν προστασία της δευτεροταγούς αλκοόλης και ολεφινική μετάθεση, προς το σχηματισμό του τελικού φυσικού προϊόντος **64**, με συνολική απόδοση 74% (Σχήμα 85).



Σχήμα 85. Σύνθεση (*R*)-goniothalamin με χρήση οπτικά ενεργού αντιδραστηρίου και ολεφινική μετάθεση

Μία ακόμα ενδιαφέρουσα σύνθεση όπου πραγματοποιείται χρήση ενζυμικού κινητικού διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Gruttadauria από το Πανεπιστήμιο του Παλέρμο της Ιταλίας (Σχήμα 86).⁷⁶ Ξεκίνησαν με αρχικό υπόστρωμα την κινναμυλοαλδεΐδη προς τον σχηματισμό της αλλυλικής ρακεμικής αλκοόλης **69**. Με την χρήση της λιπάσης PS-C Amano II και vinyl acrylate για την προστασία της *R* αλκοόλης **70** και στη συνέχεια κυκλοποίηση με καταλύτη Grubbs δεύτερης γενιάς, αποδίδει το τελικό φυσικό προϊόν **64**. Η *S* αλκοόλη, **71**, που δεν αντιδρά με το προπενικό αιθυλενοεστέρα, επαναρακεμοποιείται με 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη και βοροϋδρίδιο του νατρίου, ώστε να συνεχίσει ο ενζυμικός κινητικός διαχωρισμός. Το προϊόν που συνέθεσαν είχε συνολική απόδοση 85%.

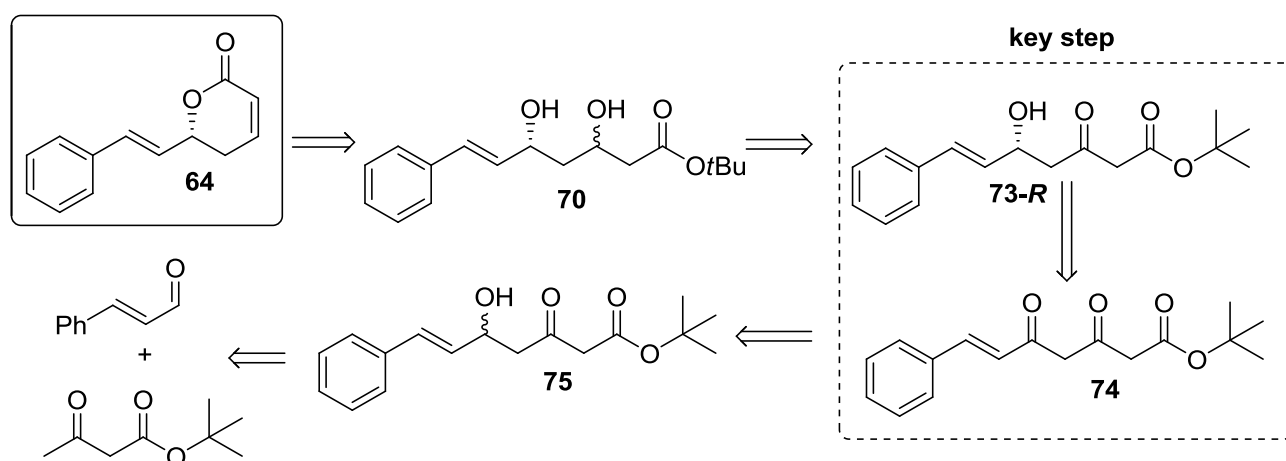


Σχήμα 86. Σύνθεση (*R*)-goniothalamin με χρήση λιπάσης ακολουθούμενη από ολεφινική μετάθεση

3.4 Χημειοενζυμική προσέγγιση για την σύνθεση της (*R*)-Goniothalamín

Στο μέρος αυτό της παρούσας διατριβής παρουσιάζεται η χημειοενζυμική προσέγγιση για την σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-Goniothalamín.

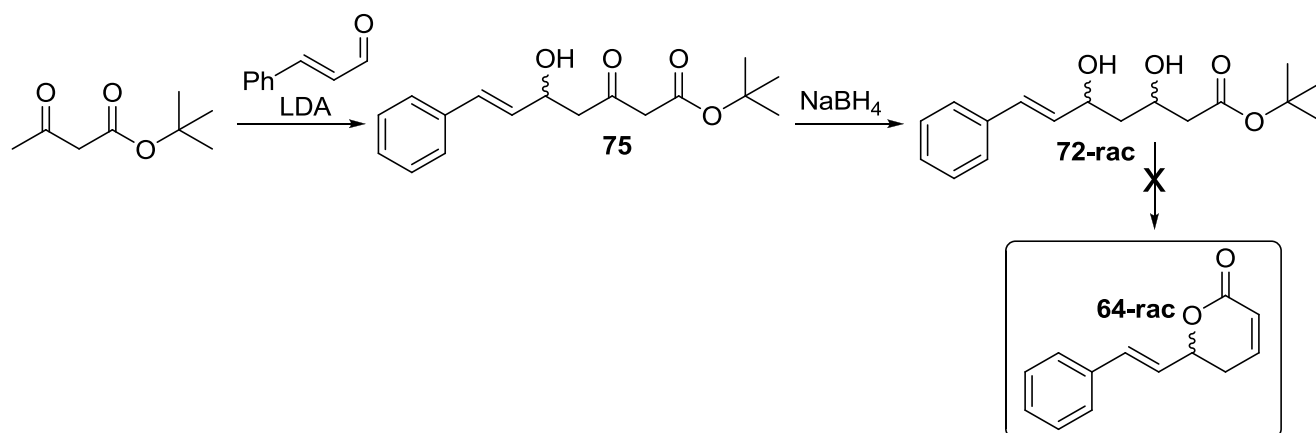
Με βάση την εμπειρία και γνώση από προηγούμενες χημειοενζυμικές συνθέσεις φυσικών προϊόντων και οπτικά χειρόμορφων ενδιάμεσων,^{43,44a,61,68-71} παρακάτω παρουσιάζεται η αρχική ιδέα και προτεινόμενη ρετροσύνθεση (Σχήμα 87) για τον σχηματισμό του επιθυμητού φυσικού προϊόντος σε μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα. Η προτεινόμενη αυτή μέθοδος περιλαμβάνει μικρό αριθμό βημάτων συγκρινόμενη με τις μέχρι σήμερα γνωστές μεθόδους που περιγράφηκαν. Η εισαγωγή της ασυμμετρίας θα επιτευχθεί μέσω ενζυμικής αναγωγής με κατάλληλο ένζυμο κετορεδουκτάση.



Σχήμα 87. Αρχικά προτεινόμενη ρετροσύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-goniothalamín

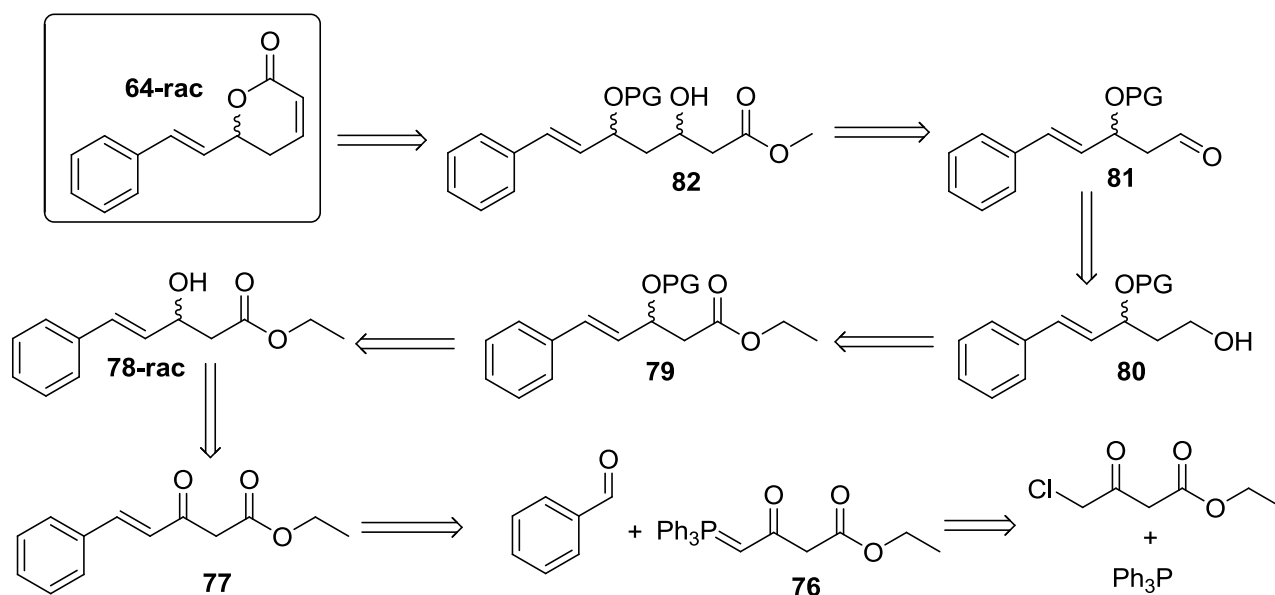
Η (*R*)-goniothalamín, λοιπόν, μπορεί να προκύψει από κυκλοποίηση και αφυδάτωση του διυδροξυ-εστέρα **70**, ο οποίος προέρχεται με την σειρά του από χημική αναγωγή του οπτικά ενεργού υδροξυ-κετο εστέρα **73-*R***. Η οπτικά ενεργή αλκοόλη προέρχεται από το στάδιο κλειδί, της ενζυμικής αναγωγής του δικετο-εστέρα **74** με καταλύτη κετορεδουκτάση. Ο δικετο-εστέρας μπορεί να συντεθεί από την ρακεμική αλκοόλη **75**, η οποία προκύπτει από αλδολική συμπύκνωση της κιναμαλδεΐδης και του τριτ-βουτυλοακετοοξικού εστέρα.

Παράλληλα όμως επιχειρήθηκε και η σύνθεση του ρακεμικού προϊόντος σύμφωνα με την παρακάτω πορεία (Σχήμα 88).



Σχήμα 88. Πορεία σύνθεση ρακεμικού φυσικού προϊόντος **64**

Μετά την αλδολική συμπύκνωση, προς την αλδόλη **75**, πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή προς τον σχηματισμό του διυδροξυ-εστέρα **72-rac** επιτυχώς. Στη συνέχεια ακολούθησαν προσπάθειες προστασίας-αποπροστασίας και κυκλοποίησης προς τον σχηματισμό της ρακεμικής goniothalamine **64-rac**, χωρίς καμία όμως επιτυχία, οπότε διαφοροποιήθηκε η προτεινόμενη σύνθεση για την (*R*)-goniothalamine, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 89.



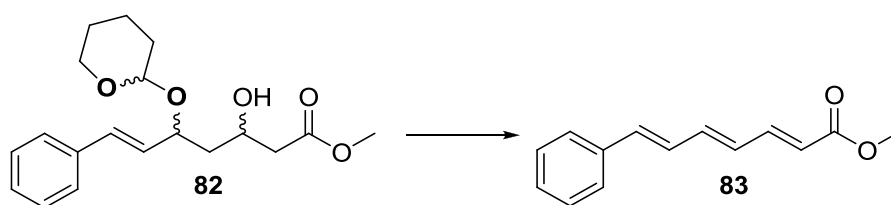
Σχήμα 89. Νέα προτεινόμενη ρετροσύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-goniothalamine

Το τελικό προϊόν σε ρακεμική μορφή μπορεί να προκύψει από την αποπροστασία-κυκλοποίηση και αφυδάτωση του προστατευμένου διυδροξυ-εστέρα **82**, ο οποίος προέρχεται από αλδολική συμπύκνωση με την αλδεΐδη **81**. Η αλδεΐδη **81** μπορεί να προκύψει από την οξείδωση της πρωτοταγούς αλκοόλης **80**, η οποία προέρχεται από την αναγωγή του εστέρα **79**. Ο υδροξυ-εστέρας **78-rac** προκύπτει από την αναγωγή του κετο-εστέρα **77**, ο οποίος προκύπτει από την αντίδραση Wittig, μεταξύ της βενζαλδεΐδης και του υλιδίου **76**.

Πράγματι, πραγματοποιήθηκε σύνθεση του υλιδίου **76** και ακολούθησε η αντίδραση Wittig με μέγιστη απόδοση 45%. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε, ποσοτικά,

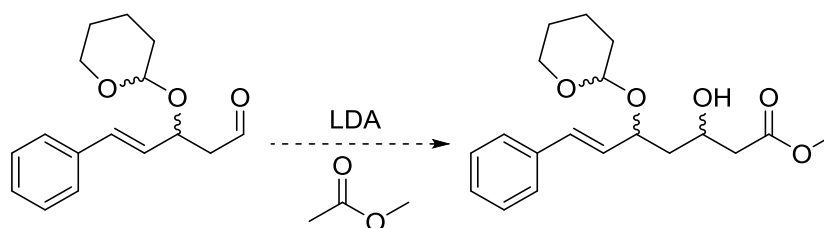
η χημική αναγωγή του κετο-εστέρα **77** προς το σχηματισμό της αλκοόλης **78-rac** και ακολούθησε η προστασία της ομάδας υδροξυλίου.

Σε πρώτο στάδιο, σαν προστατευτική ομάδα της υδροξυλομάδας επιλέχθηκε το τετραϋδρο-πυράνιο, THP. Ακολούθησε η αναγωγή του εστέρα **79** προς το σχηματισμό της πρωτοταγούς αλκοόλης **80** και ακολούθησε η οξείδωση της προς την αλδεΐδη **81**. Έπειτα ακολούθησε αλδολική συμπύκνωση προς το σχηματισμό του ακόρεστου υδροξυμεθυλεστέρα **82**, αλλά όπως διαπιστώθηκε η προστατευτική ομάδα, -OTHP, αποτελεί καλή αποχωρούσα ομάδα με αποτέλεσμα να αφυδατώνεται αμέσως μετά την σύνθεση της, και να σχηματίζει το πολύ σταθερό συζυγιακό σύστημα **83** (Σχήμα 90).

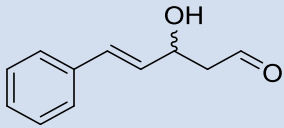
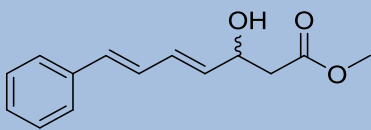


Σχήμα 90. Αποπροστασία και αφυδάτωση που πραγματοποιείται κατά την αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης

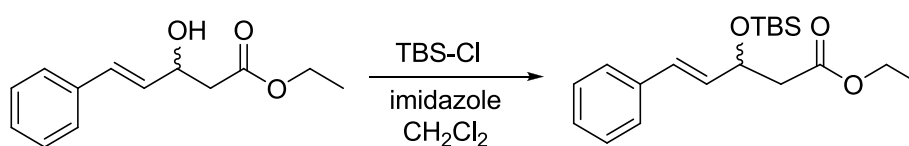
Σε άλλη περίπτωση, όπου αλλάξαμε τις συνθήκες της αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης, πραγματοποιήθηκε απλά αποπροστασία της αλδεΐδης. Στο Πίνακα 1 παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι συνθήκες για την αλδολική συμπύκνωση, καθώς και τα προϊόντα τα οποία προέκυψαν.



entry	eq. ester	eq. aldehyde	LDA	Product
1	1	1.2	1.2	n.r.

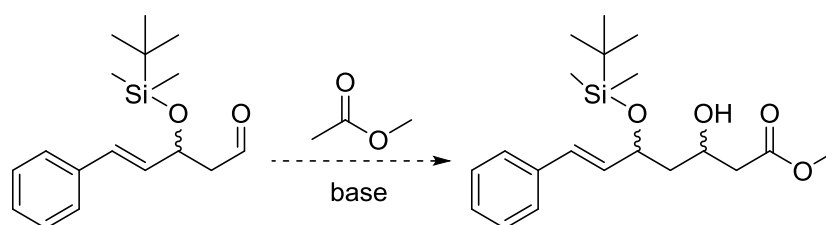
2	1	1.5	1.2	
3	1.5	1	1.3	
4	1	1.5	1.2 DPA 1 BuLi	u.p.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, αποφασίσαμε να αλλάξουμε προστατευτική ομάδα, ώστε να αποφύγουμε τυχόν αποπροστασία και αφυδάτωση στο βήμα την αλδολικής συμπύκνωσης. Η νέα προστατευτική ομάδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τριτ-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλοχλωρίδιο, TBS ή TBDMS-Cl (Σχήμα 91). Η αντίδραση προστασίας πραγματοποιείται ποσοτικά χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμός, με απόδοση >99%.

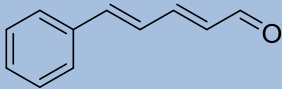


Σχήμα 91. Προστασία υδροξυ-ομάδας με TBS

Στον παρακάτω Πίνακα 2 φαίνονται αναλυτικά οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν κατά την αλδολική συμπύκνωση.



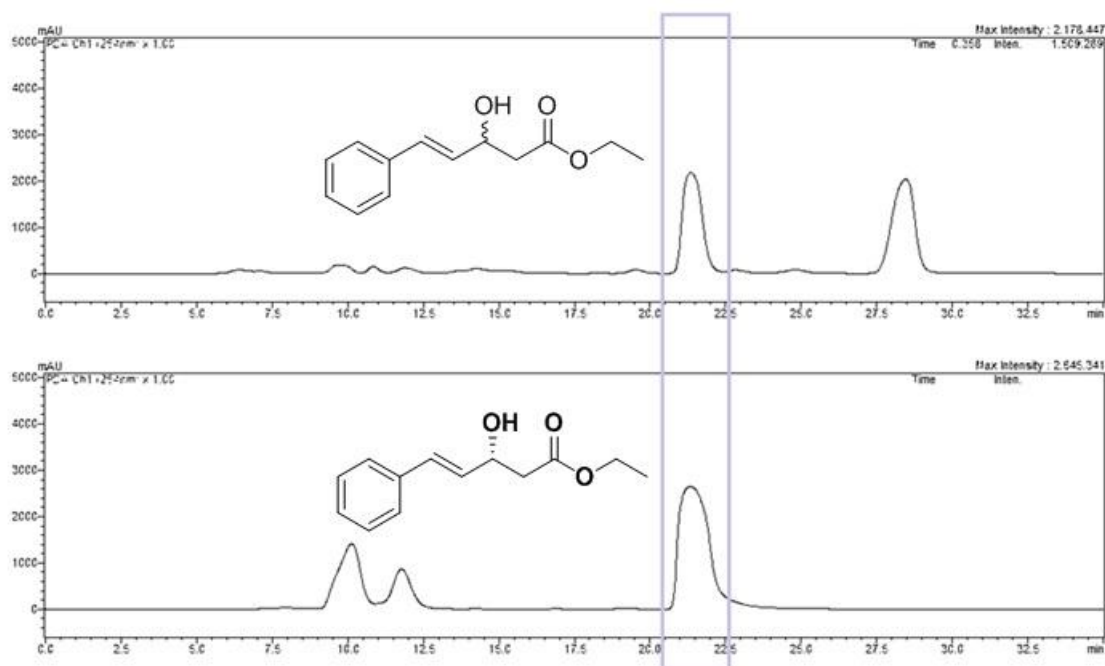
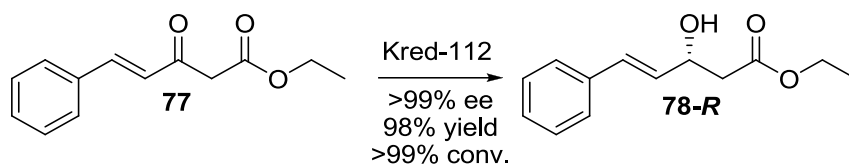
entry	base	eq. Ester	eq. Aldehyde	Product
-------	------	-----------	--------------	---------

1	LDA	1.5	1	
2	NaH, BuLi	1	1	u.p.

Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκε αποπροστασία πάλι και αφυδάτωση της προστατευμένης αλκοόλης, σχηματίζοντας ένα σταθερό συζυγιακό προϊόν. Στην δεύτερη περίπτωση κατά την αντίδραση της αλδολικής συμπύκνωσης παρατηρήθηκε η διάσπαση της αλδεΐδης και ο σχηματισμός ενός μη ταυτοποιημένου προϊόντος. Στο σημείο αυτό διακόπηκε η προσπάθεια ολικής σύνθεσης του φυσικού προϊόντος (*R*)-Goniothalamine **64** και παραμείναμε στην αλδεΐδη **81** που αποτελεί σημαντικό πρόδρομο μόριο.

Σύνθεση του οπτικά ενεργού υδροξυ-εστέρα **78-R**

Παράλληλα με την παρασκευή του οπτικά ενεργού υποστρώματος **78-R** πραγματοποιήθηκε και η σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης **78-rac**, ώστε να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε καλύτερα την συνθετική πορεία. Πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αναγωγές για τον εντοπισμό της κατάλληλης κετορεδουκτάσης, η οποία καταλύει τον σχηματισμό του επιθυμητού στερεογονικού κέντρου, βάσει της υπάρχουσας και προαναφερθείσας μεθοδολογίας. Αφού πραγματοποιήθηκε αναγωγή του κετο εστέρα **77** με σειρά ενζύμων, διαπιστώθηκε ότι η KRED 112 αποδίδει το επιθυμητό προϊόν **78-R**, με στερεοαπεικόνιση *R*, το οποίο ταυτοποιήθηκε και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, HPLC, σε υψηλή απόδοση 98%, μετατροπή >99% και εναντιοεκλεκτική περίσσεια >99%. Παρακάτω φαίνονται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν, από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Σχήμα 92).



Σχήμα 92.Χρωματογραφήματα από HPLC: α) ρακεμική αλκοόλη και β) οπτικά ενεργή αλκοόλη από την ενζυμική αναγωγή με KRED-112, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό

Στο 2ο Κεφάλαιο παρουσιάστηκε η χημειοενζυμική προσέγγιση για τη σύνθεση της (*R*)-goniothalamine, ενός φυσικού προϊόντος με φαρμακευτική δράση. Μελετήθηκαν διάφορες συνθετικές πορείες καθώς και διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης, όπου παρόλα'αυτά προέκυψε ένα πολύ σημαντικό ενδιαμέσο, η αλδεΐδη 81. Σκοπός μας, στο προσεχές μέλλον, είναι να ολοκληρωθεί η σύνθεση της (*R*)-goniothalamine και η περαιτέρω διερεύνηση για τις κατάλληλες συνθήκες αλδολικής συμπύκνωσης της αλδεΐδης 81 με τον κατάλληλο εστέρα 82, προς το σχηματισμό του υδροξυ-εστέρα που θα οδηγήσει στο τελικό φυσικό προϊόν 64.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση Υποστρωμάτων και Ενζυμικές Αναγωγές

Σύνθεση του υλιδίου 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα 76

Για τη σύνθεση του σταθεροποιημένου υλιδίου 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκός αιθυλεστέρα, τρι-φαινυλο-φωσφίνη (63.6 mmol, 16.7 g) και 4-χλωρο-3-οξο-βουτανοϊκός αιθυλεστέρας (70 mmol, 9.46 mL) προστέθηκαν σε 50 mL τολουόλιο και αναδεύτηκαν για 24 ώρες στους 50 °C. Το στερεό προϊόν ξηπλύθηκε με τολουόλιο και προστέθηκε απεσταγμένο νερό έως ότου διαλυθεί το στερεό προϊόν. Το μίγμα εκχυλίστηκε δυο φορές με διαιθυλο-αιθέρα. Κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου προστέθηκε έως ότου το pH να γίνει 8. Το στερεό διηθήθηκε με χωνί Buchner και εκπλύθηκε δυο φορές με απεσταγμένο νερό και δυο φορές με διαιθυλο-αιθέρα. Για την ξήρανσή του τοποθετήθηκε σε αντλία κενού.

Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 60% (15 g)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 3.35 (s, 2H), 3.8 (d, 1H, $J = 24.9$ Hz), 4.2 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 7.5 (m, 15 αρωματικά-H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.2 (2C), 48.3, 48.5, 51.5, 53.0, 60.4 (2C), 126.0 (2C), 127.2 (2C), 128.7 (2C), 128.9 (2C), 132.09 (2C), 132.13 (2C), 133.0 (2C), 133.2 (2C), 170.7 (2C), 183.96, 184.00.

Σύνθεση του (E)-3-οξο-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα 77 με αντίδραση Wittig

Για την αντίδραση Wittig, κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, 2 mmol 3-οξο-4-(τρι-φαινυλο-φωσφορανυλιδεν)-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα 76 (780 mg) και 2 mmol (407 μL) βενζαλδεΐδης προστέθηκαν σε ξηρό THF (10 mL) και το μίγμα αφέθηκε σε βρασμό (Reflux) για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο περισσότερος διαλύτης συμπυκνώθηκε, κατόπιν προστέθηκε εξάνιο (3 mL) για να καταβυθιστούν τα φωσφινοξείδια και το μίγμα διηθήθηκε μέσω πορώδους ηθμού στρωμένου με Silica gel. Ο ηθμός ξηπλύθηκε με μίγμα εξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 2/1 (6

mL) 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 45% (196 mg)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 1.26 (t, 3H κετο- και 3H ενολ- CH_3), 3.70 (s, 2H $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), 4.22 (q, 2H κετο- και 2H ενολ- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 5.17 (s, 1H, ενολ- $\text{CH}=\text{CH}$), 6.43 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, ενολ- $\text{CH}=\text{CHC}(\text{OH})=\text{C}$), 6.81 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, κετο- $\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$), 7.34 (m, 5 αρωματικά-Η κετο- και 5 αρωματικά-Η για την ενολική μορφή, 1 βινυλικό-Η για τη κετο- και 1 βινυλικό-Η για την ενολική μορφή) και 12.00 (s, ενολ- OH)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 14.1, 14.2, 47.6, 60.2, 61.4, 91.9, 121.9, 125.2, 127.5 (2C), 128.5 (2C), 128.8 (2C), 129.0 (2C), 129.3, 130.9, 134.1, 135.3, 136.7, 144.5, 167.3, 169.2, 172.8 και 191.9.

Σύνθεση του (E)-3-υδροξυ-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα 78-rac με χημική αναγωγή

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε 7 mL άνυδρης αιθανόλης προστίθεται NaBH_4 (0.545 mmol, 20 mg). Στους 0°C και σε διάρκεια 5 λεπτών προστίθενται στάγδην 2.18 mmol του κετοεστέρα **77** (467 mg) διαλυμένο σε 3 mL άνυδρης αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 4 ώρες στους 0°C , ελέγχοντας την πρόοδο της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται αργά στους 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 >99% (480 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): 1.25 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.63 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz), 4.17 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.73 (dq, 1H, $J = 6.3$ Hz), 6.23 (dd, 1H, $J = 6.3$ Hz), 6.64 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz) και 7.29 (m, 5 αρωματικά-H)

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): 14.16, 41.49, 60.83, 68.85, 126.52 (2C), 127.78, 128.55 (2C), 129.92, 130.77, 136.44 και 172.21.

Σύνθεση του (E)-3-((τριτ-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλο)-οξυ)-5-φαινυλο-4-πεντενοϊκού αιθυλεστέρα 79

Κάτω από ατμοσφαιρα αζώτου και σε 10 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου προστίθεται η αλκοόλη **78-rac** (2.78 mmol, 612 mg). Σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται τριτ-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλο-χλωρίδιο (3.34 mmol, 503 mg) και ιμιδαζόλιο (6.95 mmol, 473 mg). Το μίγμα αφήνεται για ανάδευση για 24 ώρες, ελέγχοντας το πέρας της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Για την απομόνωση του προϊόντος προστέθηκε διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα/νερό (v/v, 1/1) 10 mL. Το μίγμα αναδεύτηκε για περίπου 20 λεπτά και ακολούθησε μια έκπλυση με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (1×10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 και ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση.

Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 90% (837 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): 0.71 (d, 6H, $J = 11.5$ Hz), 0.89 (s, 9H), 1.26 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz), 2.49-2.64 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 4.76 (q, 1H, $J = 6.5$ Hz), 6.19 (dd, 1H, $J = 6.5$ και 7 Hz), 6.56 (d, 1H, $J = 16$ Hz) και 7.29 (m, 5 αρωματικά-H).

^{13}C NMR (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): -5.32, -4.51, 13.94, 17.83, 25.48 (9C), 43.77, 60.17, 70.46, 126.20 (2C), 127.35, 128.29 (2C), 129.64, 131.42, 136.40 και 170.77.

Σύνθεση της (E)-3-((τριτ-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλο)-οξυ)-5-φαινυλο-4-πεντεν-1-όλης 80

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου προστέθηκε σε δίλιμη ξηρή σφαιρική φιάλη ξηρό τετραϋδροφουράνιο 5 mL και το αναγωγικό αντιδραστήριο LiAlH_4 (1.65 mmol, 63 mg) στους 0°C . Στη συνέχεια προστίθεται ο εστέρας **79** (1.5 mmol, 500 mg), διαλυμένος σε 5 mL τετραϋδροφουράνιο. Η αντίδραση αφήνεται για ανάδευση στους 0°C μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και το πέρασ της διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Το προϊόν απομονώνεται με προσθήκη υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 10% (3 mL) και ακολουθούν εκπλύσεις με διαιθυλο-αιθέρα (4×10mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 και ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση.

Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση >99% (438 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): 0.93 (s, 9H), 1.80-1.95 (m, 2H), 2.45 (brs, 1H), 3.76-3.87 (m, 2H), 4.59 (q, 1H, $J = 6.3$ Hz), 6.21 (dd, 1H, $J = 6.3$ Hz), 6.55 (d, 1H, $J = 16$ Hz) και 7.24-7.38 m, 5 αρωματικά-H).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): -4.94, -4.20, 18.13, 25.85 (9C), 39.63, 60.26, 73.13, 126.40 (2C), 127.57, 128.59 (2C), 129.67, 132.13 και 136.74.

Σύνθεση της (E)-3-((τριτ-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλο)-οξυ)-5-φαινυλο-4-πεντενάλης 81

Σε ξηρή δίλιμη σφαιρική φιάλη και κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου προστέθηκε ξηρό διχλωρομεθάνιο 5 mL, στους 0°C . Στη συνέχεια προστίθενται το οξειδωτικό αντιδραστήριο PCC, pyridiniumchlorochromate (1.25 mmol, 270 mg) και η πρωτοταγής αλκοόλη **80** (1 mmol, 300 mg) αραιωμένη με ξηρό διχλωρομεθάνιο. Το μίγμα αφήνεται για ανάδευση στους 0°C μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και το πέρασ της διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Το προϊόν απομονώνεται με προσθήκη διαιθυλο-αιθέρα 3 mL και το μίγμα ψύχεται στους -20°C για 2 ώρες. Στη

συνέχεια διηθήθηκε σε φίλτρο τύπου Whatman και ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση.

Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 30% (87 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): 0.10 (d, 6H, $J = 11.5$ Hz), 0.91 (s, 9H), 2.60-2.75 (m, 2H), 4.83-4.87 (m, 1H), 6.23 (dd, 1H, $J = 6$ και 6.5 Hz), 6.60 (d, 1H, $J = 16$ Hz), 7.25-7.39 (m, 5 αρωματικά-H) και 9.83 (t, 1H, $J = 2$ και 2.5 Hz).

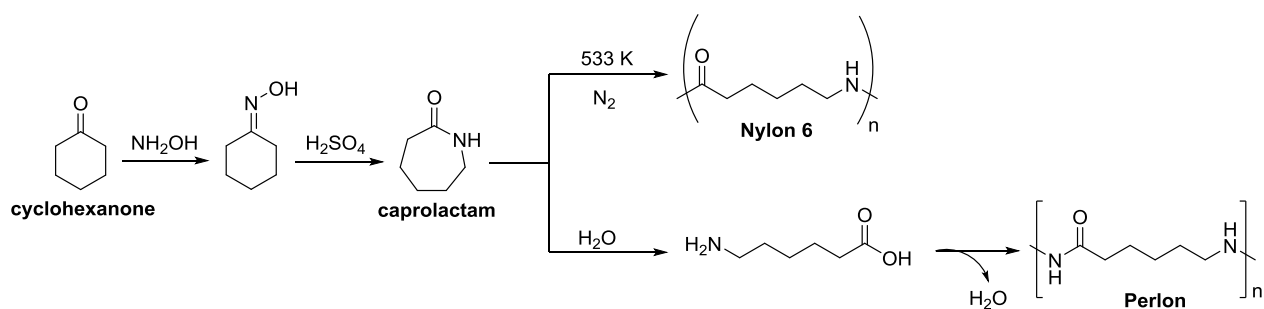
^{13}C NMR (125 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): -5.22, -4.48, 17.85, 25.49 (9C), 51.38, 69.03, 126.22 (2C), 127.52, 128.35 (2C), 129.84, 131.01, 136.13 και 201.18.

Γ' ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα πρώτα αποτελέσματα διερεύνησης ενός νέου φωτοκαταλυτικού συστήματος οξείδωσης της κυκλοεξανόλης προς κυκλοεξανόνη, με χρήση καταλύτη, γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα (graphitic Carbon Nitride). Οι φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις με χρήση ορατού φωτός, χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια, στο όνομα της «Πράσινης Χημείας», εξαιτίας του χαμηλού κόστους, της διαθεσιμότητας και των φιλικών προς το περιβάλλον συνθηκών αντίδρασης.⁷⁷

Η ετερογενής κατάλυση αποτελεί μια πολύ διαδεδομένη μέθοδο τα τελευταία είκοσι χρόνια, κυρίως στην παραγωγή χημικών και στην φαρμακευτική βιοχημεία.⁷⁸ Η ετερογενής κατάλυση βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην βιομηχανία, λόγω της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης του στερεού καταλύτη, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο λιγότερο δαπανηρή και πιο αποδοτική.

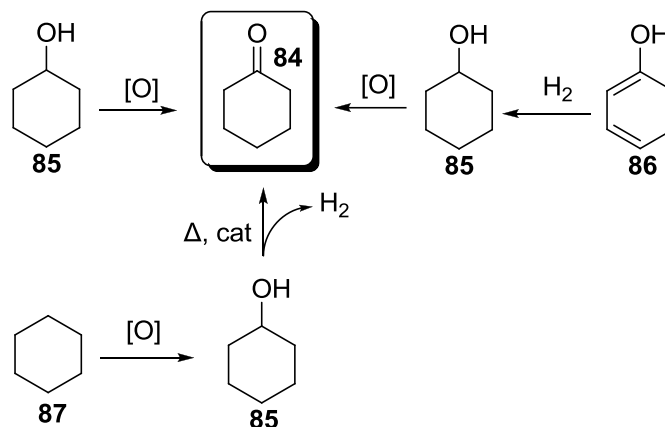
Η κυκλοεξανόνη είναι μία σημαντική πρώτη ύλη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην σύνθεση των πολυμερών ευρείας χρήσης Nylon και Perlon. Ο σχηματισμός των πολυμερών αυτών με αρχική ουσία την κυκλοεξανόνη πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού ε-καπρολακτάμης, ενός γνωστού οργανικού διαλύτη (Σχήμα93), του οποίου η ετήσια παραγωγή φτάνει τα 4.5 δισεκατομμύρια κιλά.



Σχήμα 93. Σύνθεση Nylon και Perlon μέσω καπρολακτάμης

Τα τελευταία χρόνια η κυκλοεξανόνη (**84**) παράγεται είτε με οξείδωση της κυκλοεξανόλης (**85**), είτε με υδρογόνωση της φαινόλης (**86**).⁷⁹ Μεταξύ άλλων συνθετικών μεθόδων, η κυκλοεξανόνη μπορεί επίσης να προκύψει από το κυκλοεξάνιο (**87**) μέσω σχηματισμού κυκλοεξανόλης και διαδοχικής αφυδρογόνωσης με υψηλή θερμοκρασία

και χρήση μεταλλικών καταλυτών (Σχήμα 94).⁸⁰ Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί νανοσωματίδια χρυσού πάνω σε επιφάνεια χρωμίου,⁸¹ αλλά και νανοκρυστάλλοι Co_3O_4 με μοριακό οξυγόνο,⁸² ακόμα πληθώρα καταλυτών χαλκού,⁸³ καταλύτες βασισμένους στο ζεόλιθο ZSM-5⁸⁴ και $\text{Y}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$.⁸⁵



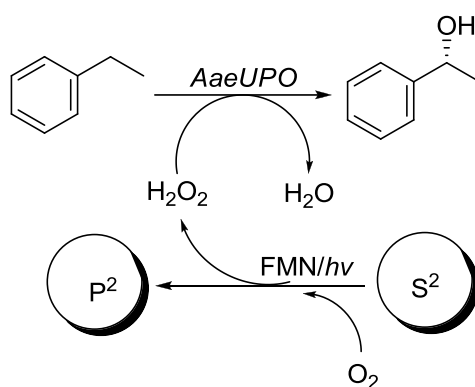
Σχήμα 94. Διαφορετικές πορείες σύνθεσης της κυκλοεξανόνης

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενέργειας και περιλαμβάνουν τη χρήση τοξικών ή και δαπανηρών μεταλλικών καταλυτών.

Εναλλακτική προσέγγιση για την σύνθεση κυκλοεξανόνης αποτελεί μία καταλυτική διεργασία με χρήση μη τοξικών καταλυτών σε ήπιες συνθήκες. Υπάρχουν πολλές αναφορές για μονοοξυγονάσες, όπως το κυτόχρωμα P450 ή η μονοοξυγενάση του μεθανίου, οι οποίες καταλύουν την υδρογόνωση της μη ενεργοποιημένης μεθυλενικής ομάδας, $-\text{CH}_2-$, του κυκλοεξανίου.⁸⁶ Όμως σε αυτά τα συστήματα παρουσιάζεται χαμηλή σταθερότητα στα ένζυμα, περίπλοκες και χρονοβόρες διαδικασίες καθαρισμού των πρωτεϊνών και απαιτούνται υψηλού κόστους συμπράγοντες. Εδώ και πολλά χρόνια ωστόσο, μια ομάδα από γλυκοσυλιωμένες, εξωκυττάριας, H_2O_2 -εξαρτώμενες μονοοξυγενάσες έχουν γίνει ευρέως γνωστές και χρησιμοποιούνται εκτεταμένα, οι οποίες αναφέρονται ως μη-ειδικές υπεροξειδάσες.⁸⁷

Το 2011 η ερευνητική ομάδα του F. Hollmann, στο πανεπιστήμιο TUDelft δημοσίευσε μία εργασία που αφορά στην φωτοκαταλυτική υδροξυλίωση αρωματικών υδρογονανθράκων προς το σχηματισμό των αντίστοιχων φαινολών μέσω μιας νέας

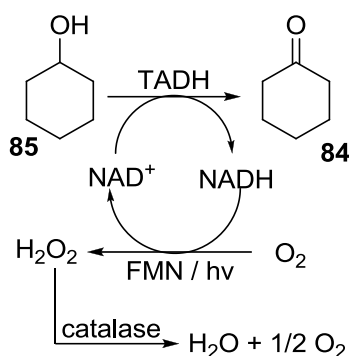
υπεροξειδάσης απομονωμένης από τον μύκητα basidiomycetous *Agrocube aegerita* (*AaeAPO* = *Argocub eaegerita* Aromatic PerOxygenase), η οποία πρόσφατα κατηγοριοποιήθηκε ως «μη ειδική υπεροξειδάση», *AaeUPO* (*Argocube aegerita* Unspecific PerOxygenase).⁸⁸ Τα φλαβινο αδενο νουκλεοτίδια (FMN) χρησιμοποιήθηκαν ως φωτοκαταλύτες και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ως υπόστρωμα, για την εξισορρόπηση της στοιχειομετρίας του αναγωγικού αντιδραστηρίου (Σχήμα95). Όταν το σύστημα ακτινοβολείται με ορατό φως, η φωτοευαίσθητη φλαβίνη οξειδώνεται το EDTA και η ανηγμένη φλαβίνη, επαναοξειδώνεται από μοριακό οξυγόνο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο με την σειρά του βοηθά την *AaeUPO* να πραγματοποιήσει τον επόμενο καταλυτικό κύκλο μετατροπής του αρωματικού υδρογονάνθρακα στην αντίστοιχη φαινόλη.



Σχήμα 95. Καταλυτικό σύστημα υδρογόνωσης μη ενεργοποιημένης μεθυλενικής ομάδας, -CH₂-

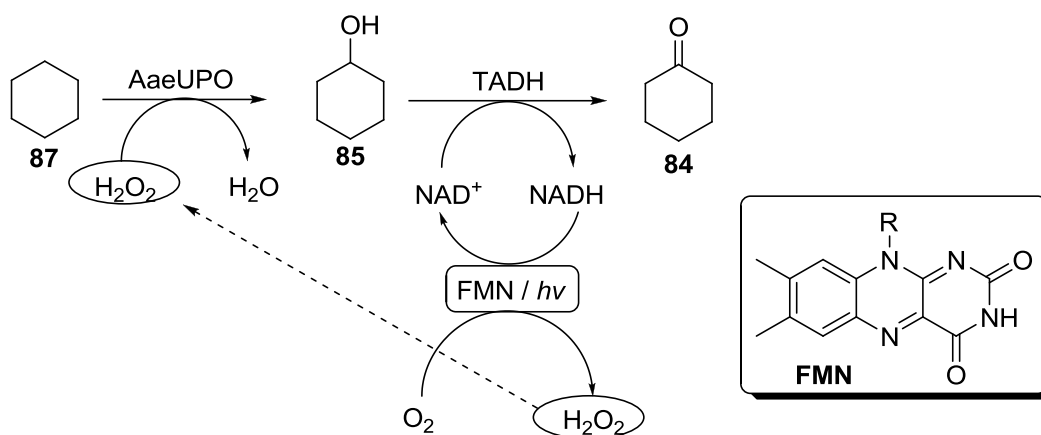
Την ίδια χρονιά, το 2011, η ίδια ερευνητική ομάδα παρουσίασε ένα νέο ενζυμικό σύστημα νικοτιναμίδικού συμπαραγόνα και αλκοολικής αφυδρογονάσης με χρήση ορατού φωτός στην οξείδωση αλκοολών.⁸⁹ Η πρότυπη αντίδραση πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα κυκλοεξανόλη προς κυκλοεξανόνη (Σχήμα 96). Συγκεκριμένα, η οξείδωση γίνεται μέσω του NAD^+ και του καταλύτη, μια θερμοφιλή αλκοολική αφυδρογονάση του γένους *Thermus sp.ATN1* (TADH). Η αφυδρογονάση καταλύει την οξείδωση μεταφέροντας ένα υδρίδιο από τον καρβονικό άνθρακα της κυκλοεξανόλης προς τον συμπαραγόνα NAD^+ , αποδίδοντας την καρβονυλο-ένωση και την ανηγμένη μορφή του συμπαραγόνα, $NADH$. Για την ανακύκλωση του συμπαραγόνα, η ανηγμένη μορφή του συμπαραγόνα επαναοξειδώνεται παρουσία οξυγόνου και καταλύτη φλαβινο αδενο

νουκλεοτιδίου (FMN). Το παραπροϊόν από την οξείδωση του NADH, είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο υπολογίζεται με φασματοφωτομετρία και χρήση καταλάσης.



Σχήμα 96. Αντίδραση οξείδωσης κυκλοεξανόλης προς κυκλοεξανόνη μέσω του συστήματος TADH/NAD⁺/FMN

Κατά την διάρκεια της επίσκεψής μου στην ερευνητική ομάδα του Dr. F. Hollmann, σκοπός μας ήταν η σύνθεση κυκλοεξανόνης (**84**), με αρχικό υπόστρωμα κυκλοεξάνιο (**87**), μέσω συνδυασμού των παραπάνω προαναφερθεισών αντιδράσεων. Η προτεινόμενη αντίδραση αποτελείται από δύο βήματα, στην ίδια φιάλη αντίδρασης, χωρίς την απομόνωση της κυκλοεξανόλης (**85**), σαν ενδιάμεσο (Σχήμα 97). Πιο αναλυτικά, στο πρώτο βήμα η *AaeUPO*, ενεργοποιεί τη μεθυλενική ομάδα του κυκλοεξανίου (**87**) και καταλύει την οξείδωση του με υπεροξείδιο του υδρογόνου, παράγοντας έτσι την ενδιάμεση κυκλοεξανόλη (**85**). Οι υπεροξυγενάσες είναι σταθεροί βιοκαταλύτες που δεν επηρεάζουν την συνέχεια στο επόμενο στάδιο της αντίδρασης. Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, η οξείδωση καταλύεται από την θερμόφιλη αφυδρογονάση της γλυκόζης *Thermussp. ATN1*, μέσω NAD⁺ και ως ανακυκλωτικό σύστημα χρησιμοποιείται ορατό φως. Μηχανιστικά, η οξείδωση από την αφυδρογονάση περιλαμβάνει μια αντίστροφη αφαίρεση υδριδίου από τον καρβινολικό άνθρακα με μεταφορά, προς την οξειδωμένη μορφή του συμπαράγοντα NAD⁺, αποδίδοντας την καρβονυλοένωση και τον ανηγμένο συμπαράγοντα NADH. Για λόγους οικονομίας, η χρήση καταλυτικών ποσοτήτων NAD⁺ είναι απαραίτητη. Αυτό λοιπόν απαιτεί μια *in situ* αναγέννηση, με σκοπό την επανοξείδωση του νικοτιναμδικού συμπαράγοντα, μέσω μεταφοράς των ισοδύναμων υδριδίων σε ένα τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Παραδοσιακά, α-κετογλουταρικό οξύ, λακτάση και κετόνες χρησιμοποιούνται ως δέκτες ηλεκτρονίων.



Σχήμα 97. Προτεινόμενη αντίδραση 2 σταδίων, με σκοπό την ενεργοποίηση της μεθυλενικής ομάδας του κυκλοεξανίου **87** και την οξείδωση της σχηματιζόμενης ενδιάμεσης κυκλοεξανόλης **85**.

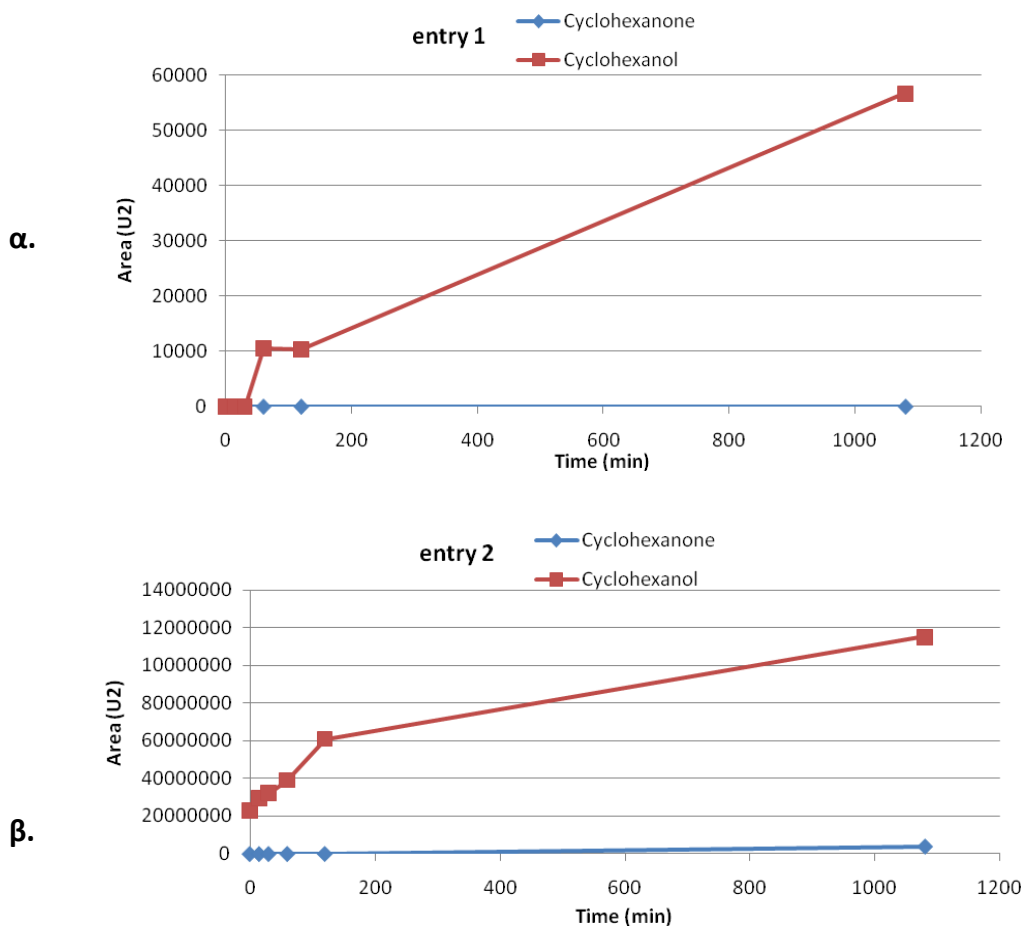
Αρχικά η ιδέα ήταν, το παραγόμενο H_2O_2 από το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης να χρησιμοποιηθεί στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, για την ανακύκλωση της *AaeUPO*. Για την παραγωγή του H_2O_2 με το σύστημα *TADH*/ NAD^+ /*FMN* απαιτείται παράλληλα μία αλκοόλη. Έτσι, στην πρώτη προσέγγιση αυτού του σύνθετου συστήματος, προσθέσαμε 4% ισοπροπανόλης στη μια περίπτωση, και 4% κυκλοεξανόλη στην δεύτερη, με σκοπό να ξεκινήσει το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, να παραχθεί H_2O_2 και να τροφοδοτήσει το πρώτο στάδιο ώστε να ξεκινήσει. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται οι συνθήκες των αντιδράσεων.

Πίνακας 3.

Entry	FMN (mM)	NAD^+ (mM)	TADH (mM)	<i>AaeUPO</i>	Cosubstrate	
1	0.05	0.1	0.05	100 μ L	Isopropanol	4%
2	0.05	0.1	0.05	100 μ L	Cyclohexanol	4%

Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 10 mL (5 mL υδατικής φάσης και 5 mL κυκλοεξανίου). Η αντίδραση διήρκεσε 18 ώρες. Η υδατική φάση ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7. Στην πρώτη αντίδραση η παραγόμενη κυκλοεξανόλη ήταν 0.01 % σε 18 ώρες, ενώ στην δεύτερη περίπτωση, η παραγόμενη κυκλοεξανόλη ήταν 20.4 %. Συμπεράναμε λοιπόν ότι η ισοπροπανόλη δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για να ωθήσει το σύστημα σε έναρξη. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι και στις δυο περιπτώσεις, η παραγόμενη κυκλοεξανόλη είναι σε πολύ μικρό ποσοστό σε

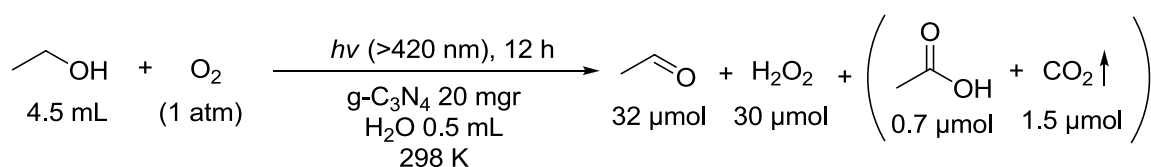
αντίθεση με την παραγόμενη κυκλοεξανόλη. Στα παρακάτω γραφήματα εμβαδού κορυφής συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης (Σχήμα 98) παρουσιάζεται η παραγόμενη κυκλοεξανόλη και κυκλοεξανόνη. Δείγματα (100 μL) ελήφθησαν για τον έλεγχο των αντιδράσεων στα 0, 14, 30, 60, 120 και 1080 λεπτά, ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο.



Σχήμα 98. Γραφήματα εμβαδού κορυφής κυκλοεξανόνης και κυκλοεξανόλης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης με α) χρήση ισοπροπανόλης και β) χρήση κυκλοεξανόλης

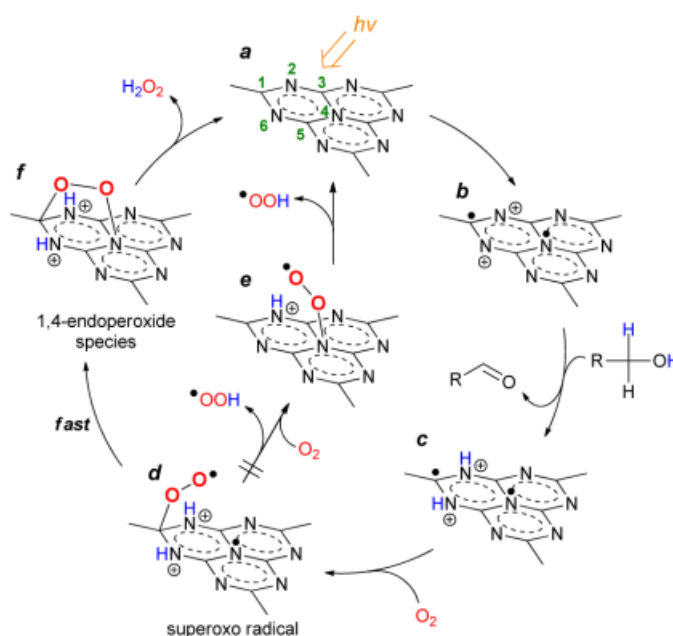
Πρόσφατα, μια ομάδα από το Πανεπιστήμιο της Osaka παρουσίασε την χρήση ενός νέου φωτοκαταλύτη που ενεργοποιείται από ορατό φως, του graphitic Carbon Nitride ($g\text{-C}_3\text{N}_4$), παράγοντας H_2O_2 .⁹⁰ Στην αντίδραση, μια αλκοόλη δρα ως πηγή υδρογόνου και το μοριακό οξυγόνο ως πηγή οξυγόνου, για την ασφαλή *in situ* σύνθεση

H₂O₂ (Σχήμα 99), έτσι ώστε η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί απουσία επικίνδυνων αερίων ή μιγμάτων H₂/O₂.



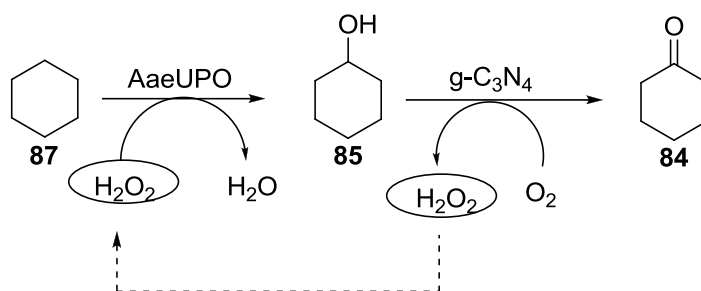
Σχήμα 99. Αντίδραση οξείδωσης με χρήση καταλύτη g-C₃N₄

Ο καταλύτης g-C₃N₄ ενεργοποιείται από το ορατό φως (>420 nm) σε μίγμα νερού-αλκοόλης και με το οξυγόνο παράγεται H₂O₂ σε υψηλή απόδοση. Ο φωτοευαίσθητος καταλύτης προκαλεί εκλεκτική αναγωγή δυο ηλεκτρονίων του οξυγόνου μέσω σχηματισμού ενός 1,4-ενδοπεροξειδίου στην επιφάνεια του, στάδιο f.⁹¹ Έτσι καταστέλλει την αναγωγή ενός ηλεκτρονίου του οξυγόνου και προωθείται η εκλεκτική σύνθεση του H₂O₂ (Σχήμα 100). Η ενεργοποίηση του g-C₃N₄ από το φως του ηλίου, επίσης οδηγεί σε επιτυχή παραγωγή H₂O₂. Η παραπάνω διαδικασία έχει πολλά πλεονεκτήματα, εφόσον χρησιμοποιείται ένας οικονομικός και μη μεταλλικός καταλύτης, διαθέσιμη και οικονομική πηγή φωτός, και ασφαλής πηγή υδρογόνου και ήπιες συνθήκες αντίδρασης.



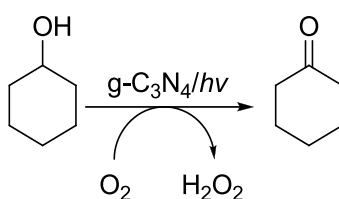
Σχήμα 100. Μηχανισμός δράσης g-C₃N₄

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη την πρόσφατα δημοσιευμένη νέα αυτή μεθοδολογία, σχεδιάστηκε μια νέα προσέγγιση για την σύνθεση κυκλοεξανόνης με αντικατάσταση του συστήματος TADH/NAD⁺/FMN από τον καταλύτη g-C₃N₄, ώστε να παραχθεί H₂O₂, το οποίο είναι σημαντικό για την δράση της AaeUPO. Το νέο αυτό προτεινόμενο σύστημα γίνεται πιο απλό, με μικρότερη ποσότητα συμπαραγόντων και ανακυκλωτικών (Σχήμα 101).



Σχήμα 101. Νέα προτεινόμενη αντίδραση 2 σταδίων, με σκοπό την ενεργοποίηση της μεθυλενικής ομάδας του κυκλοεξανίου **87** και την οξείδωση της σχηματιζόμενης ενδιάμεσης κυκλοεξανόλης **85**.

Βάσει τις βιβλιογραφίας,⁹⁰ πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του καταλύτη g-C₃N₄, με αρχικό υπόστρωμα αμινο-μεθανο-νιτρίλιο (CN₂H₂), και πραγματοποιήθηκε αρχικά μια αντίδραση οξείδωσης της κυκλοεξανόλης, ως δότη υδρογόνου για την σύνθεση της κυκλοεξανόνης κάτω από το φως του ήλιου για την ενεργοποίηση του καταλύτη (Σχήμα 102).



Σχήμα 932. Αντίδραση οξείδωσης κυκλοεξανόλης

Η κυκλοεξανόλη που χρησιμοποιήθηκε (9 mL) ήταν διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7, σε τελική συγκέντρωση 50 mM, με σκοπό να υπάρχει ένα μονοφασικό σύστημα και ο καταλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 40 mg. Η αντίδραση διήρκησε 72 ώρες, κάτω από το φυσικό φως και ακολούθησε μέτρηση με αέριο χρωματογράφο, από την οποία προσδιορίστηκε η ποσότητα της παραγόμενης

κυκλοεξανόνης σε 1.77 mM. Με αυτό το αποτέλεσμα από την δοκιμαστική αντίδραση με το νέο αυτό καταλύτη διαπιστώθηκε ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και στο σύστημα που μας ενδιαφέρει για την παραγωγή κυκλοεξανόνης κατευθείαν από κυκλοεξάνιο.

Το επόμενο βήμα ήταν να δοκιμαστεί ο συνδυασμός του συστήματος της *AaeUPO* με τον χημικό καταλύτη (Πίνακας 4). Οι παρακάτω αντιδράσεις διήρκησαν 3 ώρες και στις αντιδράσεις 1, 2 και 5 δεν παράχθηκε ούτε κυκλοεξανόνη ή κυκλοεξανόλη, ενώ στις αντιδράσεις 3, 4 και 6 η παραγωγή της κυκλοεξανόνης ήταν 0.12, 0.17 και 0.01 mM αντίστοιχα.

Πίνακας 4.

Entry	Catalyst (mg)	Cosolvent (mM)	Cyclohexanol (mM)	<i>AaeUPO</i> (μ L)
1	5	10 Ethanol	10	20
2	10	10 Ethanol	10	20
3	5	10 Cyclohexanol	10	20
4	10	10 Cyclohexanol	10	20
5	5	0	10	20
6	0	10 Cyclohexanol	10	20

Όταν χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ως επιπλέον διαλύτης, η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που παρουσίασε η ομάδα του Shiraiishi, οι οποίοι ανέφεραν την παραγωγή της ακεταλδεΐδης με αρχικό υπόστρωμα την αιθανόλη μέσω του καταλύτη γ - C_3N_4 . Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα, με διαφορετικές ποσότητες αιθανόλης (Πίνακας 5).

Πίνακας 5.

Entry	Catalyst (mg)	Ethanol (mM)	Cyclohexanol(mM)	<i>AaeUPO</i> (μ L)
1	10	5	10	20
2	10	10	10	20
3	10	20	10	20

Η αιθανόλη που χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον διαλύτης, δεν επηρέασε την σύνθεση της κυκλοεξανόνης. Η χαμηλή παραγωγή κυκλοεξανόνης όμως κάτω από αυτές τις συνθήκες, υποδεικνύει κάποιες επιπλοκές στον δεύτερο βήμα της αντίδρασης. Η *in*

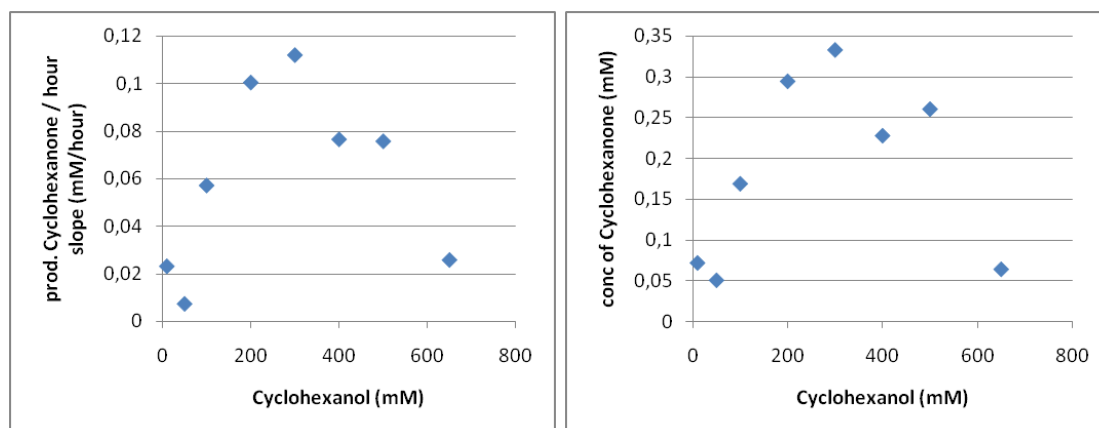
situ παραγωγή H₂O₂ πιθανά να μην είναι αρκετή για να ξεκινήσει το πρώτο βήμα της αντίδρασης, είτε είναι παραπάνω ποσότητα από την απαραίτητη και δρα παρεμποδιστικά στο πρώτο βήμα. Επιπλέον, η ποσότητα του καταλύτη, ή η αιθανόλη ή και η παραγόμενη ακεταλδεΐδη μπορεί να παρεμποδίζει την δράση της υπεροξειδάσης.

Γ' αυτό το λόγο, αποφασίστηκε η συστηματική διερεύνηση του δεύτερου βήματος της αντίδρασης, με σκοπό να προσδιοριστούν οι ιδανικές συνθήκες οξείδωσης της κυκλοεξανόλης σε κυκλοεξανόνη μέσω του φωτοκαταλυτικού συστήματος. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση της ιδανικής συγκέντρωσης της κυκλοεξανόλης. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6.

Entry	Cyclohexanol (mM)
1	10
2	50
3	100
4	200
5	300
6	400
7	500
8	650

Ο διαλύτης σε όλες τις αντιδράσεις ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 και η ποσότητα του καταλύτη ήταν 8 mg/mL διαλύματος αλκοόλης. Από τα παρακάτω γραφήματα (Σχήμα 103), παρατηρούμε ότι όταν η συγκέντρωση της κυκλοεξανόλης είναι 300 mM, έχουμε την μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης και παραγωγής κυκλοεξανόνης σε 3 ώρες αντίδρασης.



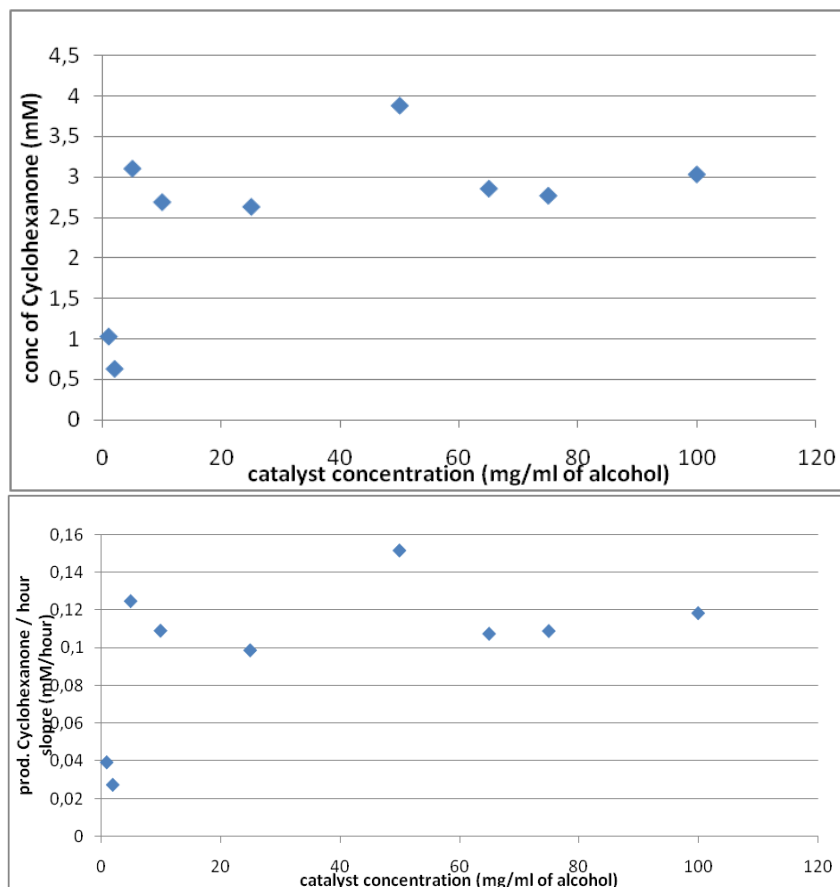
Σχήμα 103. α) ταχύτητα παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour) συναρτήσει αρχικής συγκέντρωσης κυκλοεξανόλης (mM) και β) τελική συγκέντρωση κυκλοεξανόνης (mM) συναρτήσει αρχικής συγκέντρωσης κυκλοεξανόλης (mM)

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, δεν προκύπτει κάποιο λογικό συμπέρασμα για την ιδανική ποσότητα κυκλοεξανόλης. Επομένως, στο επόμενο βήμα διατηρήθηκε σταθερή η ποσότητα του υποστρώματος στα 500 mM και διαφοροποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις του καταλύτη, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7.

Entry	Cyclohexanol (mM)	Catalyst (mg/mL)
1	500	1
2	500	2
3	500	5
4	500	10
5	500	25
6	500	50
7	500	65
8	500	75
9	500	100

Στα παρακάτω γραφήματα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Σχήμα 104) φαίνεται η συνολική κυκλοεξανόνη και η σύνθεση της ανά ώρα (mM/hour) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις καταλύτη (mg/mL διαλύματος). Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο λογικό συμπέρασμα που να αφορά την σχέση του παραγόμενου προϊόντος με την ποσότητα του καταλύτη.



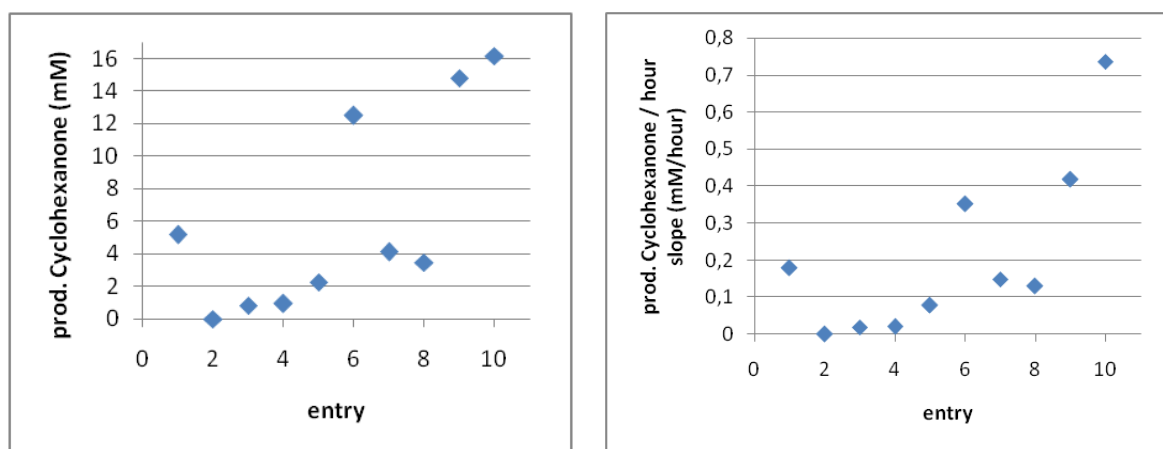
Σχήμα 104. α) παραγόμενη συγκέντρωση κυκλοεξανόνης (mM) συναρτήσει της συγκέντρωσης του καταλύτη (mg/mL αλκοόλης) και β) ταχύτητα παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour) συναρτήσει της συγκέντρωσης του καταλύτη (mg/mL αλκοόλης)

Μετά από τις αποτυχημένες προσπάθειες που περιγράφηκαν, αποφασίστηκε η αλλαγή προσέγγισης οπότε σχεδιάστηκαν κάποια συστηματικά πειράματα ελέγχου, στα οποία κάθε φορά θα αποκλείεται ένα αντιδρών/παράγοντας που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση (Πίνακας 6). Τα πειράματα ελέγχου μπορεί να μας οδηγήσουν σε πολύ σημαντικά συμπεράσματα, αναφορικά με το πόσο απαραίτητη είναι η παρουσία κάποιου αντιδρώντος/παράγοντα στην αντίδραση, παρακολουθώντας την πορεία της ταχύτητας της αντίδρασης και την παραγωγή της κυκλοεξανόνης. Σχεδιάστηκαν λοιπόν, με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποκλείεται κάθε φορά ένα μόνο αντιδρών/παράγοντας, όπως καταλύτης ή κυκλοεξανόλη, διαλύτης, παροχή αερίου ή επιδραση φωτός, σε κάθε πείραμα, με σκοπό να παρατηρηθεί η επίδραση τους στην αντίδραση.

Πίνακας 8.

Entry	Cyclohexanol (mM)	Catalyst	Light	Air bubbling	Buffer	Comments
1	500	4	+	+	+	Ultrasound and catalyst in block form
2	-	4	+	+	+	
3	500	-	+	+	+	
4	500	4	-	+	+	
5	500	4	+	-	+	N2 bubbling
6	500	4	+	+	-	no ultrasound
7	500	4	+	+	+	
8	500	4	+	-	+	
9	500	4	+	-	-	
10	500	4	+	-	-	Powder catalyst

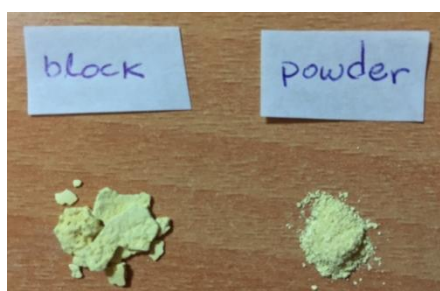
Οι μετρήσεις έδειξαν ότι υψηλή ταχύτητα και παραγωγή κυκλοεξανόνης παρατηρήθηκε στις αντιδράσεις 6 και 9, όπου και στις δυο περιπτώσεις δεν χρησιμοποιήθηκε διαλύτης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών). Ενδιαφέρον επίσης ήταν και το αποτέλεσμα της αντίδρασης 10, όπου δεν χρησιμοποιήθηκε διαλύτης και ο καταλύτης ήταν σε μορφή σκόνης (Σχήμα 105).



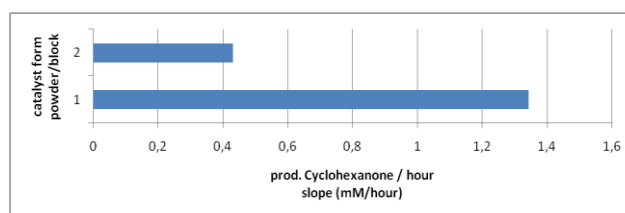
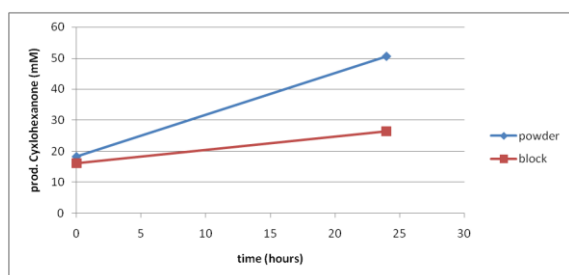
Σχήμα 105. α) παραγόμενη κυκλοεξανόνη (mM) συναρτήσει συνθηκών αντίδρασης (entries από Πίνακα 6) και β) ταχύτητα παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour) συναρτήσει συνθηκών αντίδρασης (entries από Πίνακα 6)

Το παραπάνω σημαντικό αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η μορφή του καταλύτη παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν δυο συγκριτικές

αντιδράσεις στην πρώτη περίπτωση με καταλύτη σε μορφή νιφάδων (block) και στην δεύτερη περίπτωση σε μορφή σκόνης.



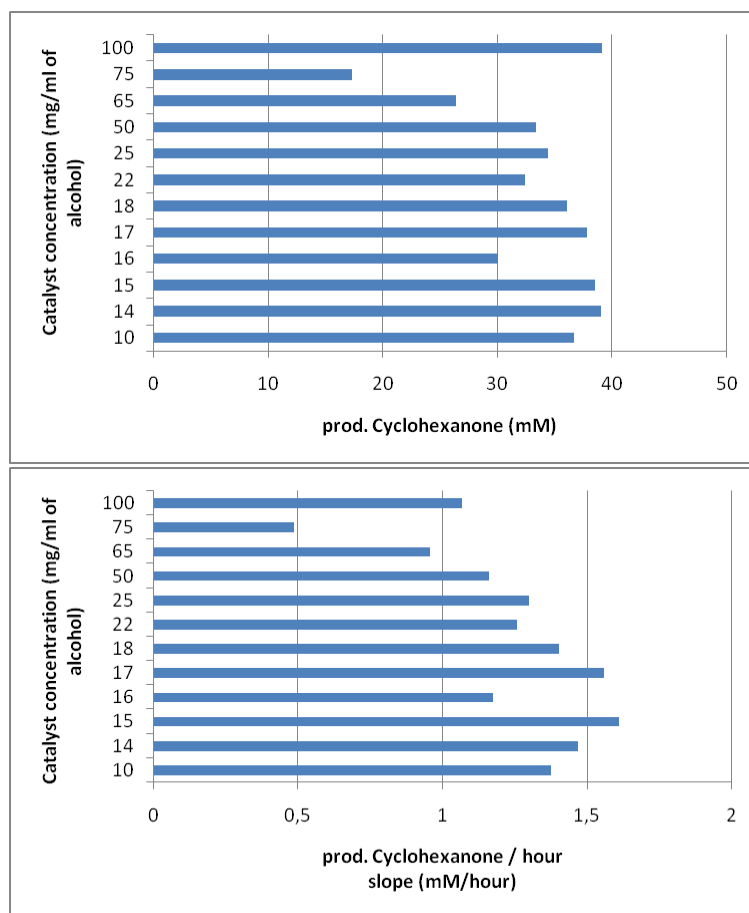
Ο καταλύτης σε μορφή σκόνης παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα έναντι του καταλύτη σε μορφή block, λόγω αυξανόμενης ομοιογένειας του μίγματος αντίδρασης (Σχήμα 106). Έτσι και η αντίδραση προχωράει με μεγαλύτερη ταχύτητα όπως φαίνεται και στα γραφήματα παρακάτω.



Σχήμα 106. α) παραγόμενη κυκλοεξανόνη (mM) συναρτήσει χρόνου αντίδρασης και β) μορφή καταλύτη συναρτήσει ταχύτητας παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour)

Από τα παραπάνω πειράματα, συμπεραίνεται λοιπόν ότι η αντίδραση προχωρεί καλύτερα χωρίς διαλύτη και ότι ο καταλύτης προτιμάται να είναι σε μορφή σκόνης.

Μετά από αυτά τα θετικά αποτελέσματα επαναλήφθηκαν τα πειράματα με τις διαφορετικές ποσότητες καταλύτη, αλλά αυτή τη φορά σε μορφή σκόνης. Παρατηρήθηκε ότι η ιδανική συγκέντρωση καταλύτη είναι 15 mg/mL κυκλοεξανόλης, όπως φαίνεται και στα Σχήματα (Σχήμα 107) που αφορούν στην ταχύτητα της αντίδρασης και την παραγόμενη κυκλοεξανόνη.



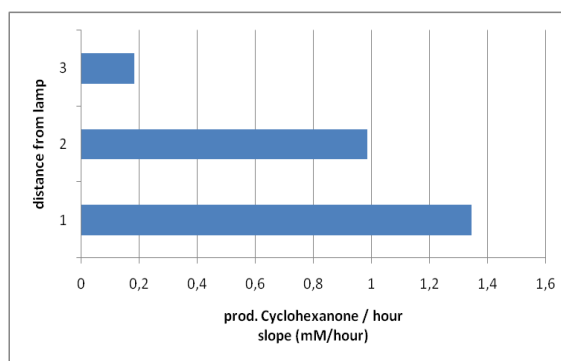
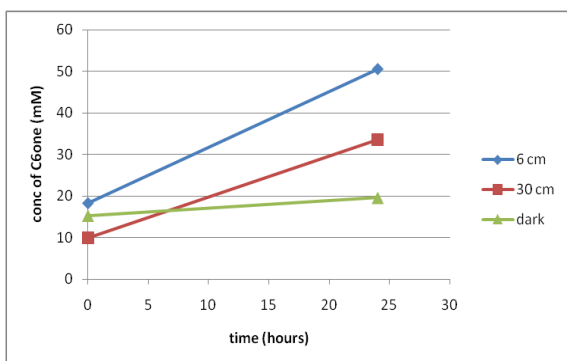
Σχήμα 107. α) συγκέντρωση καταλύτη (mg/mL αλκοόλης) συναρτήσει της παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM) και β) συγκέντρωση καταλύτη (mg/mL αλκοόλης) συναρτήσει της ταχύτητας της παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour)

Ένας επιπλέον παράγοντας που μελετήθηκε είναι η απόσταση του μίγματος αντίδρασης από την πηγή φωτός (Πίνακας 7).

Πίνακας 9.

Entry	Cyclohexanol	Catalyst (mg/mL)	Distance from the lamp
1	1mL	15	6 cm
2	1mL	15	30 cm
3	1mL	15	Dark conditions

Όπως είναι λογικό, καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν όταν η αντίδραση βρίσκεται κοντά στην πηγή φωτός (Σχήμα 108).

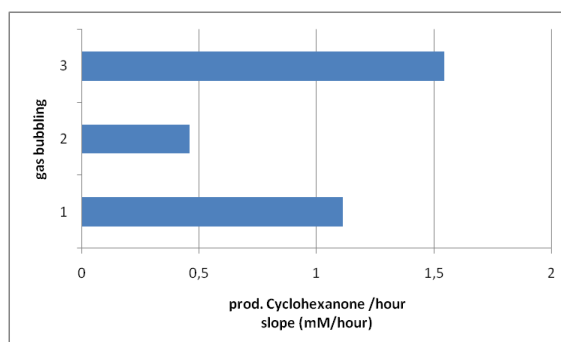
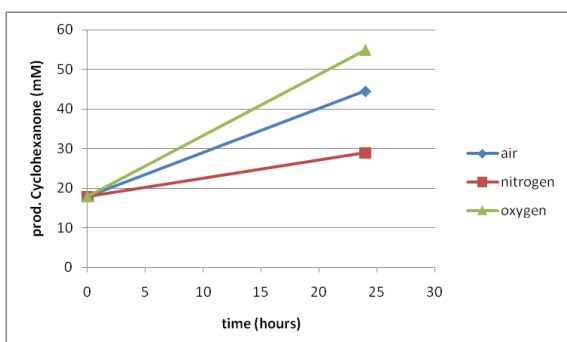


Σχήμα 108. α) συγκέντρωση παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM) συναρτήσει χρόνου αντίδρασης (hours) και β) απόσταση από την πηγή φωτός συναρτήσει ταχύτητας παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour)

Επίσης, βάσει της πρόσφατης βιβλιογραφίας,⁹⁰ το οξυγόνο λαμβάνει μέρος στην σύνθεση του H_2O_2 . Γι'αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε αντίδραση με συνεχή ροή οξυγόνου. Παράλληλα εξετάστηκε η περίπτωση συνεχούς ροής συνθετικού αέρα και αζώτου, διατηρώντας το υπόλοιπο σύστημα ίδιο και στις τρεις περιπτώσεις.

Entry	Cyclohexanol	Catalyst (mg/mL)	Gas Bubbling
1	1mL	15	air
2	1mL	15	nitrogen
3	1mL	15	oxygen

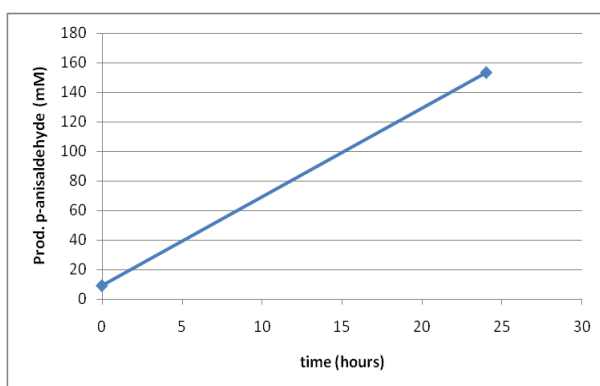
Καλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε στην περίπτωση συνεχούς ροής οξυγόνου (Σχήμα 109). Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι ο καταλύτης δεν υπέστη απαέρωση πριν την αντίδραση, γι'αυτό και στην περίπτωση ροής αζώτου παρατηρείται ένα μικρό ποσοστό παραγωγής κυκλοεξανόνης.



Σχήμα 109. α) παραγόμενη κυκλοεξανόνη (mM) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης (hours) και β) ροή αερίου συναρτήσει της ταχύτητας της παραγόμενης κυκλοεξανόνης (mM/hour)

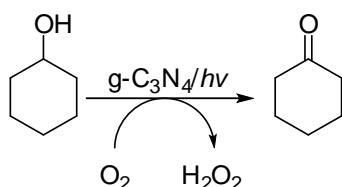
Συμπερασματικά από όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν, προσδιορίστηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες για την αντίδραση οξείδωσης. Οι συνθήκες αυτές συνοπτικά είναι: καταλύτης σε μορφή σκόνης με συγκέντρωση 15 mg/mL αλκοόλης, και μικρή απόσταση (~6 cm) από την πηγή φωτός.

Σε αυτές τις συνθήκες αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε και η αντίδραση οξείδωσης της 4-μεθοξυ-φαινυλο-μεθανόλης, όπου τελικά σχηματίστηκαν 144 mM 4-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη με ταχύτητα 6 mM/hour (Σχήμα 110).



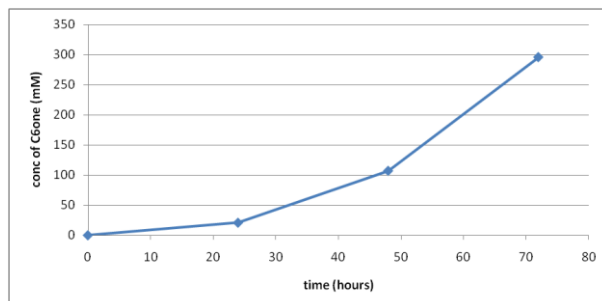
Σχήμα 110. Παραγόμενη 4-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη συναρτήσει χρόνου αντίδρασης

Τέλος, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο κτίριο του Τμήματος Χημείας, ώστε να βρεθεί αν επιδρά το φυσικό φως του ηλίου στην αντίδραση είτε με αύξηση είτε με μείωση της παραγόμενης κυκλοεξανόνης (Σχήμα 111).



under lamp: slope 1.82 mM/hour

under sunlight: slope **4.06 mM/hour**



Σχήμα 111. Παραγόμενη κυκλοεξανόνη συναρτήσει χρόνου αντίδρασης με πηγή φυσικό φως (ήλιο)

Σημαντικό αποτέλεσμα είναι ότι ενώ δίπλα στην τεχνητή πηγή φωτός-λάμπα η ταχύτητα ήταν 1.82 mM/hour, κάτω από το φυσικό φως του ήλιου η ταχύτητα οξείδωσης της κυκλοεξανόλης υπολογίστηκε στα 4.06 mM/hour και με τελική συγκέντρωση κυκλοεξανόνης 296 mM.

Τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων που περιγράφηκαν συνολικά έδειξαν ότι ο καταλύτης $\text{g-C}_3\text{N}_4$ μπορεί να πραγματοποιήσει αντιδράσεις οξείδωσης δευτεροταγών αλκοολών κάτω από ήπιες συνθήκες, χωρίς την χρήση διαλυτών, περαιτέρω καταλυτών και ανακυκλωτικών συστημάτων. Η έρευνα αυτή συνεχίζεται.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.⁶²

Όργανα

Η πορεία των αντιδράσεων καθώς και οι μετατροπές μελετήθηκαν με τον αέριο χρωματογράφο της Shimadzu 2014 με ανιχνευτή FID και κολώνα crwax 52 CB.

Αντίδραση Φωτοξείδωσης

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 60 mg καταλύτη g-C₃N₄ και 4 mL υποστρώματος κυκλοεξανόλης, με τελική συγκέντρωση καταλύτη 15 mg/mL. Η φιάλη σφραγίστηκε, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση ποσότητας υποστρώματος και προϊόντος. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, 303 K, ώστε να παραμένει σταθερή καθόλη την διάρκεια της αντίδρασης και τοποθετήθηκε και η πηγή φωτός, μια λάμπα 150 W. Η αντίδραση αφέθηκε για 24 ώρες, και δείγματα 100 μL για την παρακολούθηση της αντίδρασης ελήφθησαν και εκχυλίστηκαν με 200 μL διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα.

Τα δείγματα αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο. Για τον ποσοτικά προσδιορισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε δωδεκάνιο ως εσωτερικό πρότυπο κατά την εισαγωγή του δείγματος (injectionstandard) σε συγκέντρωση 1% στο διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα.

Βιβλιογραφία

1. Melanie, H., Bommarius A. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 4088
2. Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Holtmann, D. *Green Chem.*, **2011**, *13*, 2285
3. Riva S. *Trends in Biotechnology*, **2013**, *31*, 120
4. Faber, K. "Biotransformation in organic Chemistry", 3rd Edition, Springer, **1997**
5. Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, 44
6. Zhou, B., Copalan, S. A., Vanmiddlesworth, F., Shieh, W., Sih, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5925
7. Fauve, A., Veschambre, H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5215
8. Lee, S. Y., Hong, H. J., Jeon, Y. N., Won, K., Kim, T. B. *Org. Process Res. & Dev.* **2004**, *8*, 948
9. Miya, H., Kawada, M., Sugiyama, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 95
10. Drauz, K., Gröger, H., May, O. "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis", Willey, **2012**, p22
11. Rothenberg, G., *Catalysis - Concepts and Green Application*, Willey, **2008**, p194
12. a) Jencks, W. P. *Phil. Trans. Roy. Soc. Seri. A:Math., Phys. Eng.*, **1993**, *3*, 345; b) Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 513
13. a) Chaparro-Riggers, J. F., Rogers, T. A., Vazquez-Figueroa, E., Polizzi, K. M., Bommarius, A. S. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1521 b) Stampfer, W., Kosjek, B., Moitzi, C., Kroutil, W., Faber, K. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1014
14. Iedema, P. D., Hoefsloot, H. C. J. *Macromol. Theor. Simul.*, **2001**, *10*, 855
15. Forrest, G. L., Gonzales, B. *Chem-Biol. Interact.* **2000**, *129*, 21
16. Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harada, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2659
17. Bradshaw, C. W., Fu, H., Shen, G. J., Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526
18. Bradshaw, C. W., Hummel, W., Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532
19. Nakamura, K., Yoneda, T., Miyai, T., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2453
20. Jones, J. B. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351
21. Velonia, K., Tsigos, I., Bouriotis, V., Smonou, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 65

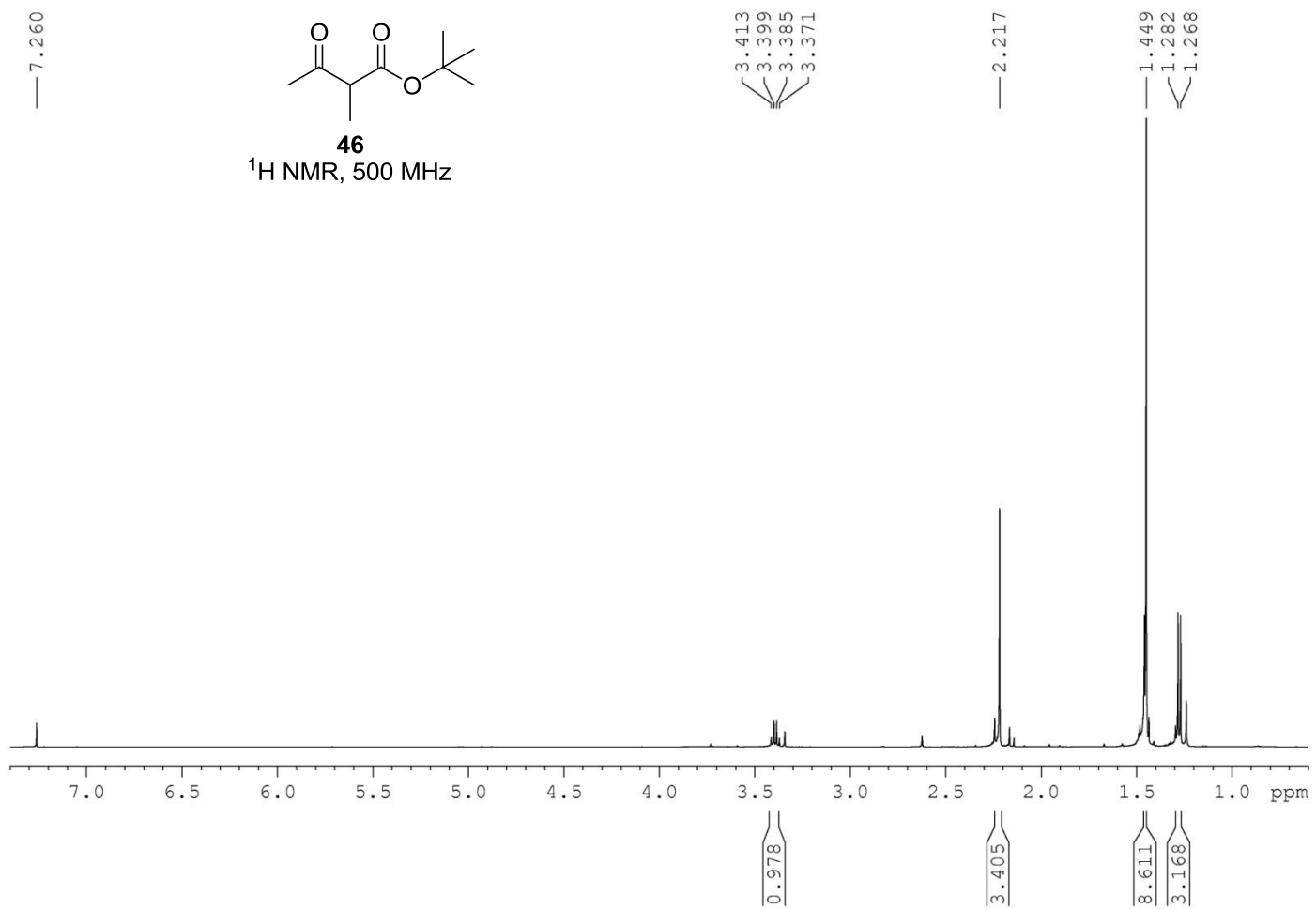
22. Asako, H., Shimizu, M., Makino, Y., Itoh, N. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 2664
23. Hanson, R. L., Bembenek, K. S., Patel, R. N., Szarka, L. J. *Appl. Microb. Biotechnol.* **1992**, *37*, 599
24. Muller M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 362-365
25. Ema, T., Okita, N., Ide, S., Sakai, T. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1175
26. Wolberg M., Hummel W., Muller M, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 4562
27. Lüdeke S., Richter M., Muller M., *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 253
28. a) Shae, A., Motamedi, H., King, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, *49*, 709; b) Rozzell, D., Liang, J. *Specialty Chem. Mag.*, **2008**, *28*, 36
29. Kambourakis, S., Rozzell, J. D. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 663
30. Kaluzna, I. A., Rozzell, J. D., Kambourakis, S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 3682
31. Wong, C. H., Whitesides, G. M. "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, London, **1993**
32. Wong, C. H., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890
33. Oppenheimer, N. J., Kaplan, N. O. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4675
34. Shaked, Z., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104
35. Lamed, R., Keinan, E., Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144
36. Wong, C. H., Drueckhammer, D. G., Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028
37. Kalaitzakis, D., Rozzell, D. J., Kambourakis, S., Smonou, I. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4799
38. Eustache, F., Dalko, J. P., Cossy, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8823
39. Schmitz, F. J., Gunasekera, S. P., Yalamanchili, G., Hossain, M. B., Van der Helm, D. J. *Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7251
40. Kalaitzakis, D., Rozzell, D. J., Smonou, I., Kambourakis, S. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348*, 1958
41. Norcross, R. D., Paterson, I. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2041
42. Borgos, S. E. F., Tsan, P., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Lancelin, J. -M., Zotchev, S. B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2431
43. Kalaitzakis, Smonou, I. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 9431
44. a) Kalaitzakis, Smonou, I. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 8658; b) Simon, R. C., Richter, N., Busto, E., Kroutil, W., *ACS catal.*, **2014**, *4*, 129; c) de Gonzalo, G., Lavandera, I., Faber, K.,

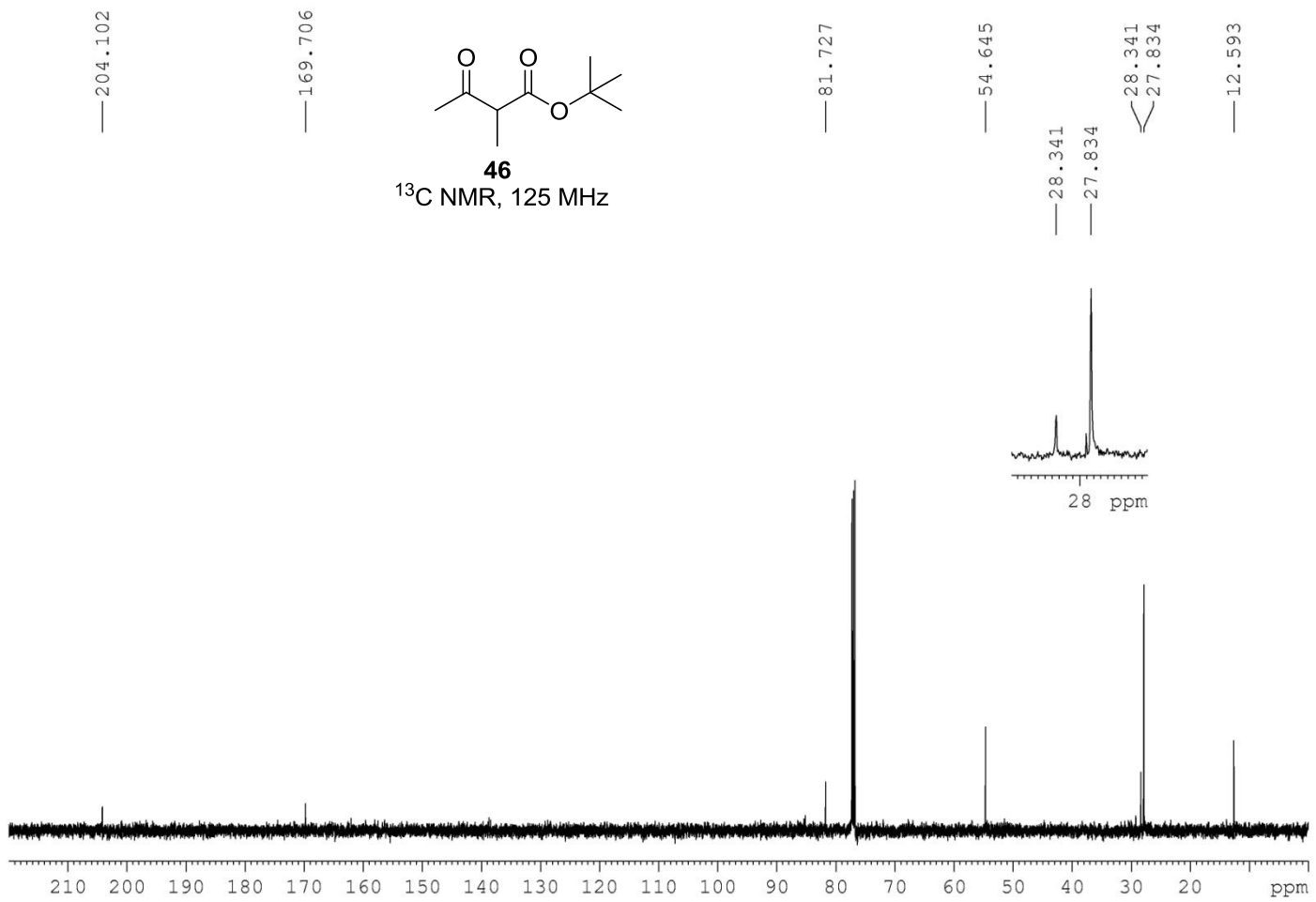
- Kroutil, W. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 2163; d) Kraußer, M., Hummel, W., Gröger, H., *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 5175
45. Liang, J., Lalonde, J., Borup, B., Mitchell, V., Mundorff, E., Trinh, N., Kochrekar, D. A., Cherat, R. N., Pai, G. *Org. Proc. Res. and Dev.*, **2010**, *14*, 193
46. Gebauer, J., Arseniyadis, S., Cossy, J. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3425
47. Wolberg, M., Hummel, W., Wandrey, C., Müller, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306
48. a) Blandin, V., Carpentier, J.-F., Mortreux, A. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 3421; b) Shao, L., Kawano, H., Saburi, M., Uchida, Y. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 1997 ; c) Shao, L., Seki, T., Kawano, H., Saburi, M. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 7699 ; d) Sayo, N., Saito, T., Kumobayashi, H., Akutagawa, S., Noyori, R., Takaya H. *Chem. Abstr.*, **1989**, *111*, 114745
49. a) Patel, R. N., Banerjee, A., McNamee, C. G., Brzozowski, D., Hanson, R. L., Szarka, L. *J. Enzyme Microb. Technol.* ,**1993**, *15*, 1014; b) Patel, R. N., McNamee, C. G., Banerjee, A., Szarka L. J. *Chem. Abstr.*, **1994**, *120*, 52826
50. Kumar, R. N., Meshram H. M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1003
51. Boucard, V., Broustal, G., Campagne, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 225
52. a) Hoffmann R. W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1992**, *31*, 1124; b) Bodo, B., Trowitzsch-Kienast, W., Schomburg, D. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 847
53. Solladie, G., Bauder, C., Rossi, L. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7774
54. Kumar, R. N., Meshram, H. M. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 1003
55. Wolberg, M., Filho, M.V., Bode, S., Geilenkirchen, P., Feldmann, R., Liese, A., Hummel, W., Müller, M. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2008**, *31*, 183
56. Fatima, A., Kohn, L., Aparecida, M., Carvalhob, J., Pillia, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5437
57. a) Green, M. E., Rech, J. C., Floreancig, P. E. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 7427; b) Cheng, Z., Xiaoqiang, S., Scott, N. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5352
58. Dale, J.A., Mosher, H.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512
59. Trost, B.M., Belletire, J.L., Godleski, S., Mcdougal, P.G., Balkovec, J.M., *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370
60. Seco, J.M., Quinoa, E., Riguera, R., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17

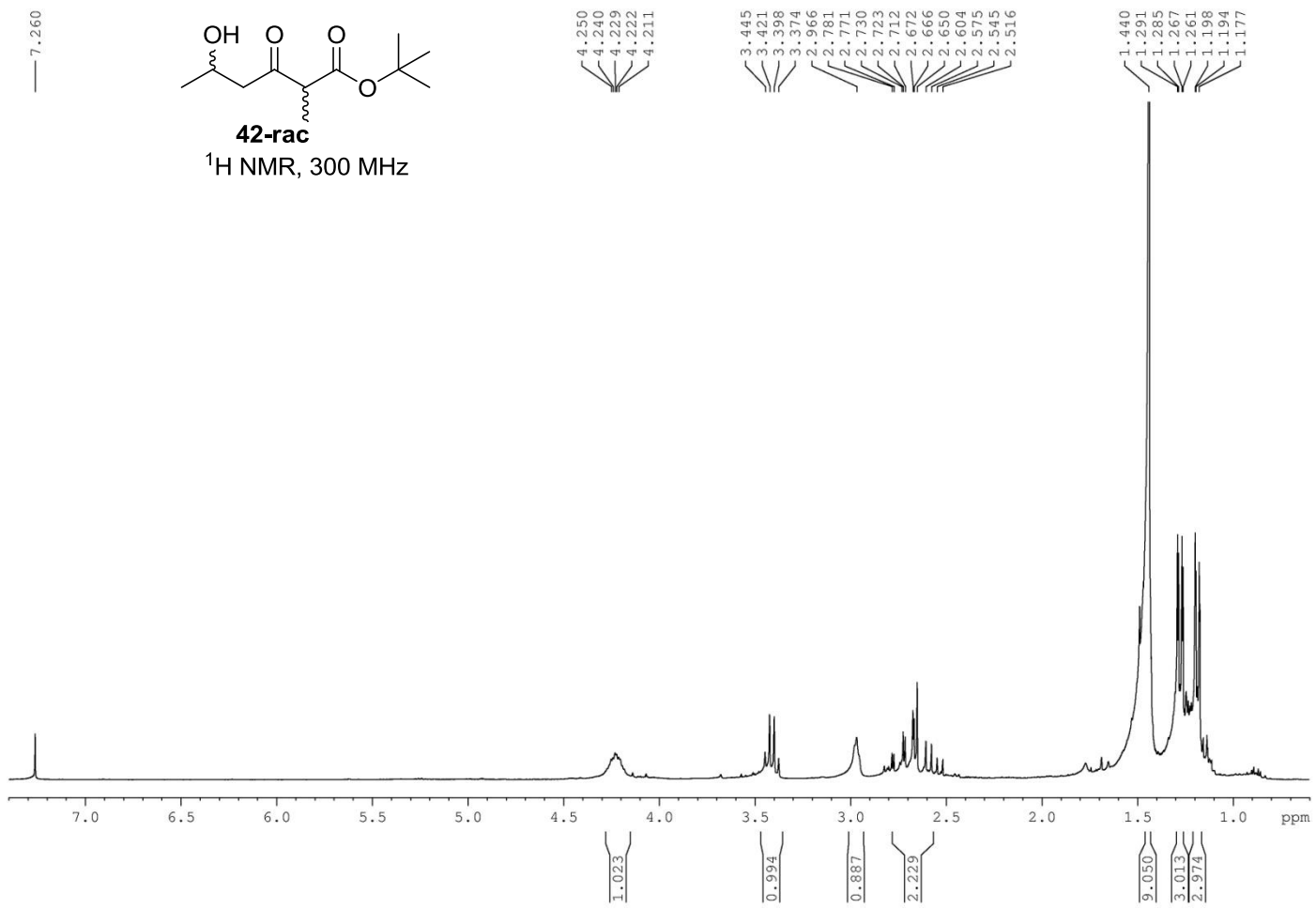
61. A. B. Μπαριωτάκη, «Βιοκαταλυτικές αναγωγές β,δ-δικέτο εστέρων», Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης: Απομόνωση και σύνθεση φυσικών προϊόντων με βιολογική δραστικότητα, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο 2011 ;Bariotaki, A., Kalaitzakis, D., Smonou, I. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 1792
62. Blanchard, J.S., *Methods in Enzymol.*, **1984**, *104*, 404
63. Marco, J. A., Carda, M., Murga, J., Falomin, E. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 2929
64. Tian, Z., Chen, S., Zhang, Y., Huang, M., Shi, L., Huang, F., Fong, C., Yang, M., Xiao, P., *Phytomedicine*, **2006**, *13*, 181
65. Shen, X.-Q., Waswirth, A. S., Zhao, J.-P., Zhu, C., Nelson, S. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7438
66. Curran, D. P., Moura-Letts, G., Pohiman, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2423
67. Chavez, D. E., Jacobsen, E. N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3667
68. Kalaitzakis, D., Rozzell, D. J., Kambourakis, S., Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 2309
69. Kalaitzakis, D., Kambourakis, S., Rozzell, D. J., Smonou, I. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2418
70. Kallergi, M., Kalaitzakis, D., Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3946
71. Kalaitzakis, D., Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 43
72. a) De Fatima, A., Kohn, L. K., Antônio, M. A., De Carvalho, J. E., Pilli, R. A. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 2927; b) Harsh, P., O'Doherty, G. A. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 5051; c) Boucard, V., Broustal, G., Campagne, J. M. *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 225
73. Sabitha, G., Sudhakar, K., Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 8599
74. Pospíšil, J., Markó, I. E. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 5933
75. De Fatima, A., Kohn, L. K., De Carvalho, J. E., Pilli, R. A. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 622
76. Gruttadauria, M., Lo Meo, P., Noto, R. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 83
77. Xuan, J., Xiao, W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 6828
78. G. Rothenberg (ed.): *Catalysis, Concepts and Green Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim **2008**, p129
79. Peter, S., Karich, A., Ullrich, R., Gröbe, G., Scheibner, K., Hofrichter, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2014**, *103*, 47

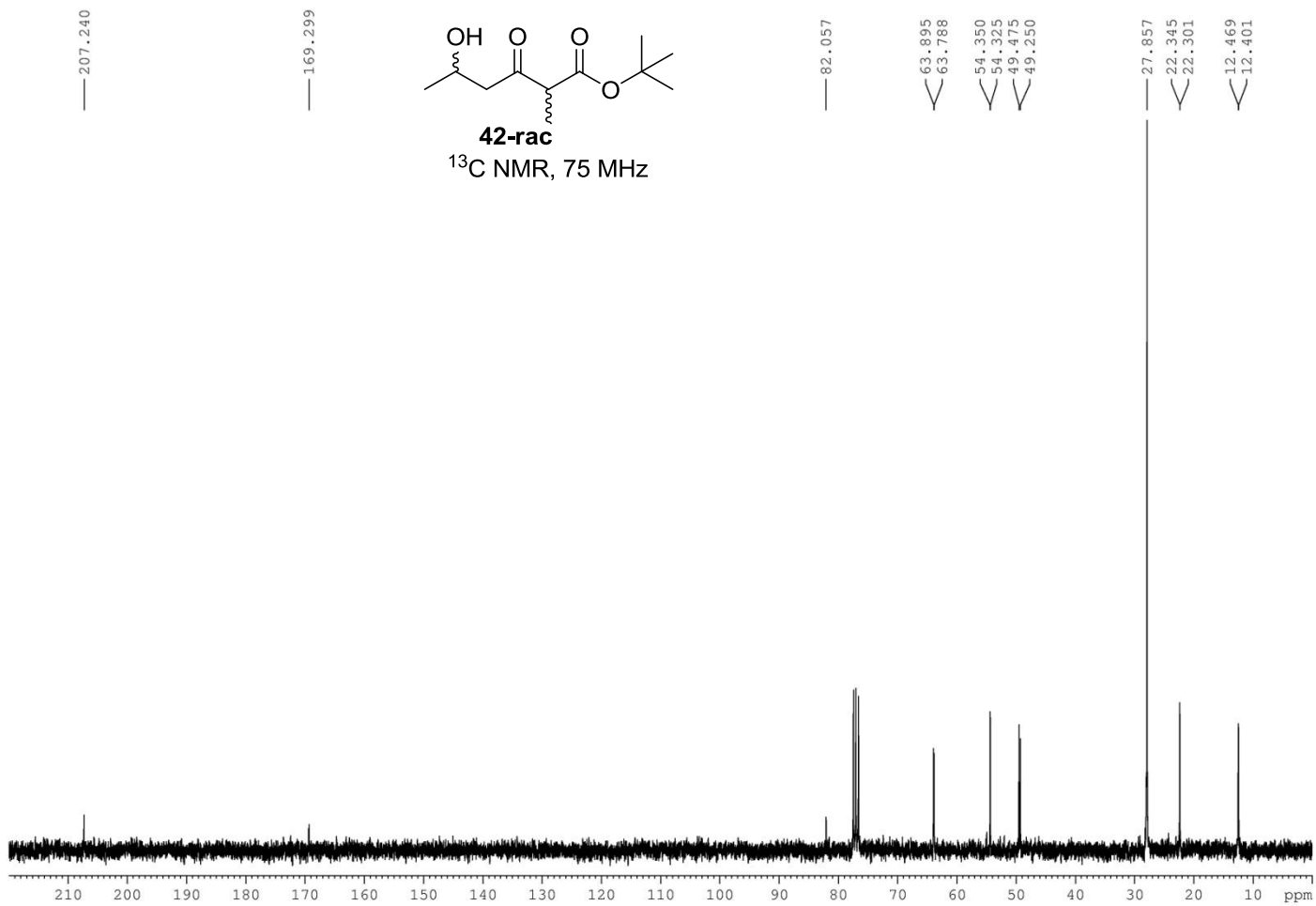
80. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2011**, p217
81. Sun, Z., Li, G., Liu, L., Liu, H. *Catal. Commun.*, **2012**, 27, 200
82. Zhou, L., Xu, J., Miao, H., Wang, F., Li, X. *Appl. Catal. A-Gen.*, **2005**, 292, 223
83. a) Romero, A., Santos, A., Ercrig, D., Simón, E. *Appl. Catal. A-Gen.*, **2011**, 392, 19; b) Kumar, V. S., Reddy, S. S., Padmasri, A. H., Raju, B. D., Reddy, I. A., Rama Rao, K. S. *Catal. Commun.*, **2007**, 8, 899; c) Fridman, V. Z., Davydov, A. A., Titievsky, K. *Journal of Catalysis*, **2004**, 222, 545
84. Yuan, H.-X., Xia, Q.-H., Zhan, H.-J., Lu, X.-H., Su, K.-X. *Appl. Catal. A-Gen.*, **2006**, 304, 178
85. Ilyas, M., Ikramullah, *Catal. Commun.*, **2004**, 5, 1
86. Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 87, 871
87. a) Maurer, S. C., Kühnel, K., Kausser, L. A., Eiben, S., Schmid, R. D., Urlacher, V. B. *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, 347, 1090; b) Peter, S., Kinne, M., Wang, X., Ullrich, R., Kayser, G., Groves, J. T., Hofrichter, M. *FEBS journal*, **2011**, 278, 3667
88. a) Churakova, E., Kluge, M., Ullrich, R., Arends, I., Hofrichter, M., Hollmann, F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 10716; b) Churakova, E., Arends, I. W. C. E., Hollmann, F. *Chem. Cat. Chem.*, **2013**, 5, 565
89. a) Garguilo, S., Opperman, D. J., Hanefeld, U., Arends, I. W. C. E., Hollmann, F. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 6630; b) Garguilo, S., Arends, I. W. C. E., Hollmann, F. *Chem. Cat. Chem.*, **2011**, 3, 338
90. Shiraishi, Y., Kanazawa, S., Sugano, Y., Tsukamoto, D., Sakamoto, H., Ichikawa, S., Hirai, T. *ACS Catal.*, **2014**, 4, 774
91. a) Shiraishi, Y., Kanazawa, S., Tsukamoto, D., Shiro, A., Sugano, Y., Hirai, T., *ACS Catal.*, **2013**, 3, 2222; b) Shiraishi, Y., Sugano, Y., Tanaka, S., Hirai, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1656; c) Huda, M.N., Turner, J. A. *J. Appl. Phys.*, **2010**, 107, 123703; d) Nakamura, R., Imanishi, A., Murakoshi, K., Nakato, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 7443; e) Fidler, H., Lauer, A., Freyer, W., Koeppe, B., Heyne, K. *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, 6289; f) Zhang, M., Wang, Q., Chen, C., Zang, L., Ma, W., Zhao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 6081

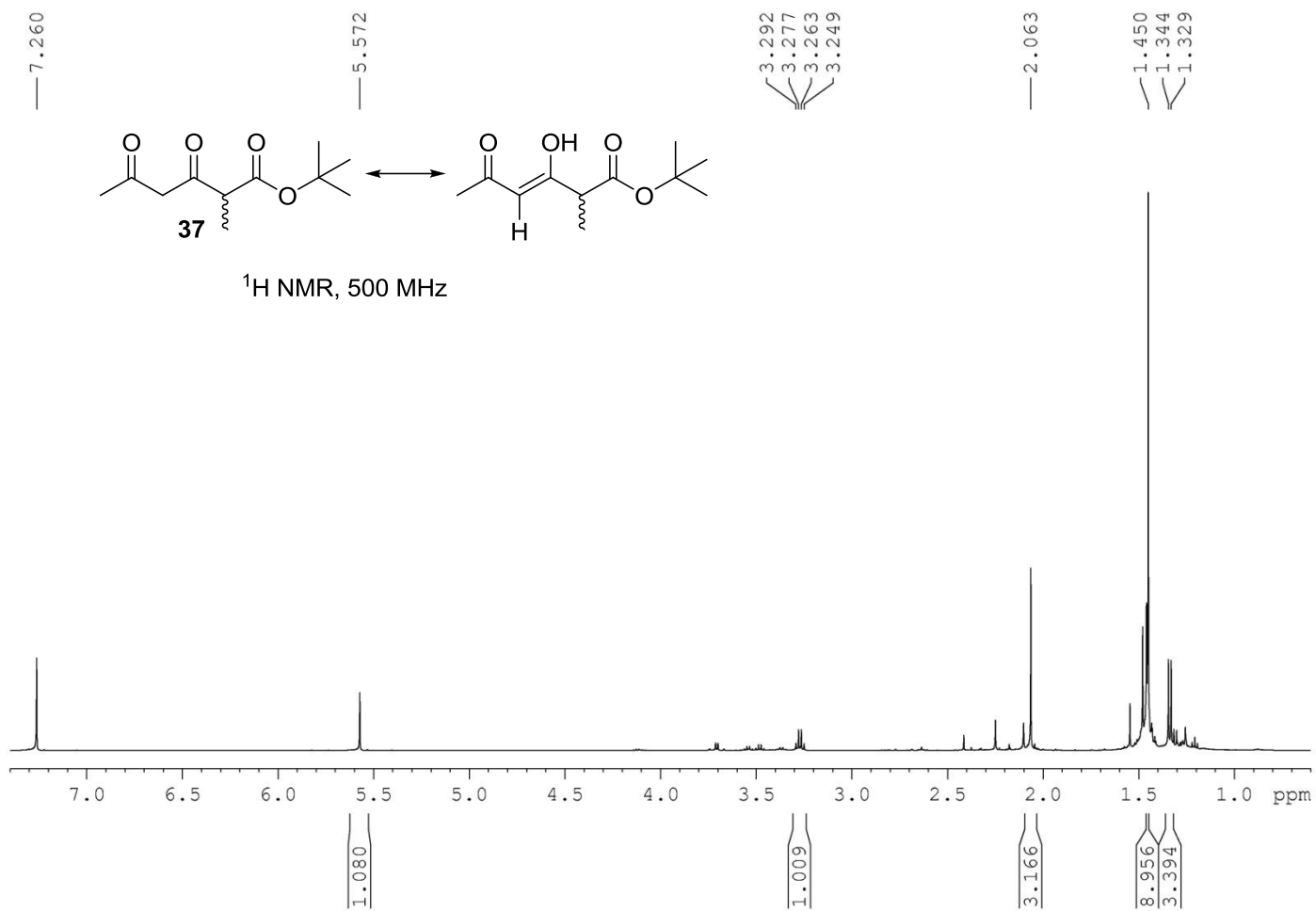
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1
ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H και ^{13}C NMR

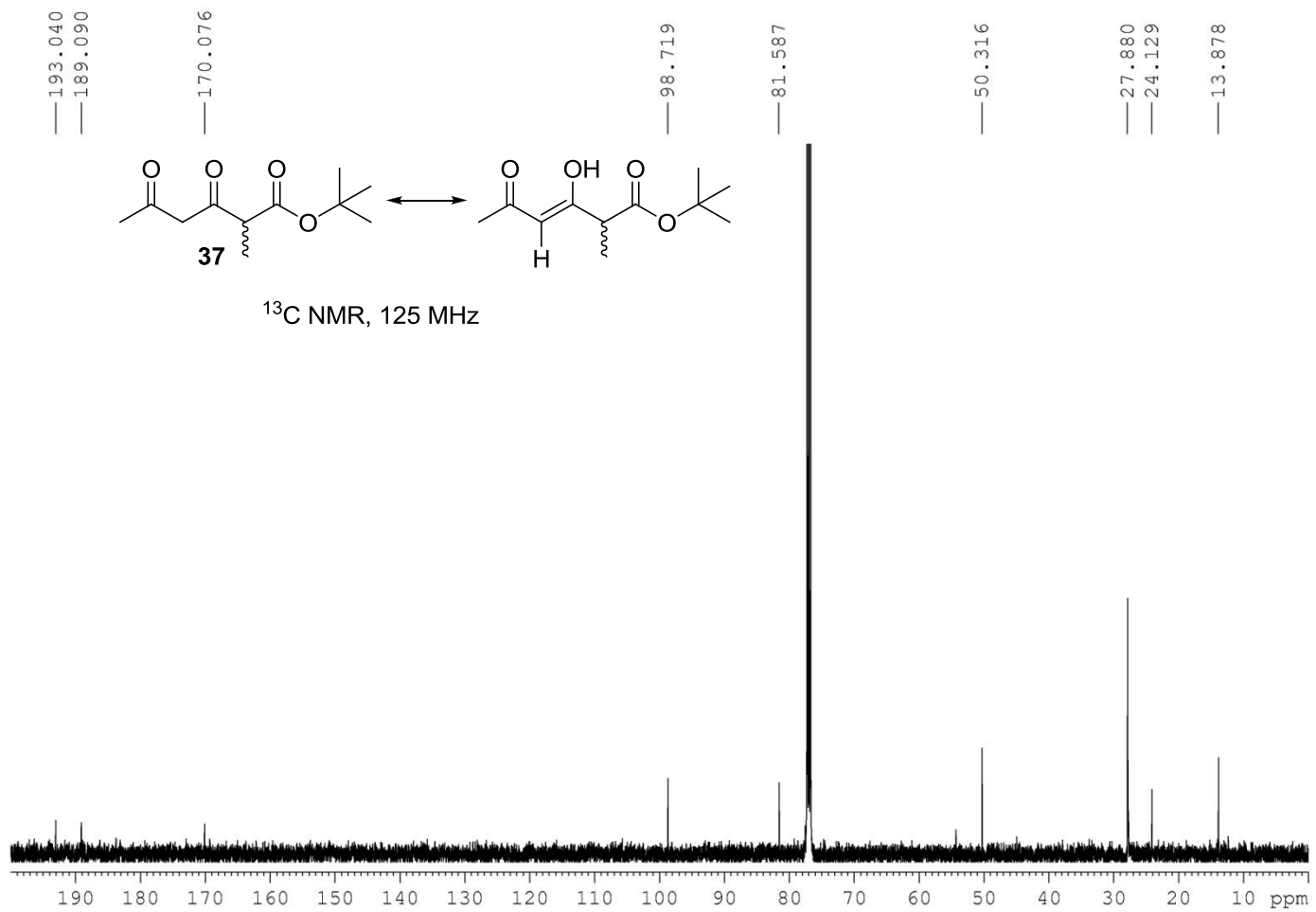


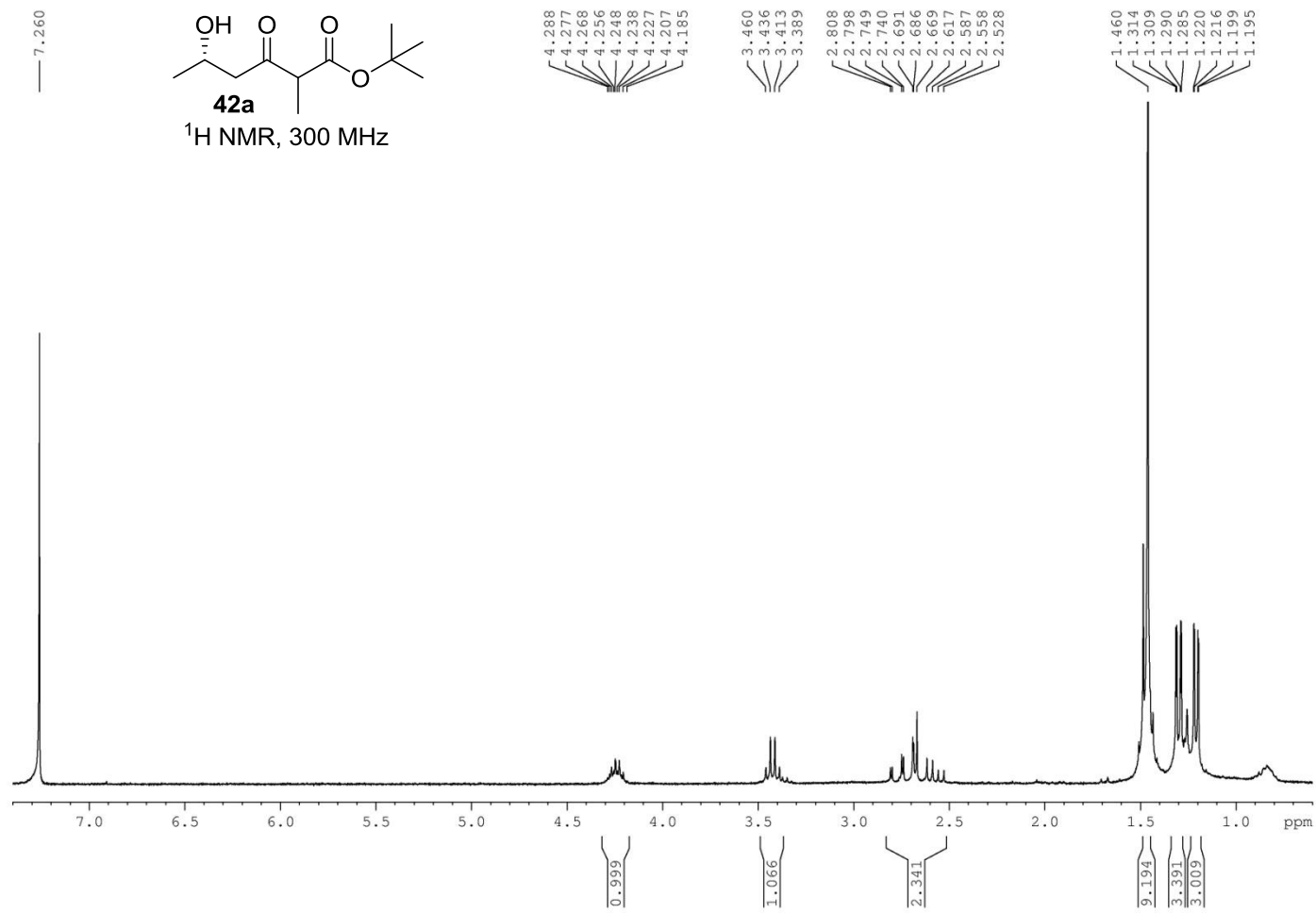


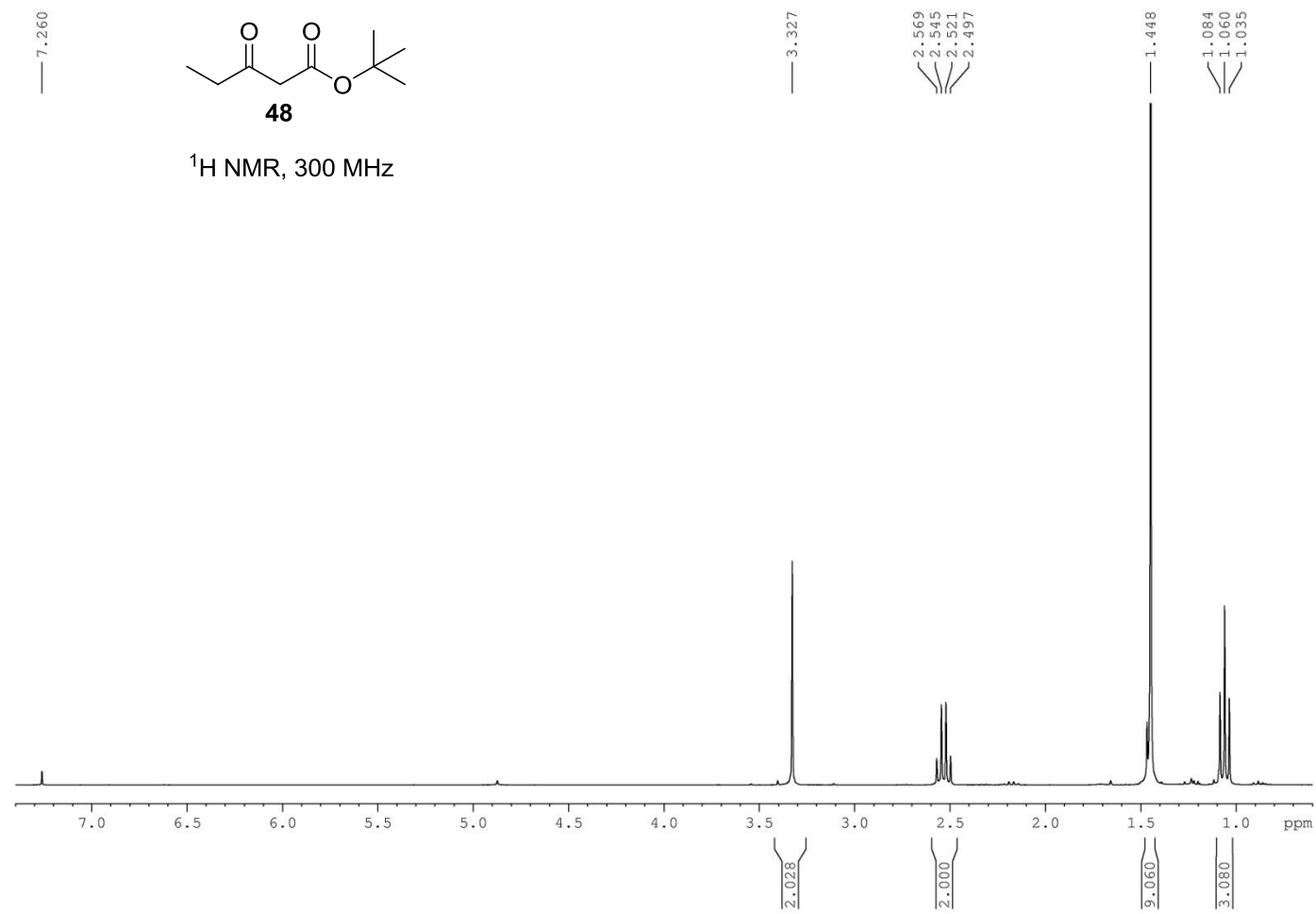


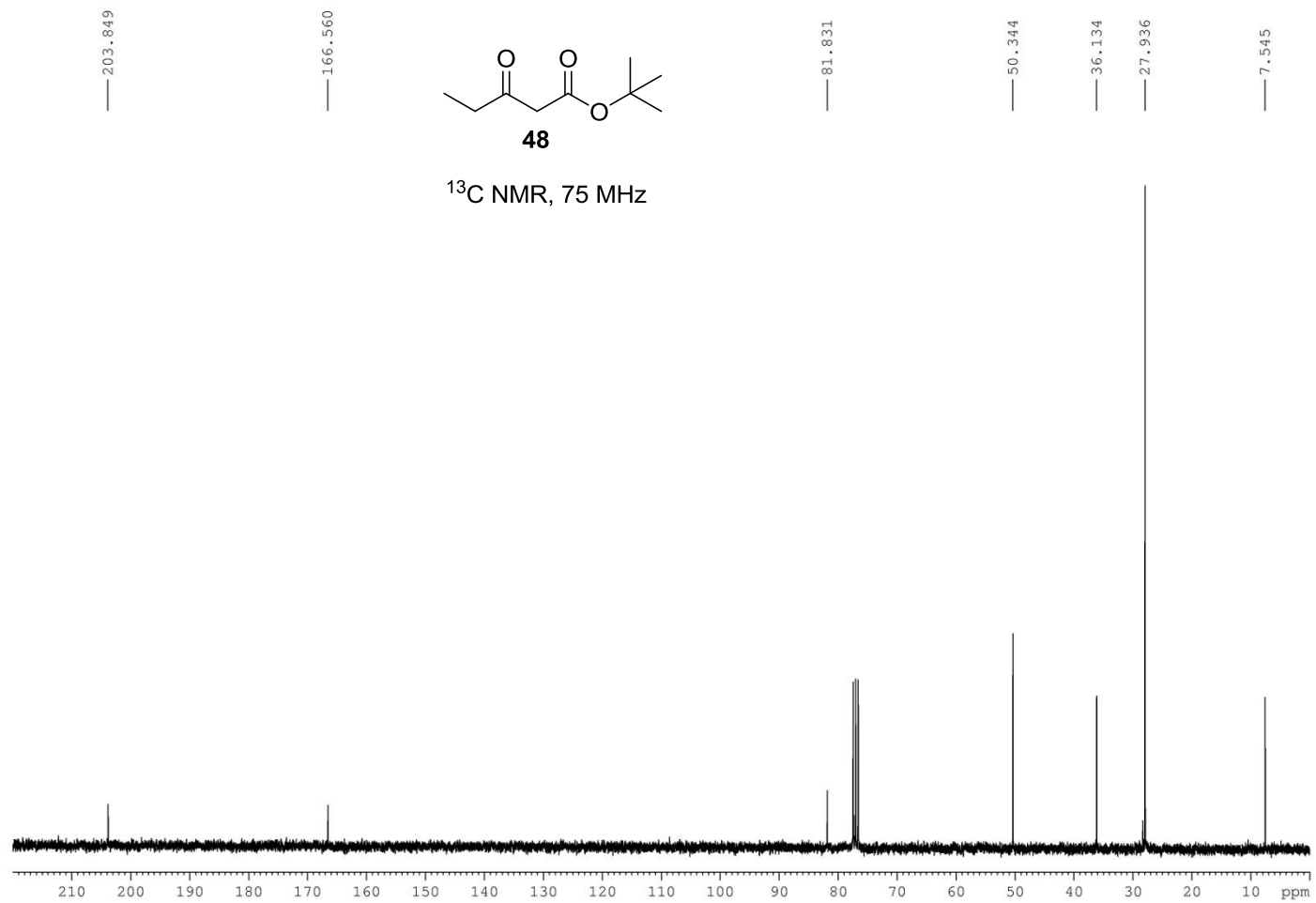


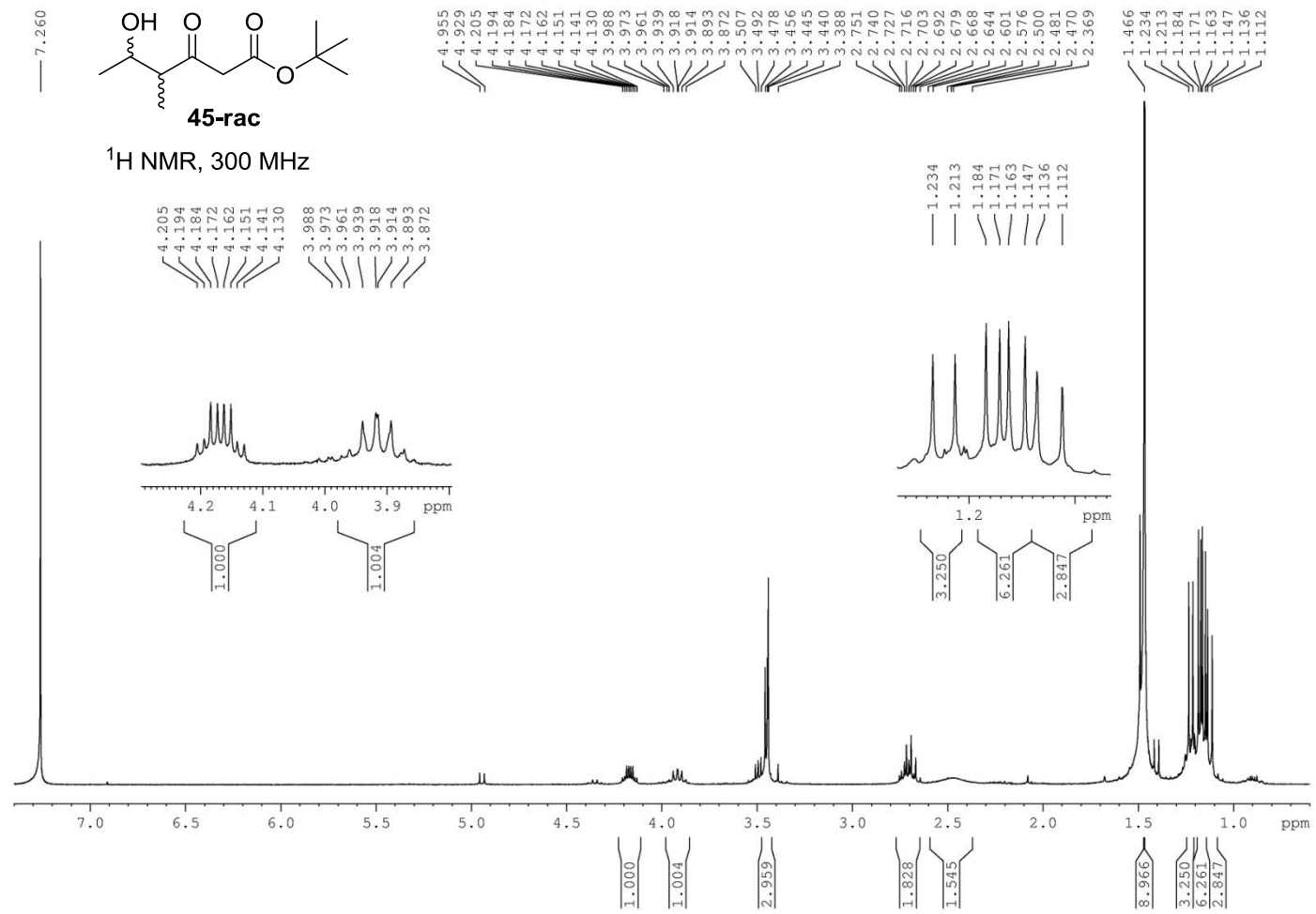


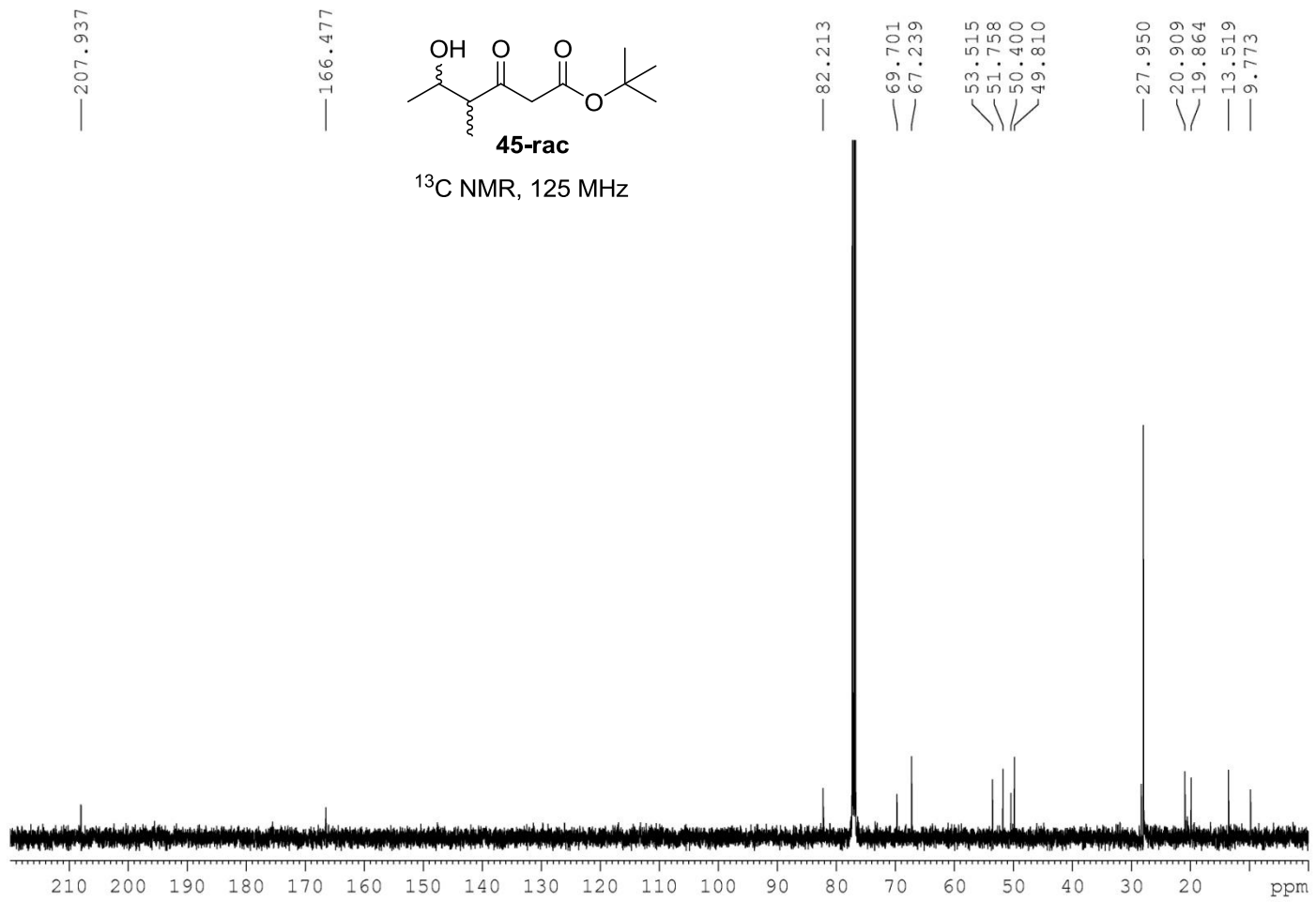


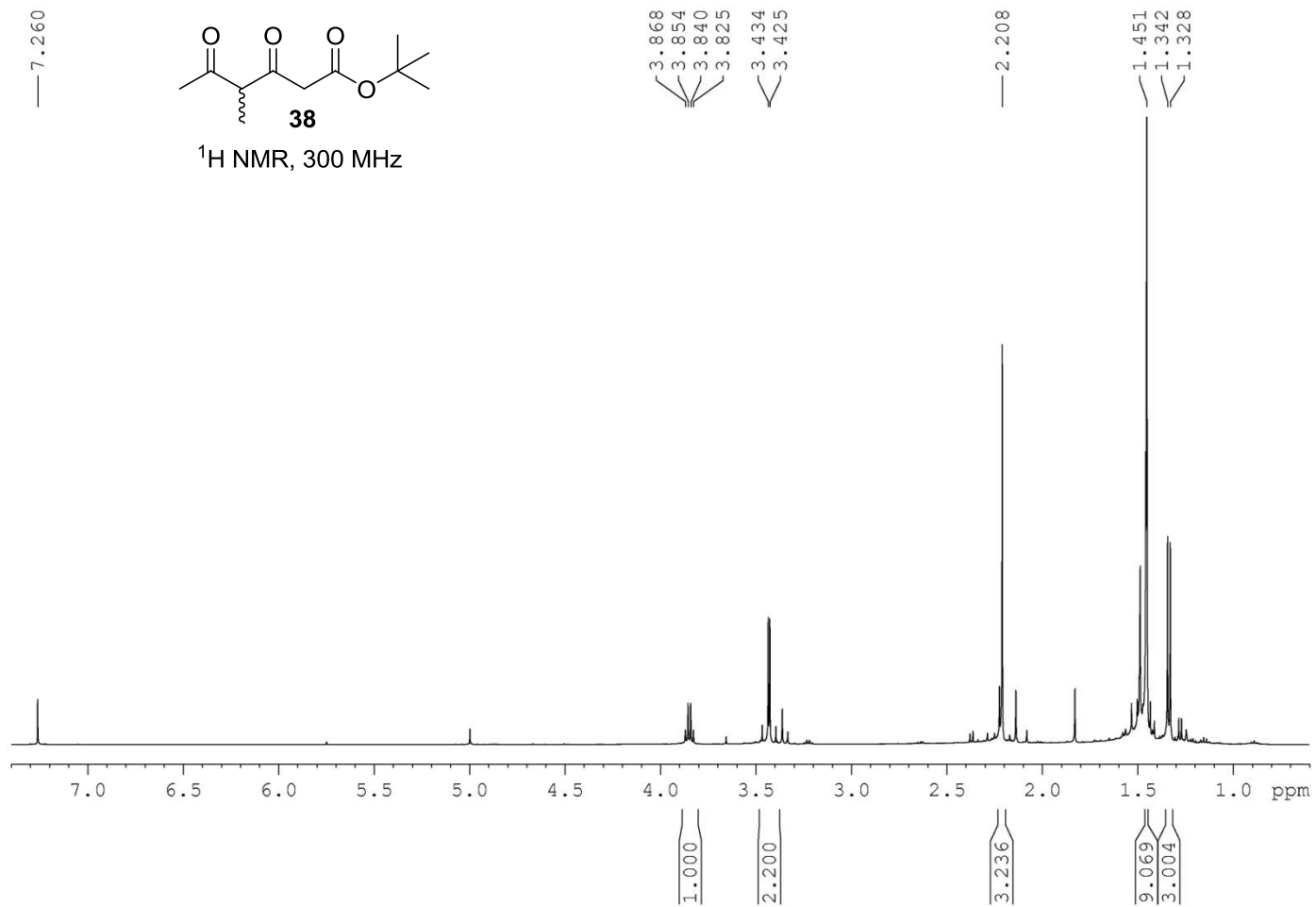


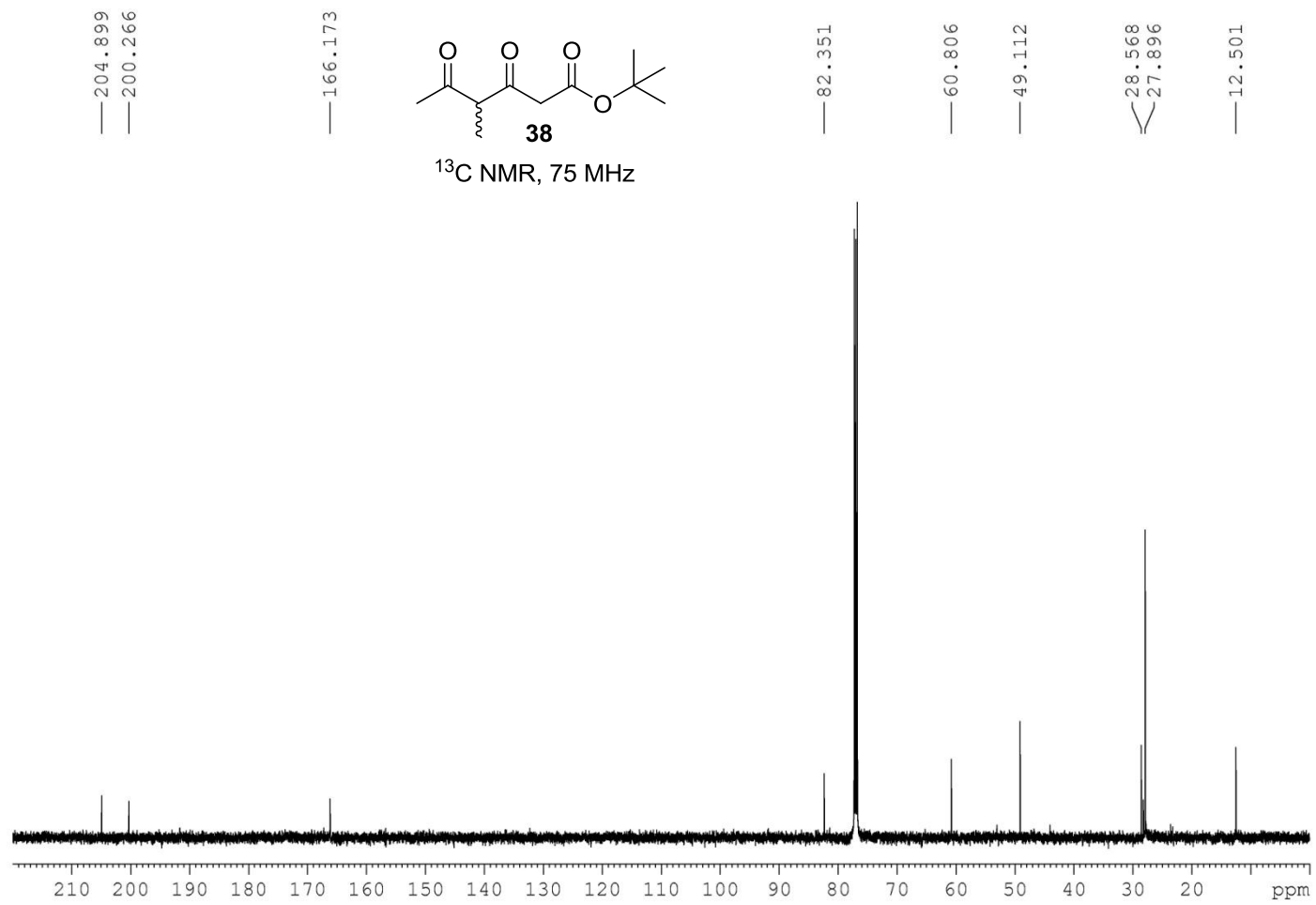


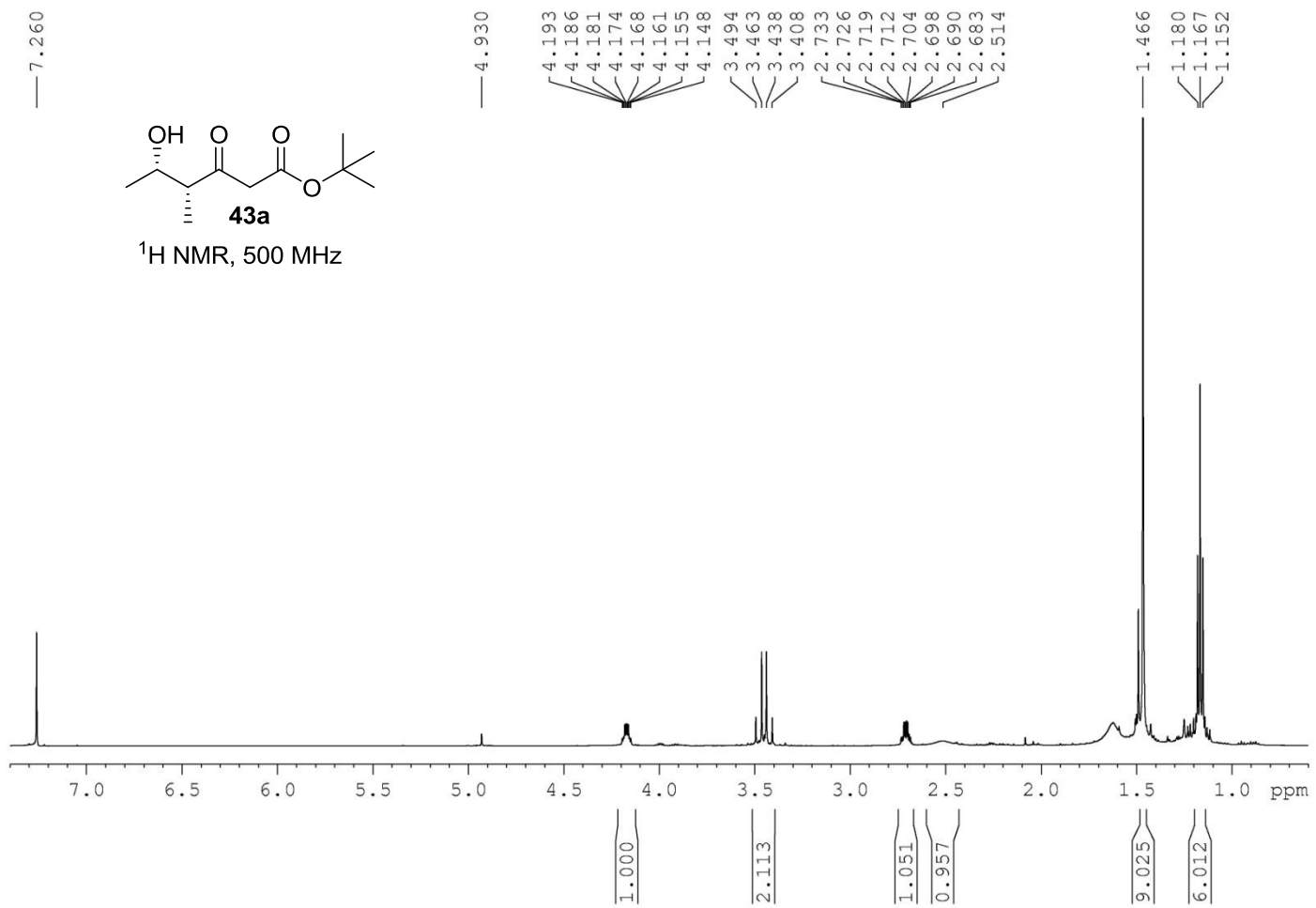


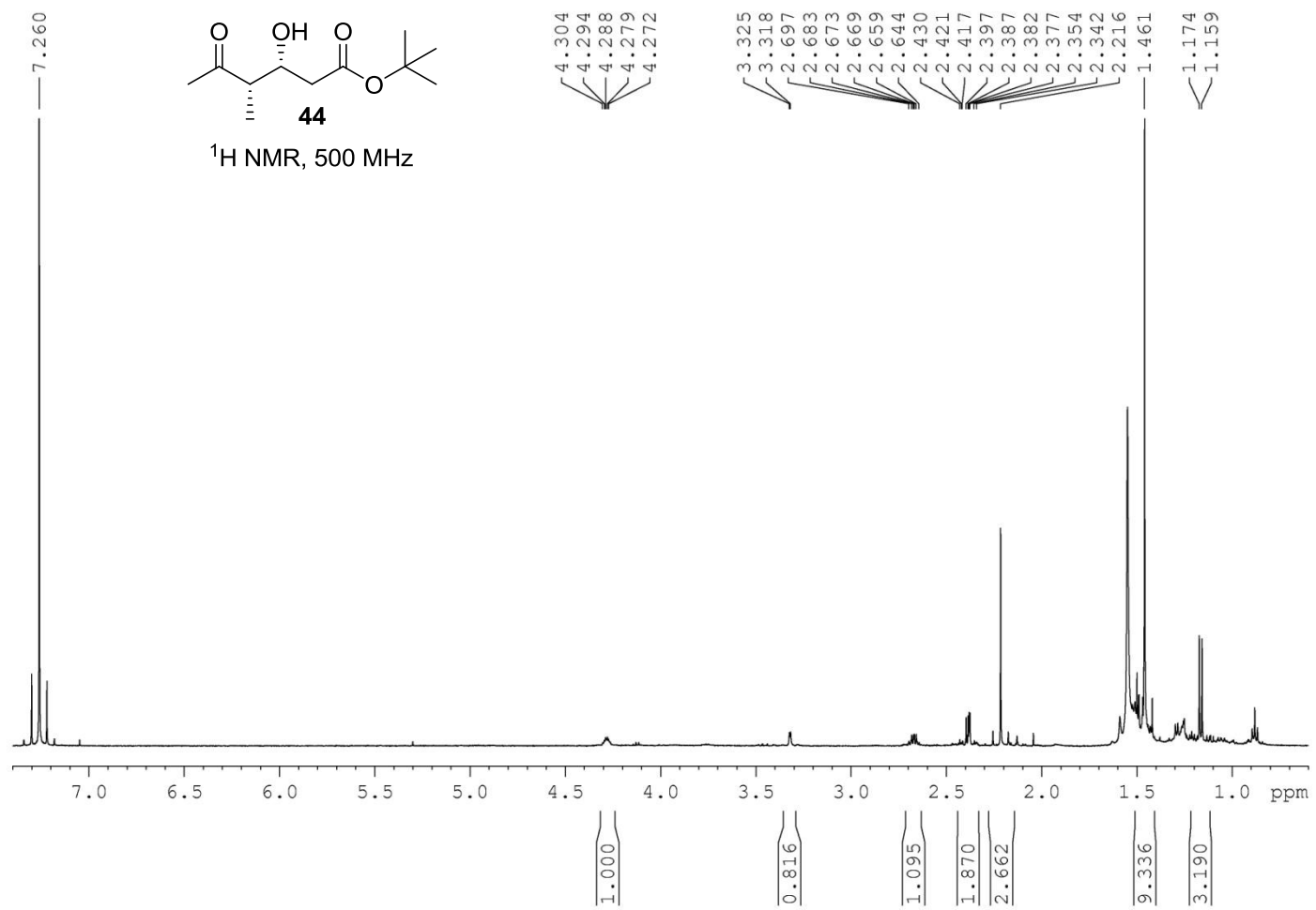


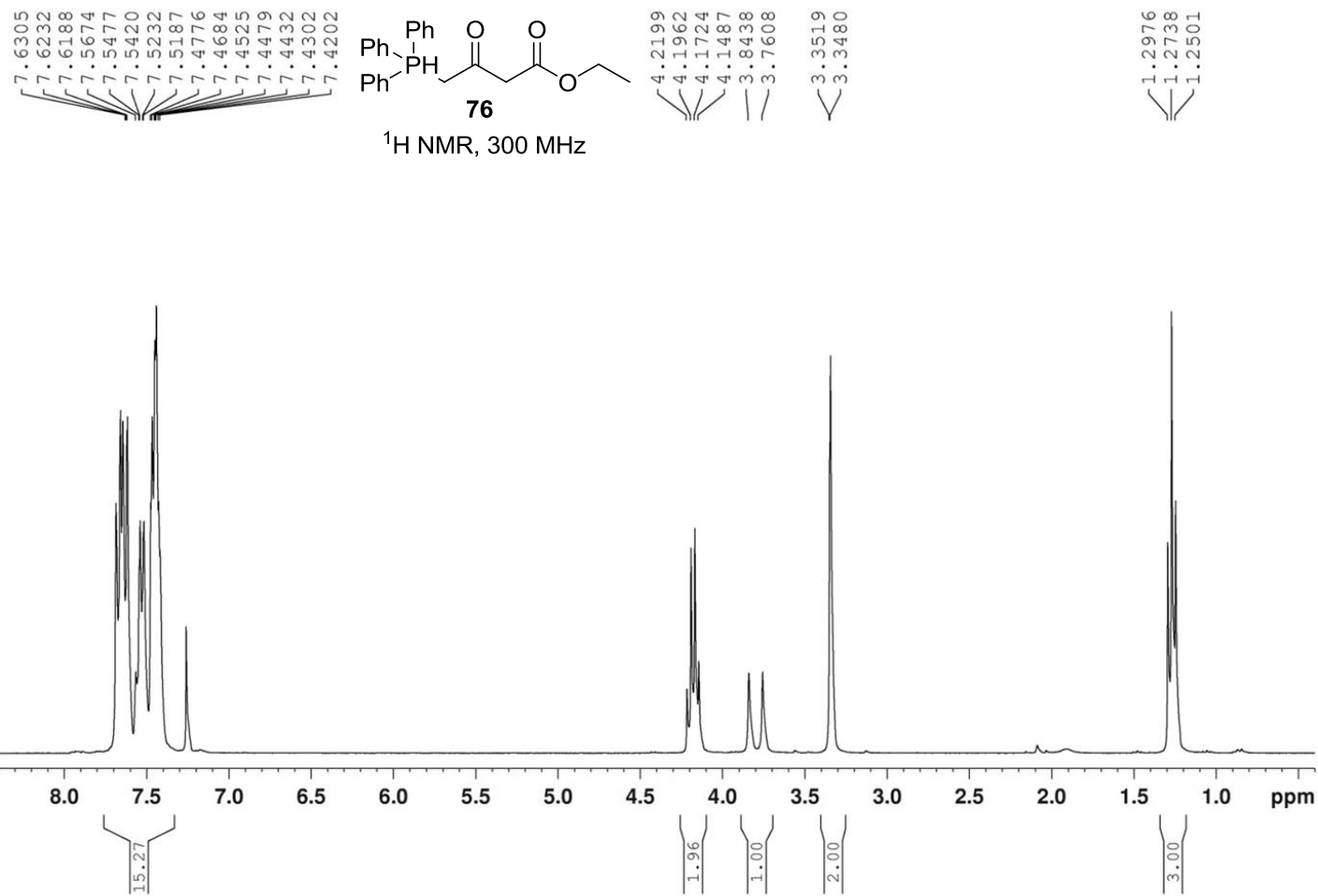


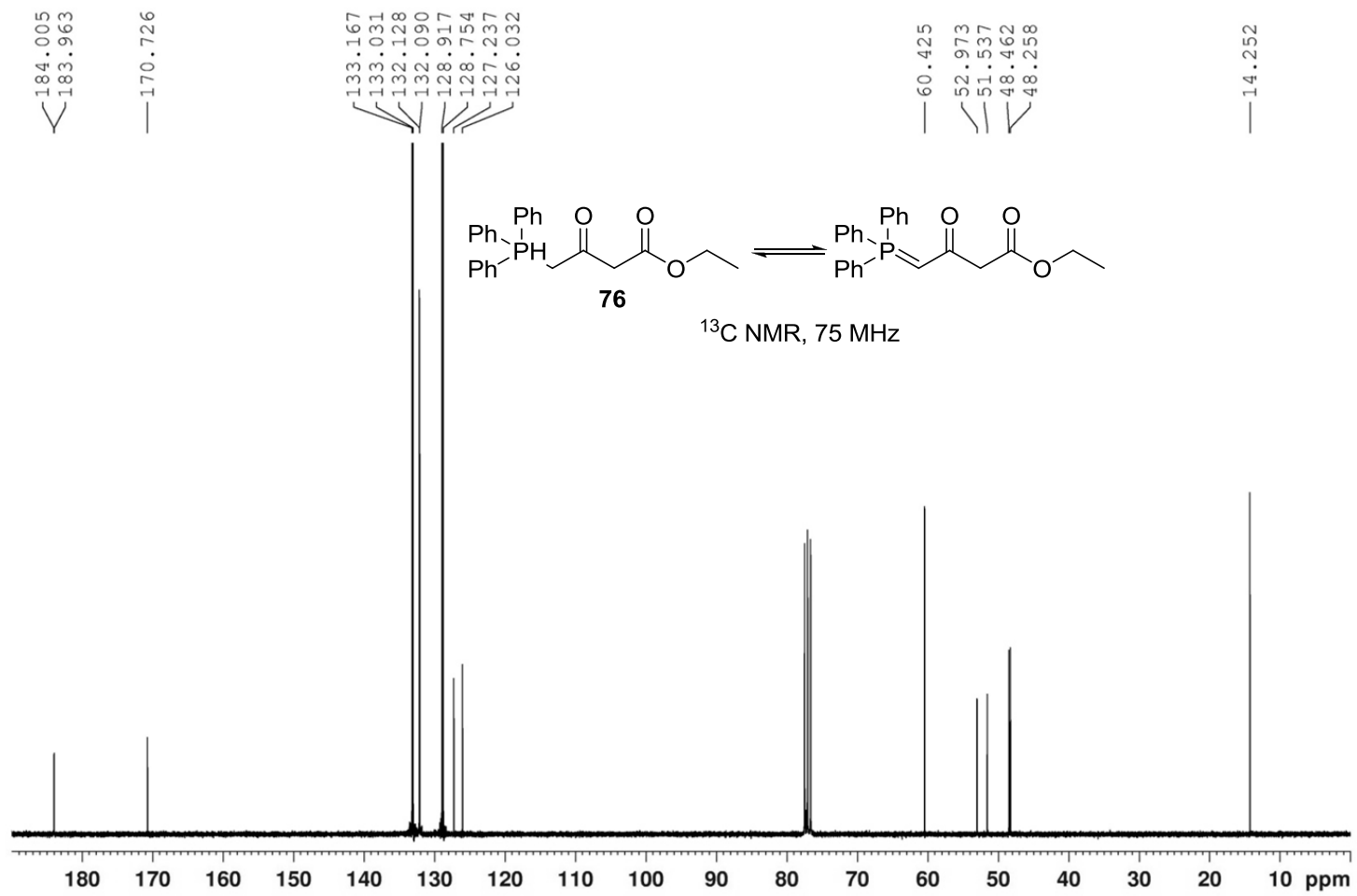


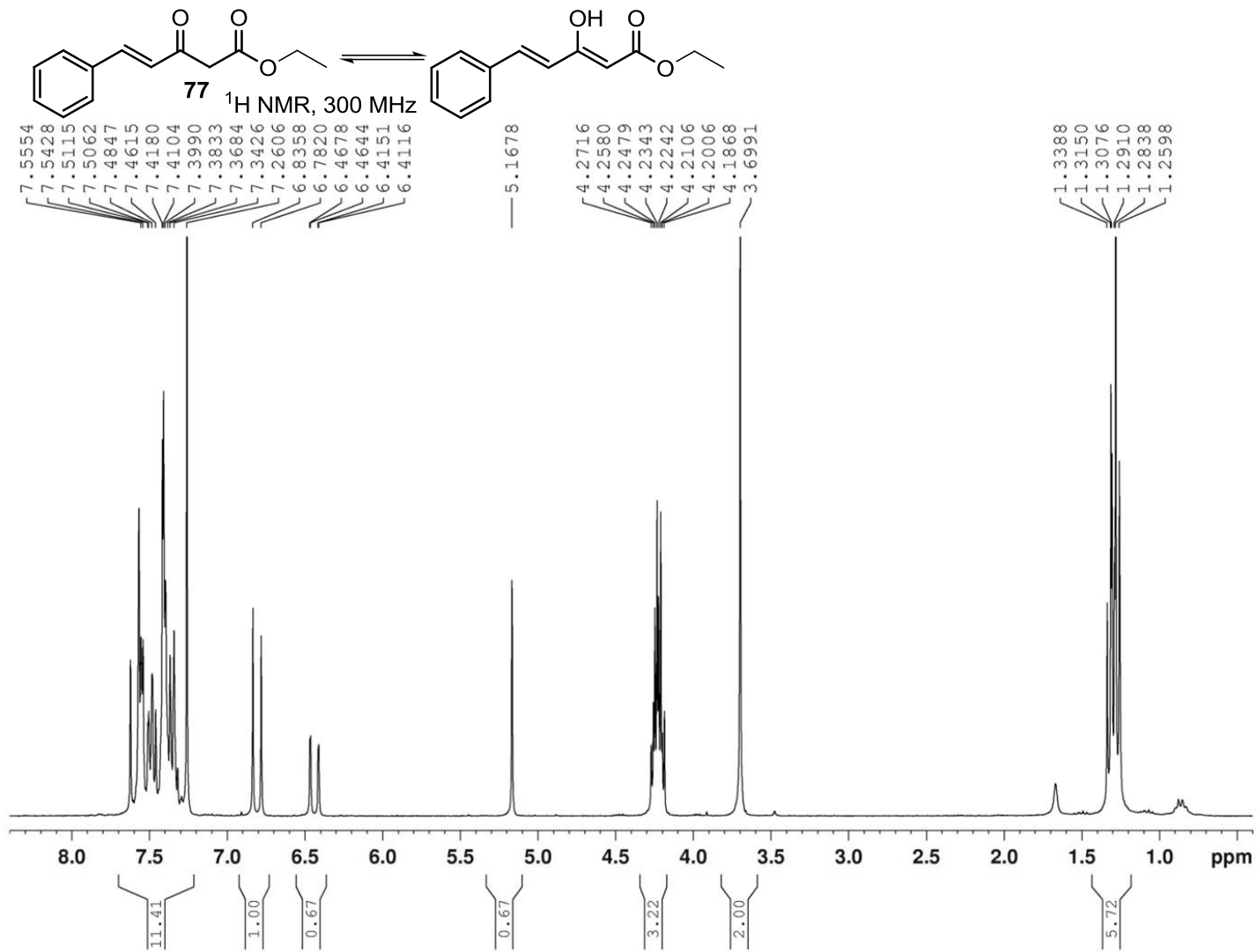


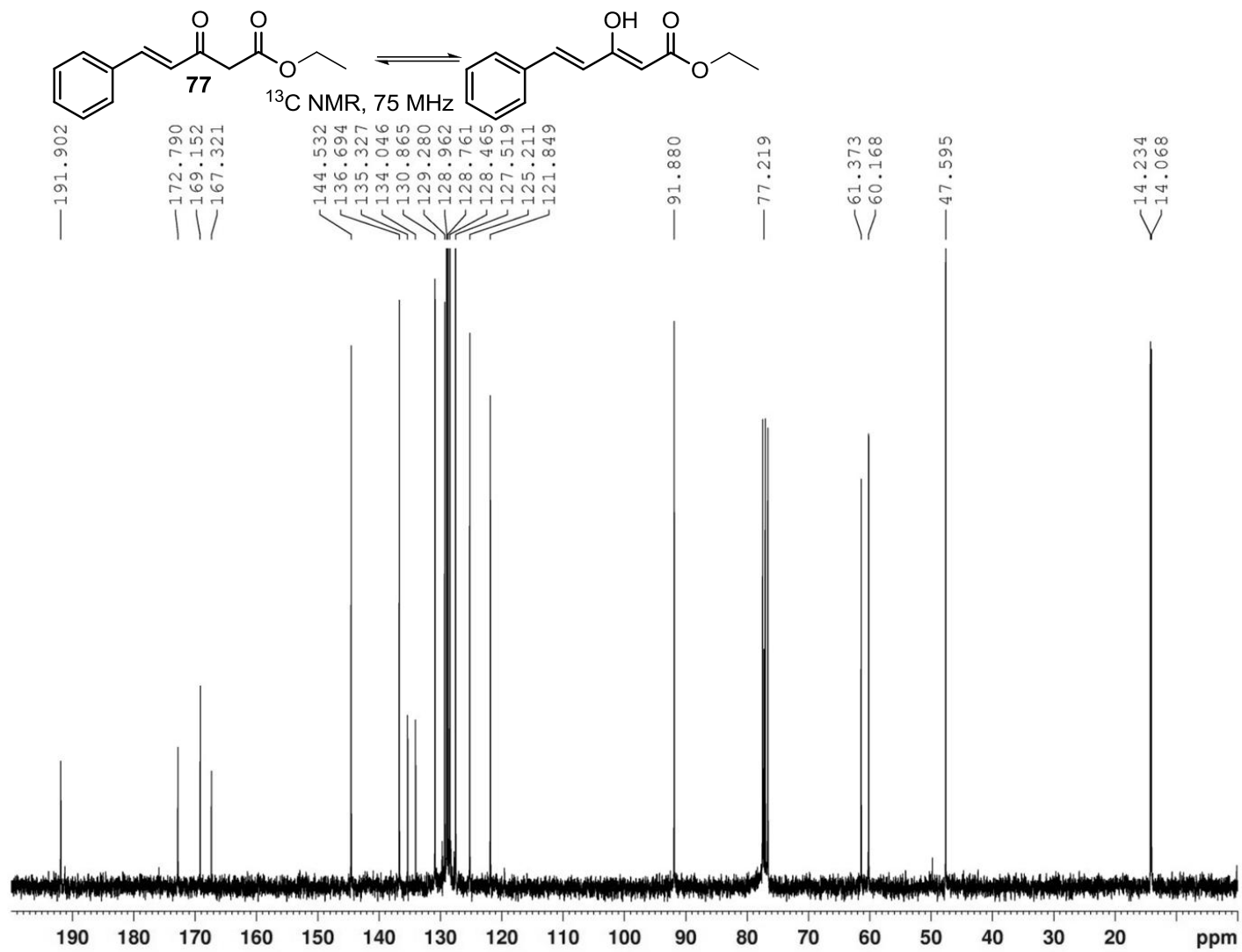


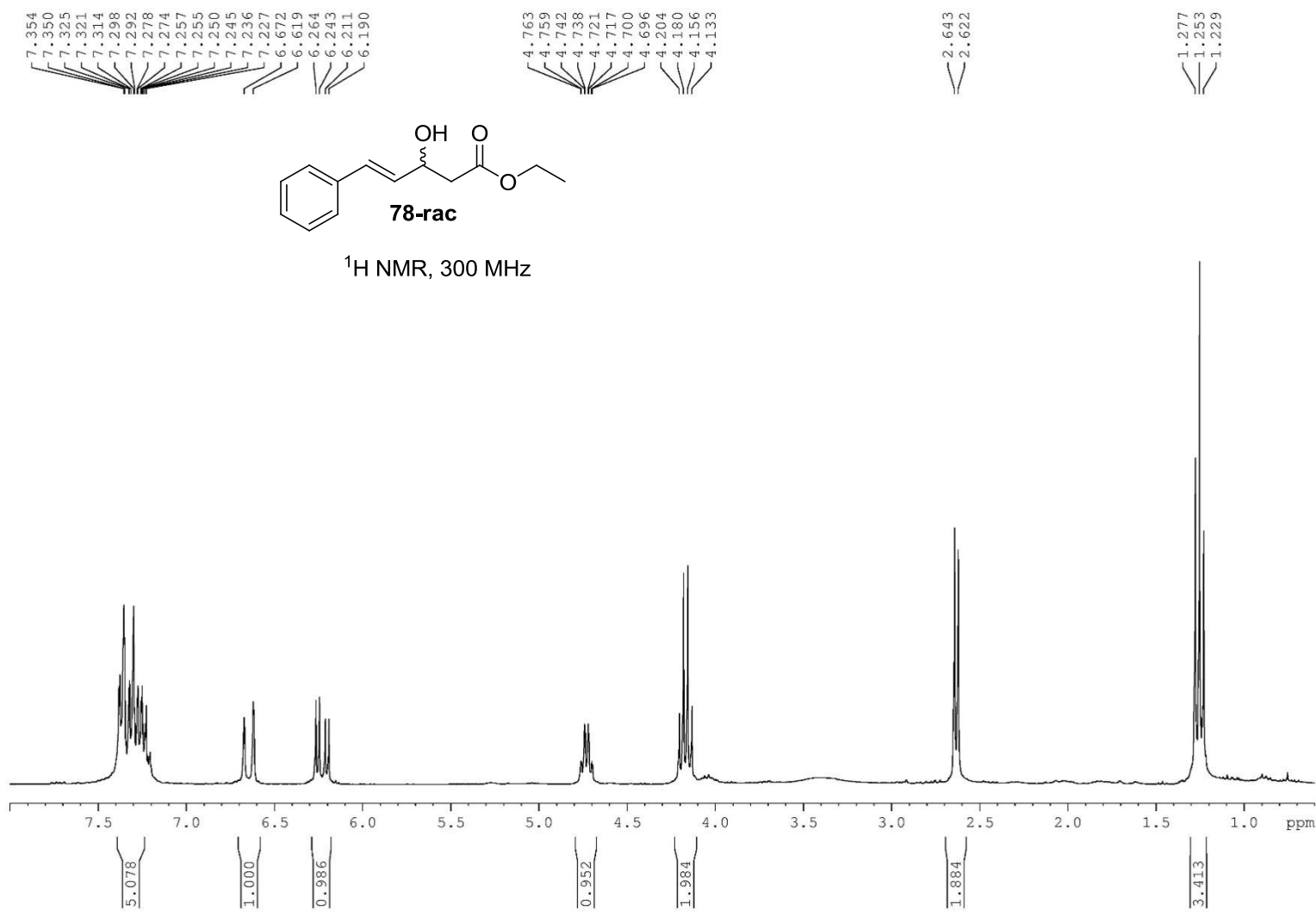


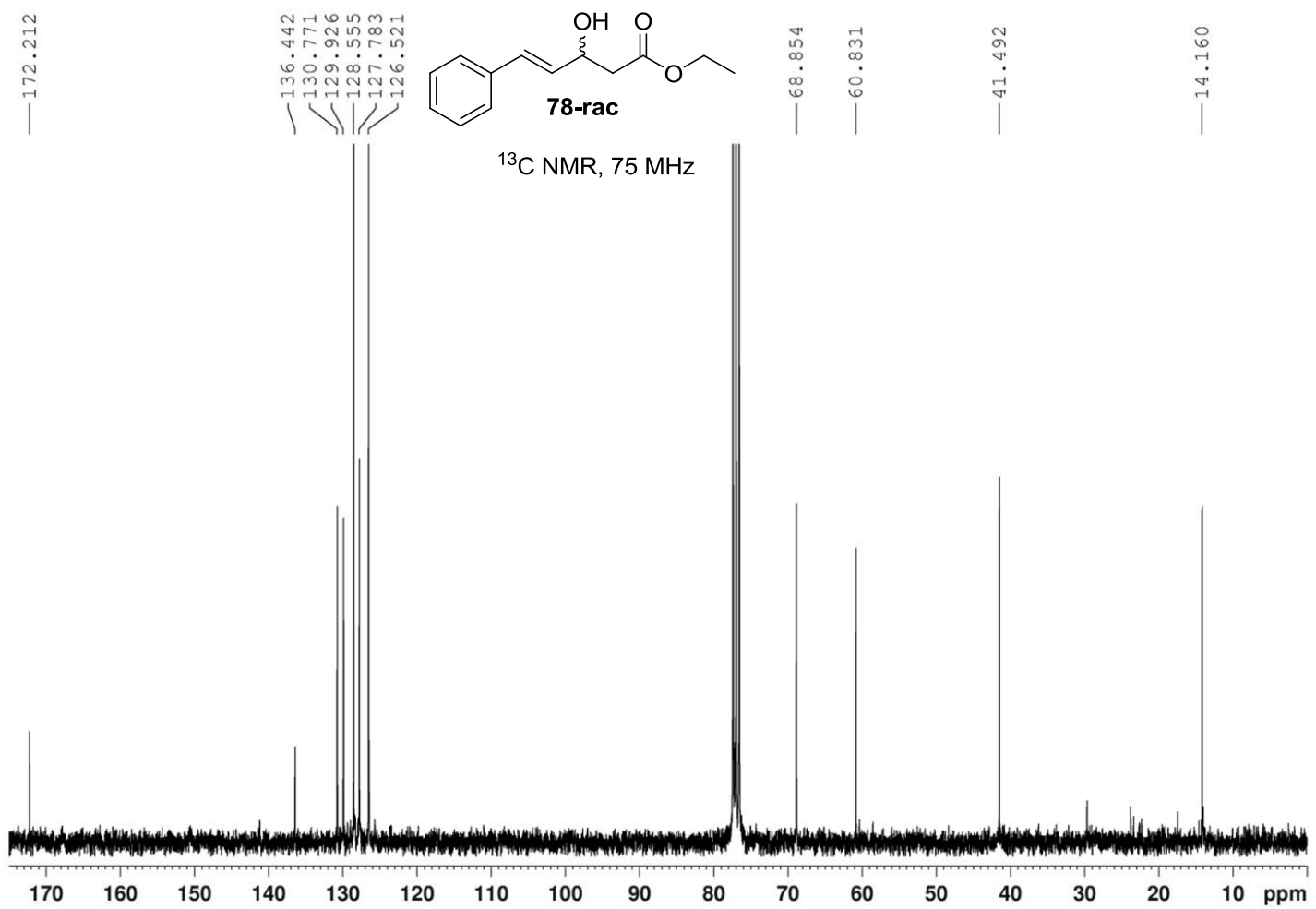


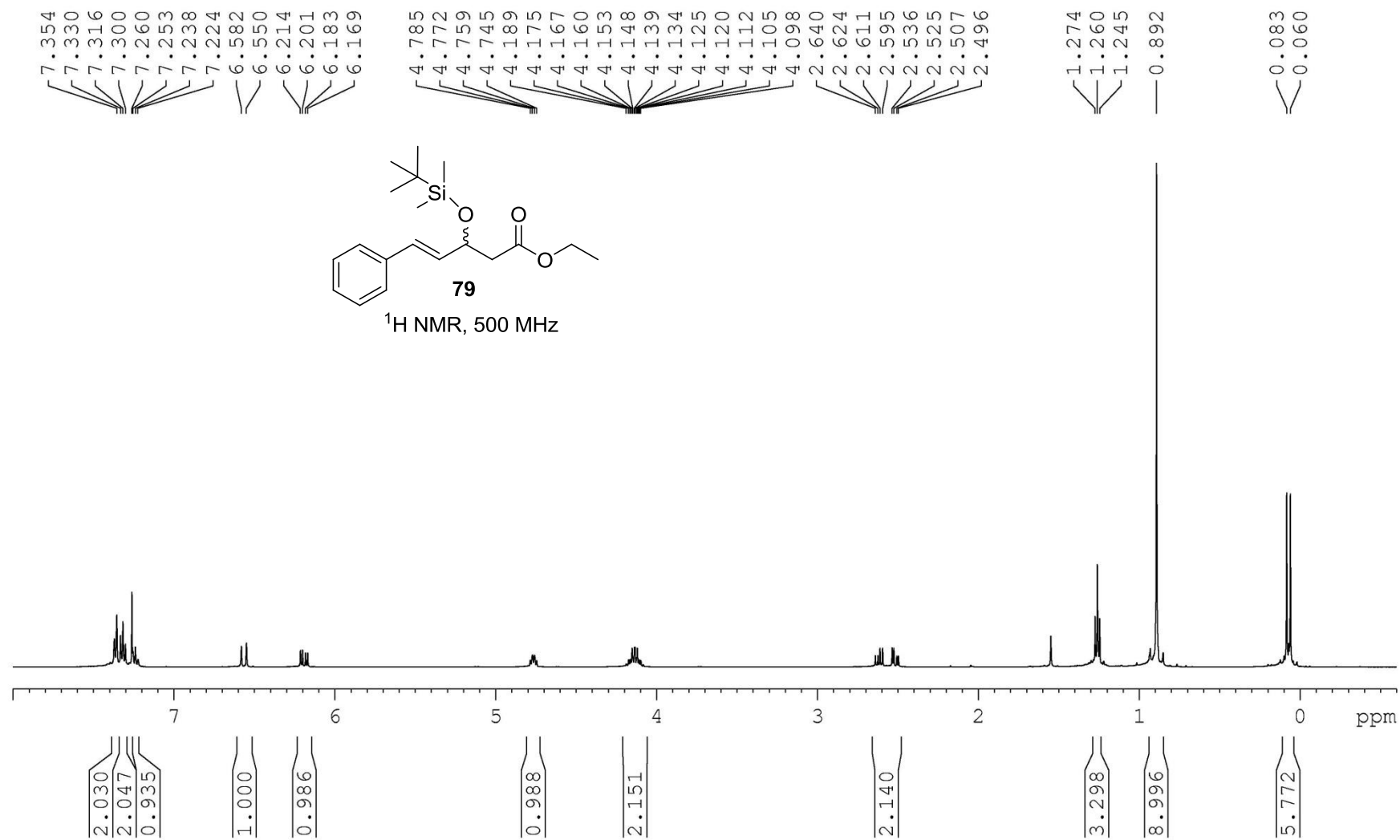


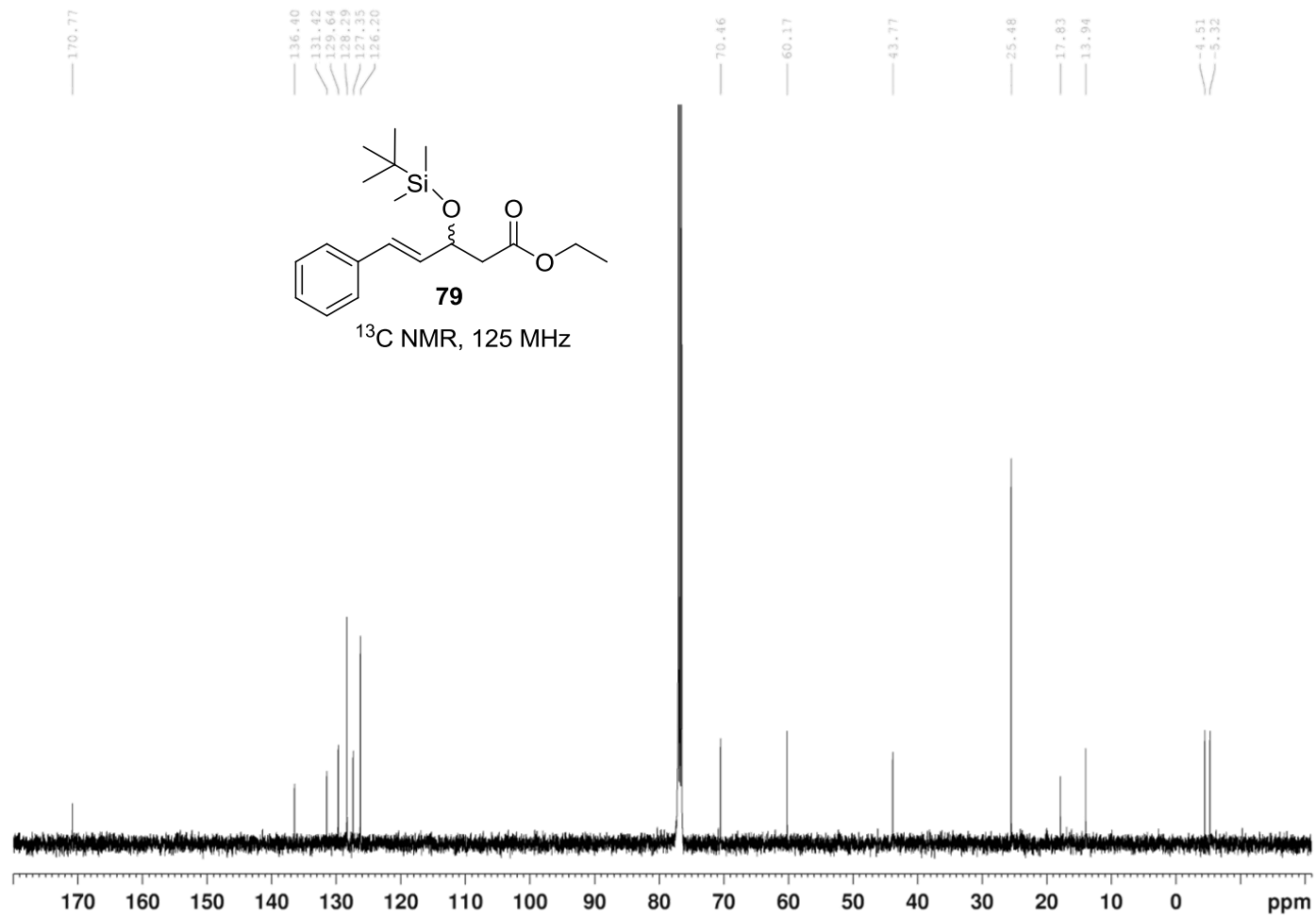




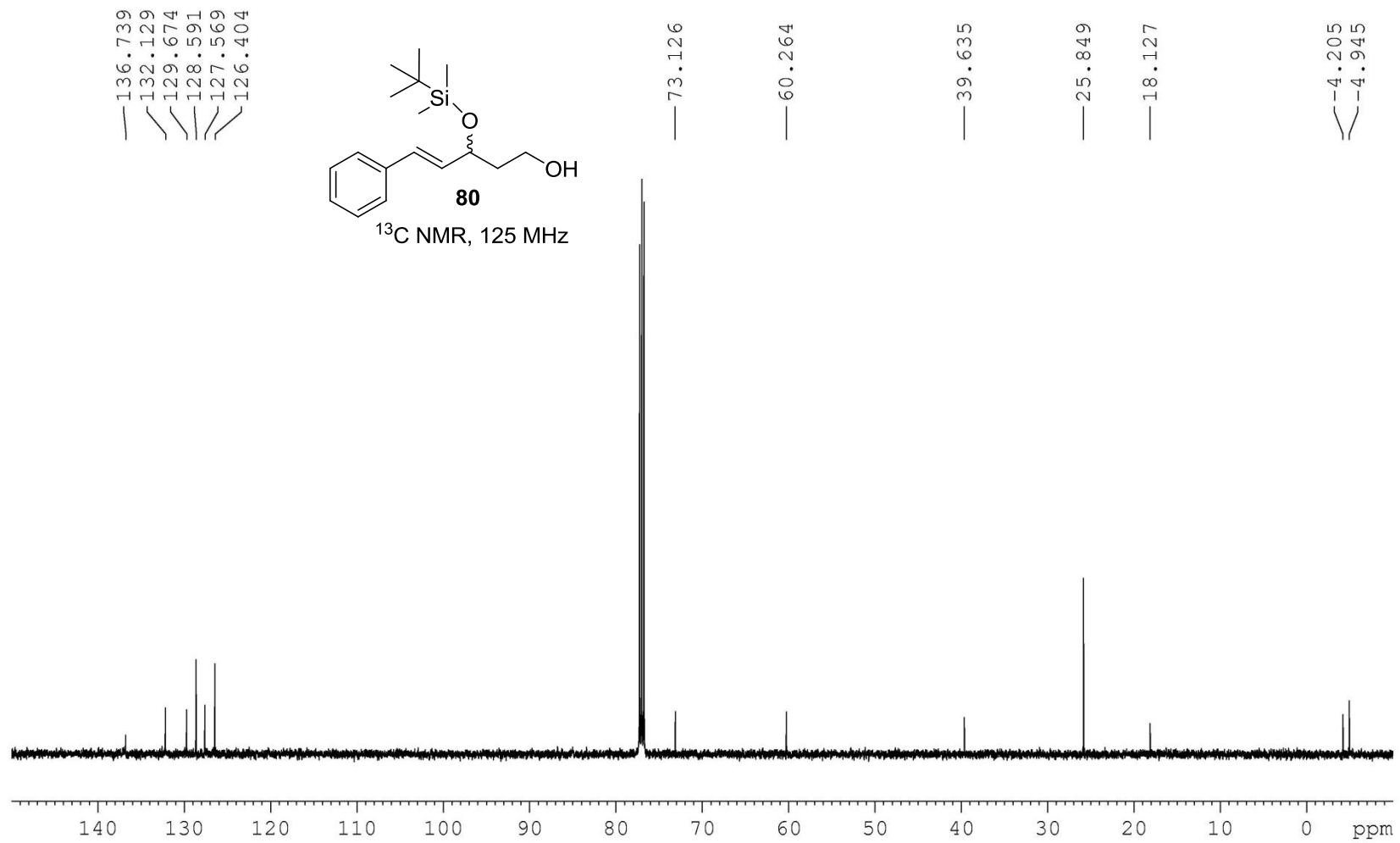


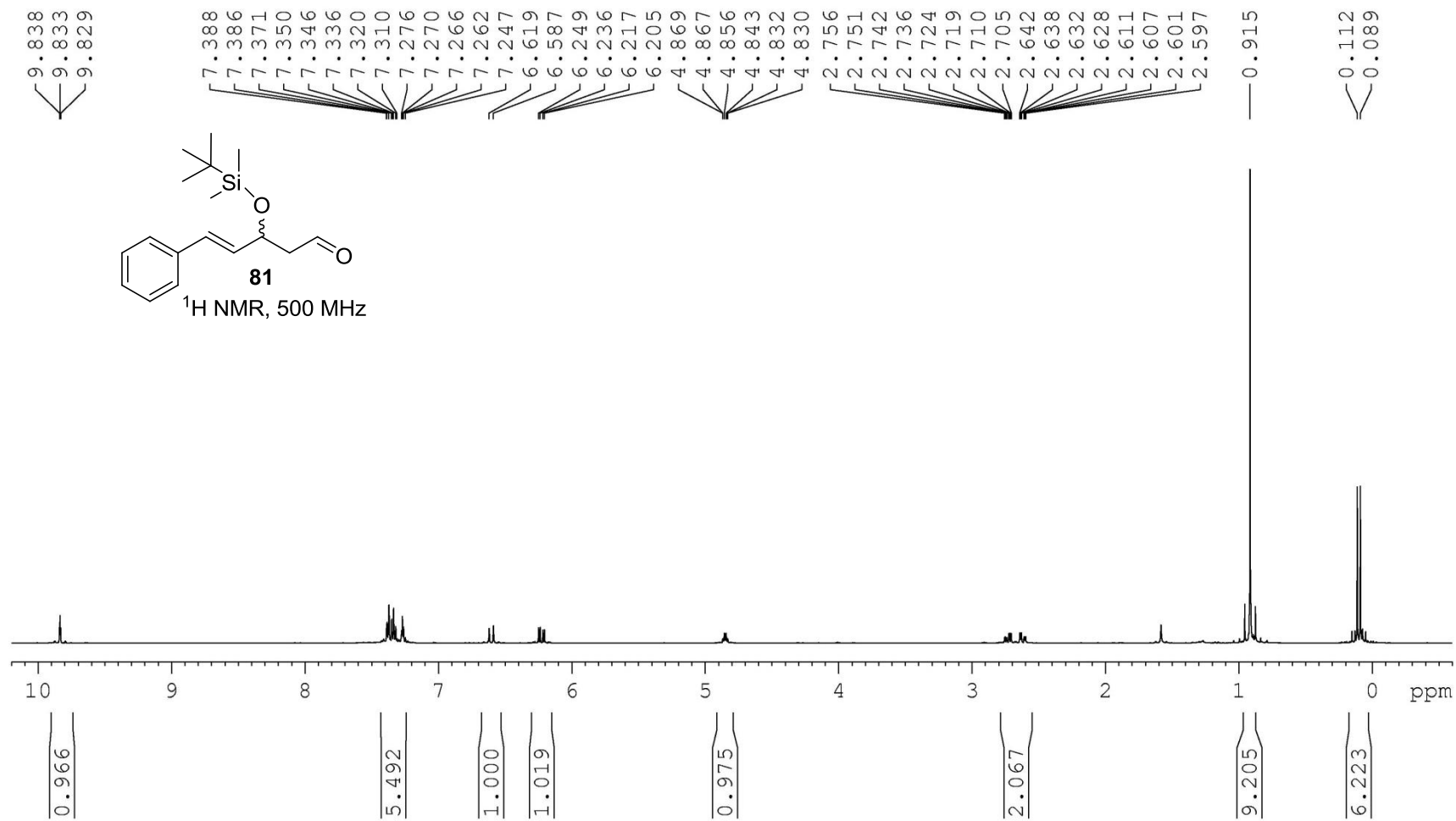


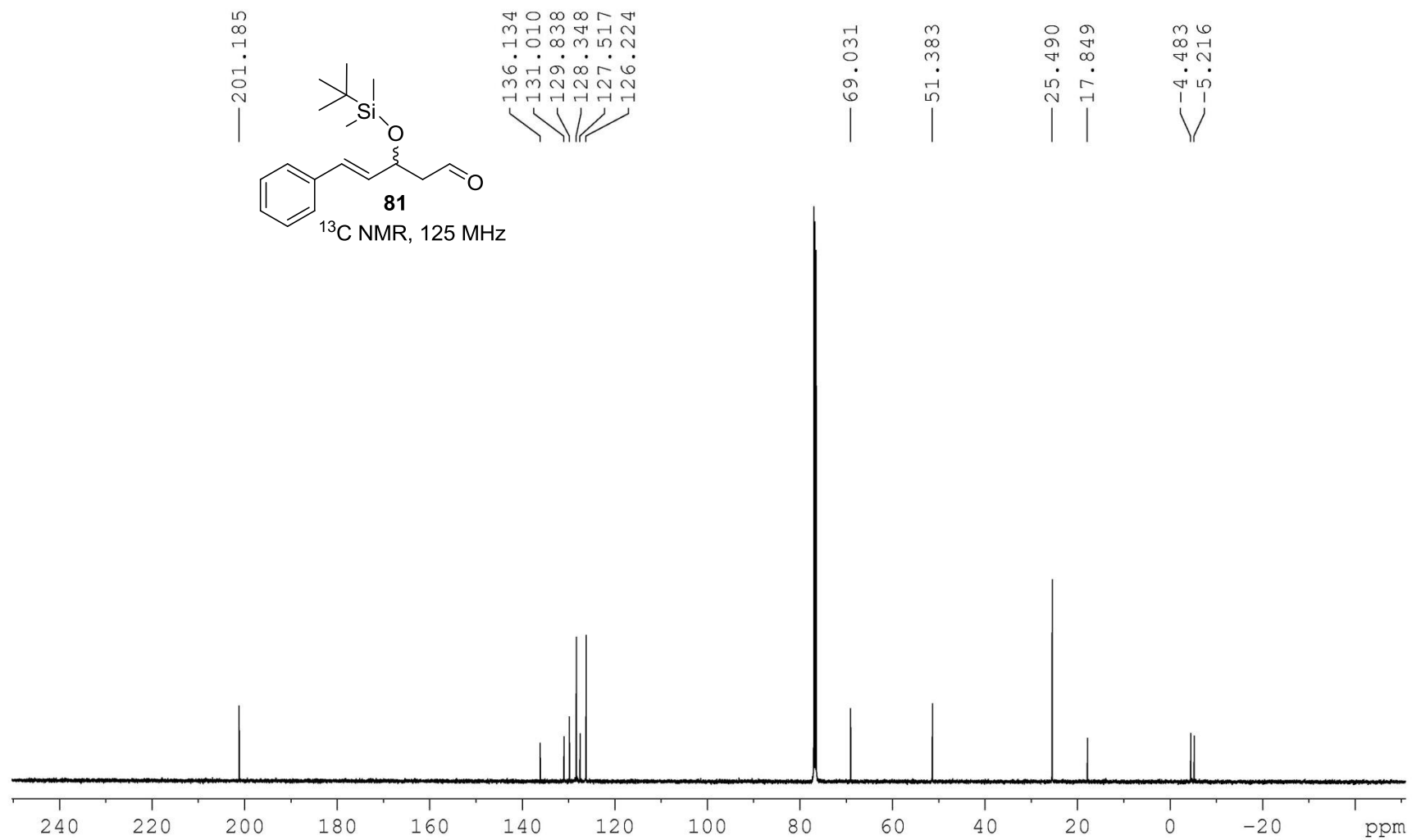




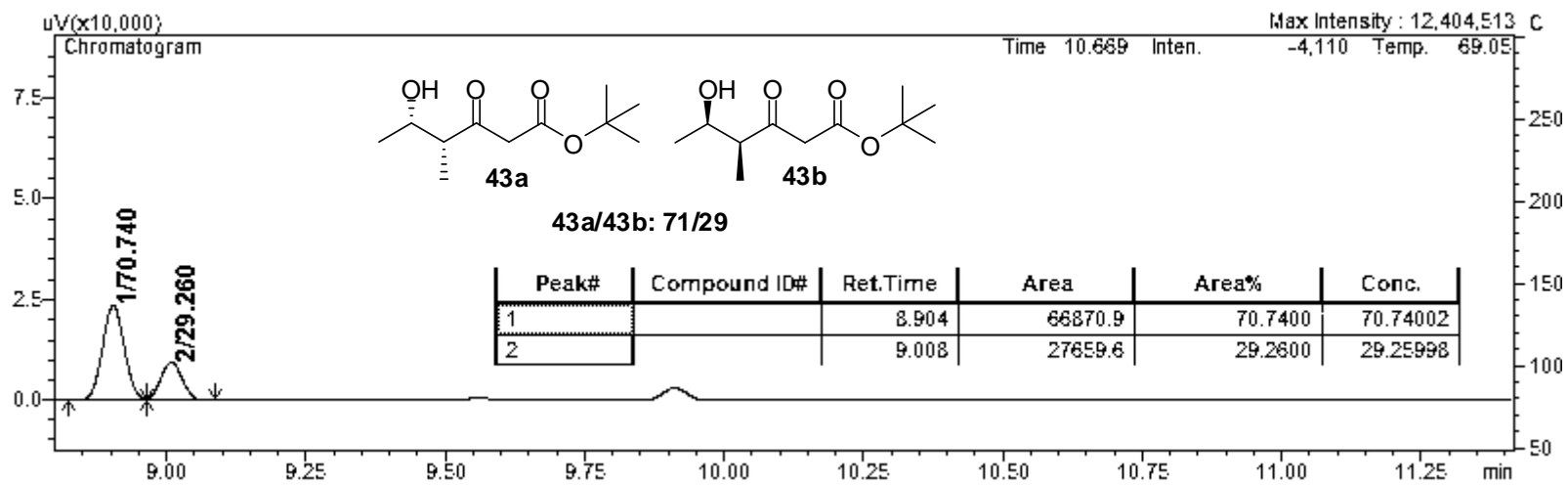
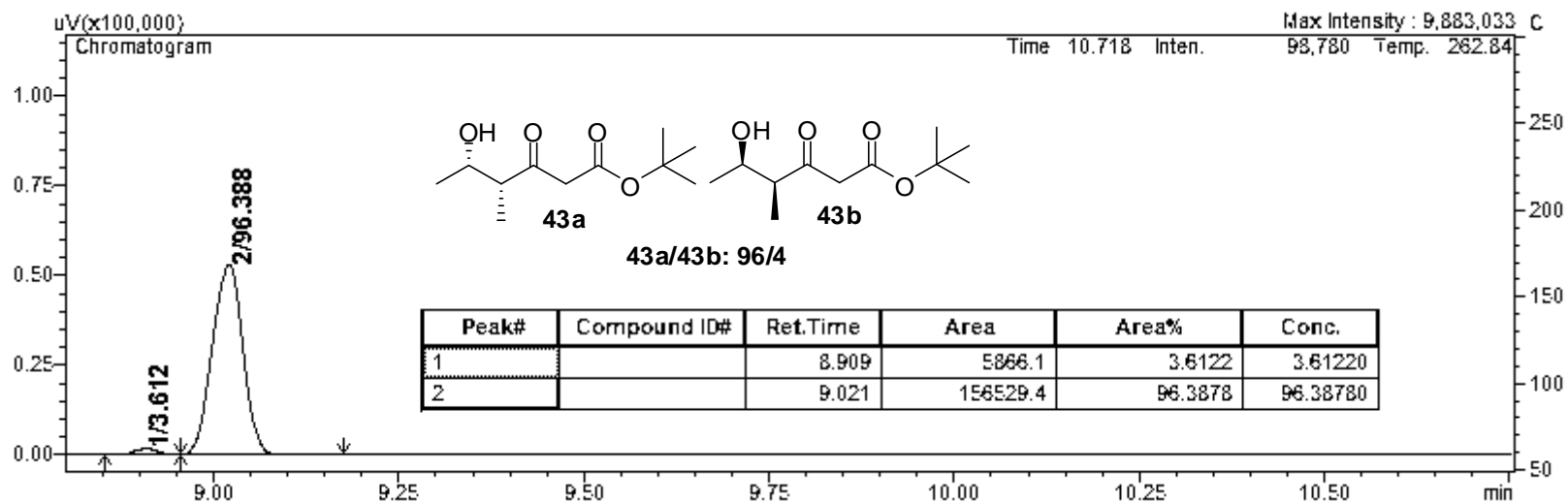








ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ GC-CHIRAL



Χρωματογραφήματα από GC-Chiral α) με την KRED-102 και β) με την KRED-118