

73/13

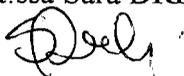
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

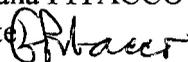
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
XI CICLO

BIOCONVERSIONI DI DIALCHIL 2-CHETODIESTERI
FUNZIONALIZZATI MEDIANTE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE ED ENZIMI IDROLITICI

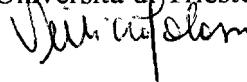
Dottoranda:
dott.ssa Sara DRIOLI



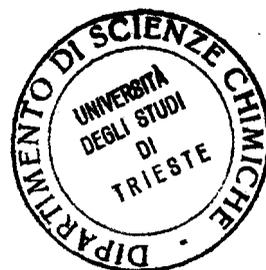
Relatore:
chiar.ma prof. Giuliana PITACCO
(Università di Trieste)



Coordinatore:
chiar.mo prof. Vinicio GALASSO
(Università di Trieste)



Anni Accademici
1995/96 - 1996/97 - 1997/98



DR073/13

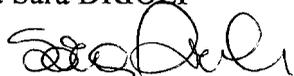
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
XI CICLO

BIOCONVERSIONI DI DIALCHIL 2-CHETODIESTERI
FUNZIONALIZZATI MEDIANTE *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE ED ENZIMI IDROLITICI

Dottoranda:
dott.ssa Sara DRIOLI



Relatore:
chiar.ma prof. Giuliana PITACCO
(Università di Trieste)



Coordinatore:
chiar.mo prof. Vinicio GALASSO
(Università di Trieste)

Anni Accademici
1995/96 - 1996/97 - 1997/98

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 I BIOCATALIZZATORI

Nonostante i grandi progressi fatti nel campo della sintesi asimmetrica,¹ i metodi di risoluzione di sistemi chirali racemi continuano ad avere un ruolo importante per la preparazione di composti organici enantiomericamente puri.² Questo perché spesso è importante disporre di entrambi gli enantiomeri, in quanto le differenze tra loro possono essere enormi, dall'odore alle proprietà farmacologiche. A volte le proprietà biologiche di un enantiomero possono essere benefiche mentre quelle dell'altro enantiomero possono essere addirittura tossiche.³ Infatti negli USA⁴ l'introduzione di nuovi farmaci e prodotti per l'agricoltura deve essere preceduta da uno screening su entrambi gli enantiomeri.

E dato che spesso è più economico fare la sintesi totale del composto racemo piuttosto che la sintesi asimmetrica di uno dei due enantiomeri, la sua risoluzione viene effettuata durante o alla fine della sequenza sintetica.

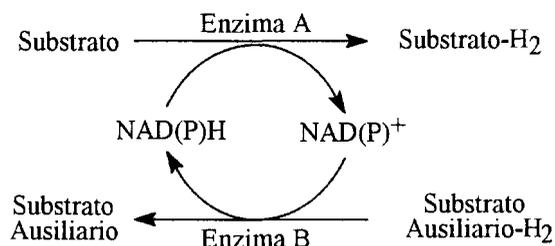
Tale risoluzione può essere fatta anche mediante l'uso di microrganismi o di enzimi e questo tipo di approccio sta crescendo di importanza anche per i recenti sviluppi nel campo della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica.

Dal punto di vista delle applicazioni tecnologiche, l'efficienza catalitica degli enzimi può essere considerevolmente innalzata attraverso l'uso di reattori a flusso continuo. Le tecniche di immobilizzazione sono state applicate sia ad enzimi purificati che a microrganismi particolarmente efficienti (ad es. *Saccharomyces cerevisiae* o *Pseudomonas putida* etc.⁵)

1.1.1 Uso di microrganismi in chimica organica

I microrganismi a cellule intere contengono un bagaglio enzimatico complesso tra cui molte deidrogenasi sfruttate per bioriduzioni, tutti i cofattori necessari e la via metabolica per la loro rigenerazione. Quindi il riciclo del cofattore, necessario con enzimi isolati, può essere omesso in quanto viene fatto automaticamente dalla cellula. Come conseguenza è possibile usare fonti di energia a basso costo - saccarosio e glucosio - come substrati ausiliari nelle reazioni di bioriduzione asimmetrica specialmente di chetoni prochirali ma anche di doppi legami di tipo C=C.⁶

La riduzione asimmetrica di chetoni prochirali mediante ossidoriduttasi per ottenere alcoli secondari chirali richiede generalmente la presenza di cofattori quali NADH o NADPH. Il ciclo catalitico è descritto nella Schema 1.1.

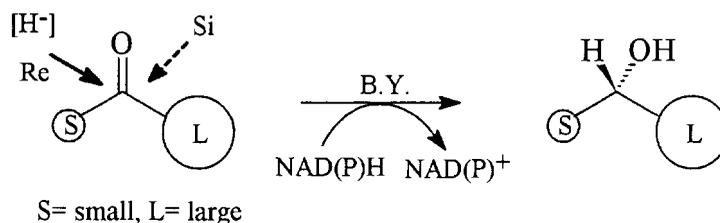


Schema 1.1 - Ciclo catalitico nella riduzione del carbonile

Tra i microrganismi, quello che ha avuto maggiore successo è stato il comune lievito da panettiere o di birra (*Saccharomyces cerevisiae*), del quale è stato recentemente determinato il genoma.⁷

Il lievito da panettiere è da molto tempo il microrganismo più usato per le reazioni di riduzione altamente enantioselettive.^{6,8} Questo perché la sua crescita non richiede l'assistenza di un microbiologo, ed inoltre per il suo uso è sufficiente una semplice attrezzatura standard da laboratorio. Non è sorprendente quindi che l'uso del lievito come catalizzatore per ottenere prodotti chirali risalga all'inizio di questo secolo.⁹

Il lievito riduce semplici chetoni alifatici ed aromatici nei corrispondenti alcoli secondari a configurazione **S** con buona purezza ottica, in accordo con la regola di Prelog¹⁰ (Schema 1.2). Essa infatti afferma che il trasferimento dell'idruro avviene sulla faccia **Re** del chetone prochirale, con **L** e **S** sostituenti grande e piccolo rispettivamente.

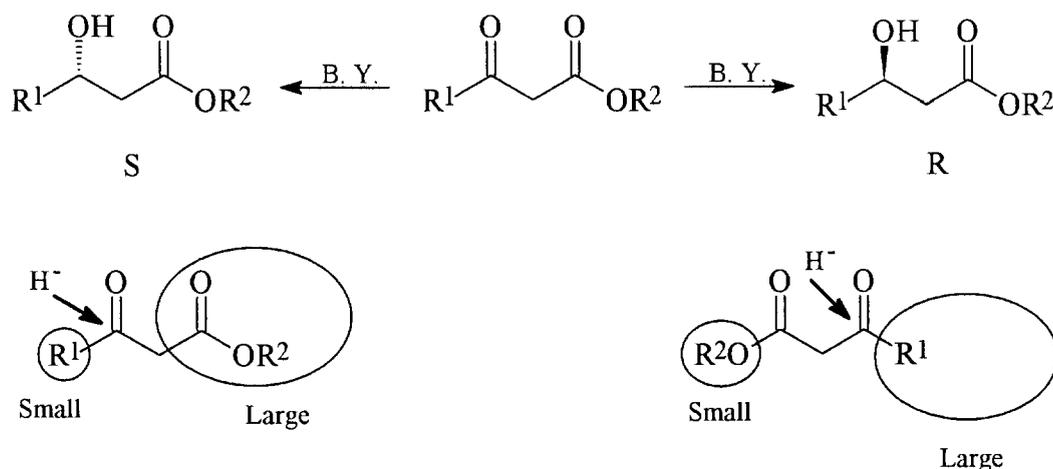


Schema 1.2 - Regola di Prelog

Nella bioriduzione di β -chetodiesteri, un lavoro di Sih¹¹ ha chiarito che

l'enantioselettività e la preferenza stereochimica per la faccia **Re** o **Si** del β -chetoestere dipende dalla grandezza relativa del gruppo alcossidico OR^2 e del sostituito R^1 , che dirigono l'attacco nucleofilo dell'idruro secondo la regola di Prelog (Schema 1.3).

E' questo il caso della riduzione con lievito di birra di β -chetoesteri aciclici per dare β -idrossiesteri,¹² utilizzati questi ultimi come sintoni chirali nella sintesi di feromoni¹³ e carotenoidi.¹⁴



R^1	R^2	Configurazione	e.e.(%)
Cl-CH ₂ -	CH ₃	R	64
Cl-CH ₂ -	C ₂ H ₅	R	54
Cl-CH ₂ -	n-C ₃ H ₇	R	27
Cl-CH ₂ -	n-C ₅ H ₁₁	S	77
Cl-CH ₂ -	n-C ₈ H ₁₇	S	97

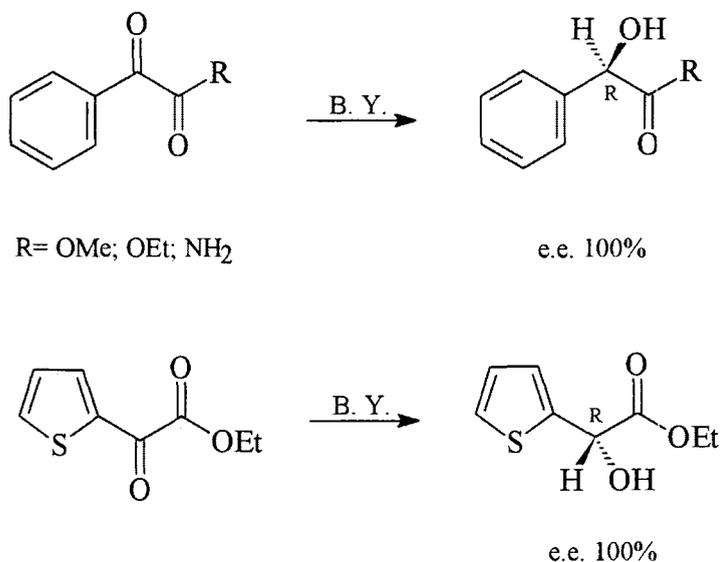
Schema 1.3 - Riduzione di β -chetoesteri aciclici

Non sempre però la configurazione del carbonio carbinolico risultante dalla biorriduzione è **S**. In alcuni casi si è ottenuta la configurazione **R**. La ragione di questo

diverso risultato infatti non è da attribuirsi ad un approccio alternativo del substrato sul singolo enzima, ma piuttosto alla presenza di diverse deidrogenasi che possiedono preferenza stereochimica opposta e competono per il substrato con diversa velocità.^{15,16} Sono state infatti isolate quattro ossido-riduttasi, agenti su β -chetoesteri, due delle quali portano all'idrossiestere a configurazione **S** e due a configurazione **R**¹⁷.

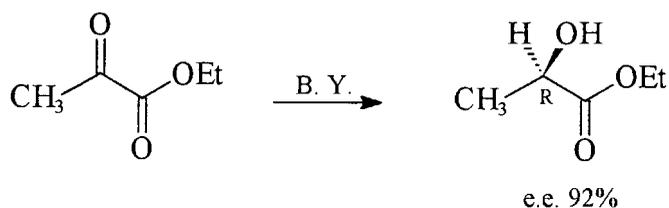
Anche gli α -chetoesteri sono stati ridotti con successo con lievito di birra, sebbene gli esempi non siano così numerosi come per la riduzione dei β -chetoesteri.

I derivati dell'acido 2-oxo-2-arilacetico danno i corrispondenti α -idrossi derivati otticamente puri (Schema 1.4)¹⁸ a configurazione **R**.



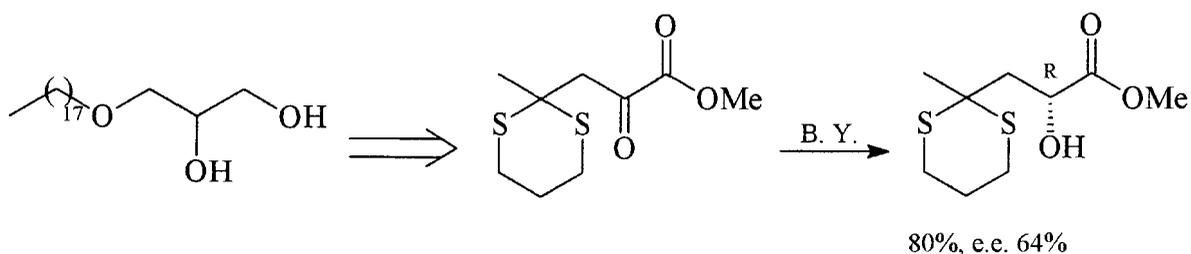
Schema 1.4 - Riduzione dei derivati dell'acido 2-oxo-2-arilacetico

L'etil piruvato è ridotto a (**R**)-etil lattato con un eccesso enantiomerico pari al 92%^{18,19} (Schema 1.5) mentre, se la riduzione avviene ad opera di una alcol deidrogenasi isolata dal lievito, in presenza di NADH, si ottiene l'(**S**)-lattato.²⁰



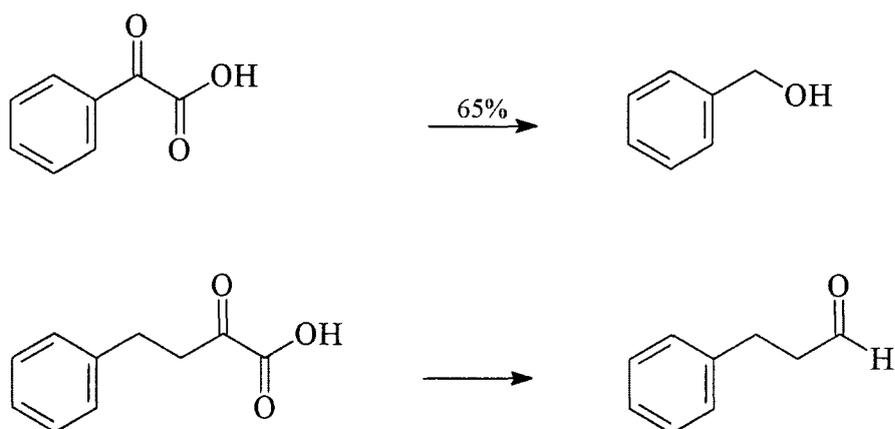
Schema 1.5 - Riduzione dell'etil piruvato

L'alcol batilico, cioè l'1-O-ottadecilglicerolo, intermedio chiave per la preparazione di fattori attivanti le piastrine, è ottenuto dal α -chetoestere per riduzione con baker's yeast con ottima resa (80%), ma con un e.e. mediocre (64%) (Schema 1.6). L'uso del *Saccharomyces cerevisiae* Kisato permette di ottenere un e.e. migliore (89%), ma fa calare drasticamente la resa (22%). Un e.e. veramente alto (99%), ma una resa estremamente bassa (15%), si ha con la *Torulopsis sp. Jyozokyoikai* 17.²¹



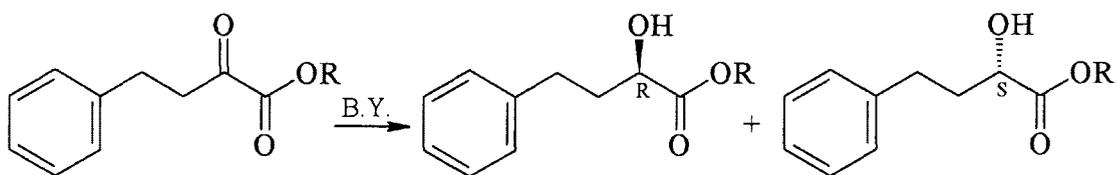
Schema 1.6

Talvolta la reazione di bioriduzione è accompagnata da reazioni secondarie. Ad esempio l'acido 2-oxo-2-fenil-acetico, messo nelle medesime condizioni di riduzione dell'alcol batilico, subisce decarbossilazione per dare l'alcol benzilico con una resa del 65%²², mentre l'acido 2-oxo-4-fenil-butirrico dà la corrispondente aldeide.²³ (Schema 1.7)



Schema 1.7 - Reazione di decarbossilazione in presenza di lievito

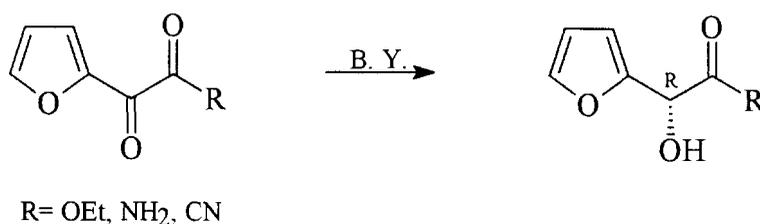
Per questo ultimo caso, a causa dell'elevata richiesta di (R)-2-idrossi-4-fenilbutirradi da parte dell'industria farmaceutica per la preparazione degli ACE inibitori (Angiotensin Converting Enzyme), sono state condotte bioriduzioni su diversi alchil 2-oxo-4-fenilbutirradi, in condizioni di minima presenza d'acqua e in solvente organico (dietiletere) da Nakamura e coll.²⁴ I risultati sono stati eccellenti sia dal punto di vista della resa (fino al 97%) che dell'e.e. (fino al 70%).(Schema 1.8)



R= CH₃, C₂H₅, C₃H₇, CH(CH₃)₂ etc.

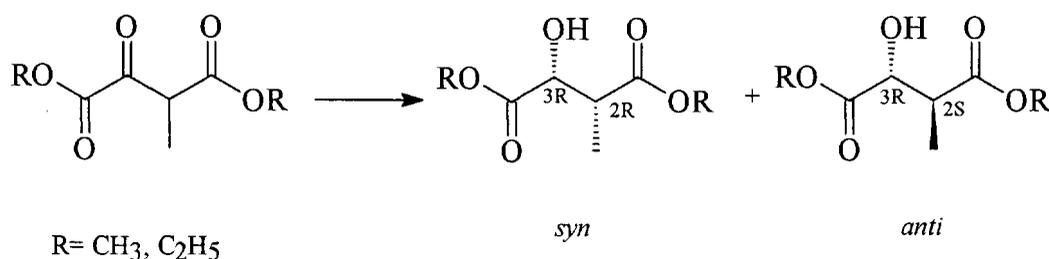
Schema 1.8 - Riduzione con lievito di alchil 2-oxo-4-fenilbutirradi

Anche la riduzione dei derivati dall'acido α -cheto-furilico²⁵ porta ai corrispondenti alcoli con configurazione assoluta **R** al carbonio carbinolico (Schema 1.9).



Schema 1.9

Sono note diverse riduzioni di α -cheto α,γ -diesteri: ad esempio la riduzione del 2-metil-3-oxosuccinato di etile porta alla formazione dei corrispondenti alcoli *syn* e *anti* (43:57) a configurazione **2R,3R** (79% e.e.) e **2S,3R** (31% e.e.) rispettivamente (Schema 1.10). Tuttavia eccessi enantiomerici più elevati si ottengono utilizzando la *Candida albicans* piuttosto che il *Saccharomyces cerevisiae*.²⁶

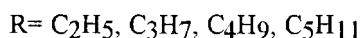


Schema 1.10 - Riduzione del 2-metil-3-oxosuccinato di metile e di etile

La riduzione dell'estere dimetilico porta ad una miscela inseparabile²⁷ di 2-metil-malato di metile²⁸ in rapporto *syn* e *anti* pari a 53:47 ed e.e. modesti; anche in questo caso l'uso della *Candida albicans* migliora notevolmente gli e.e.

In letteratura vi sono anche esempi di reazioni di riduzione con *Saccharomyces cerevisiae* condotte in solvente organico.^{29,30,31,32}

Ad esempio è stata studiata la riduzione di α -cheto esteri.³³ (Schema 1.11)



Schema 1.11 - Riduzione di α -chetoesteri

Nakamura ha verificato che la reazione di riduzione con lievito secco in benzene,³³ contenente una piccola quantità di acqua, porta ad (**R**)- α -idrossi esteri, cioè il sistema cambia stereoselettività rispetto alla reazione condotta in acqua. Il cambio di enantioselettività dipende da due ragioni: la prima è la prevenzione della decomposizione enantioselettiva dell'(**R**)- α -idrossi estere che si forma dalla riduzione, l'altra è l'accelerazione degli R-enzimi rispetto agli S-enzimi in condizioni di concentrazione controllata.

1.1.2 Uso degli enzimi in chimica organica

Gli enzimi sono catalizzatori molto efficaci, tipicamente la velocità di processi mediate da enzimi sono accelerate di un fattore di $10^8 \div 10^{10}$. Inoltre gli enzimi lavorano in condizioni blande di pH, temperatura e pressione e possono catalizzare un ampio spettro di reazioni; sono attivi in acqua ma possono funzionare anche in solvente organico, sono chemoselettivi, non danno luogo a reazioni secondarie, sono regio- e diastereoselettivi e sono soprattutto enantioselettivi.

Tuttavia gli enzimi presentano anche degli svantaggi: sono infatti disponibili in un'unica forma enantiomera, lavorano in condizioni di temperatura e pH che devono essere accuratamente controllate. Inoltre mostrano la maggior attività in acqua^{2,34} e l'uso di un solvente organico è possibile solo per alcune reazioni³⁵ come l'esterificazione e la sintesi del legame peptidico. Attualmente l'utilizzo di solventi organici nelle bioconversioni è un campo in via di sviluppo.³⁶

Gli enzimi purificati sono sistemi semplici e facilmente maneggiabili, il che consente un buon recupero finale del prodotto; essi sono però, in genere, molto costosi e spesso poco stabili.

L'impiego di enzimi non purificati è più economico, ma presenta degli svantaggi, quali la difficoltà di isolamento del prodotto finale e la possibilità di reazioni parallele non desiderate. Gli enzimi che vengono comunemente usati in chimica organica sono in forma grezza, dove solo l'1-30% è costituito dall'enzima, mentre il resto è composto da proteine inattive, sali tampone e carboidrati derivati dal brodo di fermentazione. Gli enzimi derivano dall'industria dei detersivi e da quella alimentare, soprattutto diverse proteasi e lipasi. Numerosi enzimi possono essere isolati da organi poco costosi di animali come fegato e reni, oppure da microrganismi; solo pochi enzimi sono ottenuti dalle piante.

Gli enzimi vengono classificati in base alla categoria di reazioni che catalizzano:

1. ossidoriduttasi (ossidazioni-riduzioni);
2. transferasi (trasferimento di piccoli gruppi);
3. idrolasi (idrolisi-condensazioni, transesterificazioni);
4. liasi (addizione-eliminazione di piccole molecole su legami C=C, C=N, C=O);
5. isomerasi (isomerizzazioni);
6. ligasi (formazione-rottura di legami C-X).

Le classi che vengono maggiormente utilizzate in sintesi organica sono quelle delle ossidoriduttasi e delle idrolasi.²

Tra le idrolasi, si utilizzano soprattutto le esterasi e le lipasi, meno le proteasi. Le ossidoriduttasi, sebbene ancora poco utilizzate,³⁷ si sono dimostrate in questi ultimi anni particolarmente utili per certi processi ecocompatibili. Per quanto riguarda il meccanismo di idrolisi enzimatica di amidi ed esteri esso è molto simile a quello descritto per l'idrolisi chimica catalizzata da una base.^{2a}

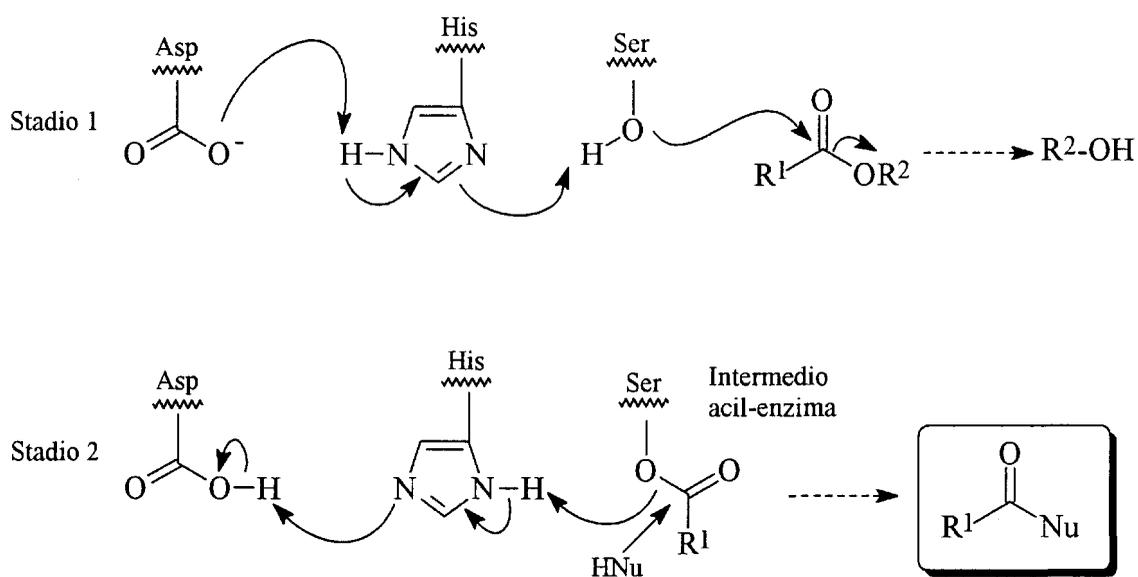
Un gruppo nucleofilo del sito attivo dell'enzima attacca il gruppo carbonilico del substrato estereo o amidico.

Questo nucleofilo può essere il gruppo alcolico di una serina (ad esempio nella Pig Liver Esterase, nella Subtilisina e nella maggior parte delle lipasi microbiche) o il gruppo carbossilico di un acido aspartico (pepsina) oppure la funzione tiolica di una cisteina (papaina).^{2a}

E' stato chiarito in dettaglio il meccanismo di idrolisi delle idrolasi seriniche. (Schema 1.12)

La serina, insieme a due altri amminoacidi, l'acido aspartico e l'istidina, formano la così detta "triade catalitica". Lo speciale riarrangiamento di questi tre gruppi determina una diminuzione del valore di pK del gruppo alcolico della serina, che rende possibile un suo attacco nucleofilo al gruppo carbonilico del substrato $R^1\text{-CO-OR}^2$ (stadio 1). Il gruppo acilico del substrato si lega covalentemente all'enzima, formando l'intermedio acil-enzima, mentre si libera la parte alcolica $R^2\text{-OH}$.

Successivamente un nucleofilo, generalmente l'acqua, attacca l'intermedio acil-enzima, rigenerando l'enzima e rilasciando un acido carbossilico $R^1\text{-CO-OH}$. (stadio 2, HNu eguale ad acqua).



Schema 1.12 - Meccanismo di azione della "triade catalitica"

Per mezzo di questa sequenza di reazioni l'enzima opera un riconoscimento molecolare del substrato dimostrando in genere preferenza per una delle possibili configurazioni.

Le idrolasi sono in grado di catalizzare diversi tipi di reazioni:

- differenziazione enantiofaciale di substrati achirali, del tipo enol esteri, che possiedono un piano di simmetria.
- differenziazione enantiotopica ad esempio asimmetrizzazione di composti *meso*
- risoluzione di un sistema chirale racemo nei suoi enantiomeri

Quando un substrato chirale racemo opportunamente funzionalizzato viene sottoposto ad idrolisi enzimatica, può avvenire che uno dei due enantiomeri presenti una maggiore affinità per il sito attivo dell'enzima rispetto all'altro e si ha quindi la risoluzione cinetica del racemo.

A differenza dei due primi tipi di trasformazione stereoselettiva sopra elencati, che mostrano una resa teorica del 100%, nel caso della risoluzione cinetica di un racemo ciascun enantiomero può essere ottenuto con una resa massima del 50% a meno che non siano presenti condizioni equilibranti l'antipodo non reattivo.

Nel caso ideale la differenza di velocità di conversione dei due enantiomeri è così elevata che, mentre uno viene trasformato rapidamente, l'altro rimane inalterato. Quindi la reazione enzimatica termina al 50% di conversione, quando viene a mancare l'enantiomero più reattivo. In realtà, nella maggior parte delle reazioni di risoluzione enzimatica, questa situazione ideale non si verifica mai, cioè il rapporto tra le velocità di conversione degli enantiomeri non è infinito ma è un numero misurabile. Si ha comunque una certa selettività poiché durante la reazione gli enantiomeri formano dei complessi diastereoisomeri enzima-stato di transizione che differiscono per il valore dell'energia libera ΔG^\ddagger .

Per esempio due substrati enantiomeri A e B competono per il sito attivo dell'enzima (Schema 1.13)

all'energia libera (che è $\Delta G^\ddagger = -RT \ln(k_{cat}/K_m)$), l'enantioselettività della reazione è legata alla differenza di energia tra gli stati diastereoisomeri:

$$\Delta\Delta G^\ddagger = (\Delta G_{A^\ddagger} - \Delta G_{B^\ddagger}) = -RT \ln(k_{cat}/K_m)_A / (k_{cat}/K_m)_B$$

In una risoluzione cinetica enzimatica che procede irreversibilmente, come avviene nel caso delle reazioni idrolitiche, in cui l'acqua è presente in elevata concentrazione, il rapporto delle costanti specifiche (o il valore del rapporto enantiomerico **E**) può essere correlato alla conversione (*c*) ed all'eccesso enantiomerico del substrato (*ee_s*) e del prodotto (*ee_p*).³⁸ Il parametro **E** è comunemente usato per caratterizzare l'enantioselettività di un enzima per un particolare substrato.

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad (1)$$

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} \quad (2)$$

Un'ulteriore equazione permette di calcolare **E** solamente da *ee_p* ed *ee_s*. Queste ultime sono quantità relative mentre la conversione è una quantità assoluta.

$$E = \frac{\ln \frac{[ee_p(1-ee_s)]}{(ee_p+ee_s)}}{\ln \frac{[ee_p(1+ee_s)]}{(ee_p+ee_s)}} \quad (3)$$

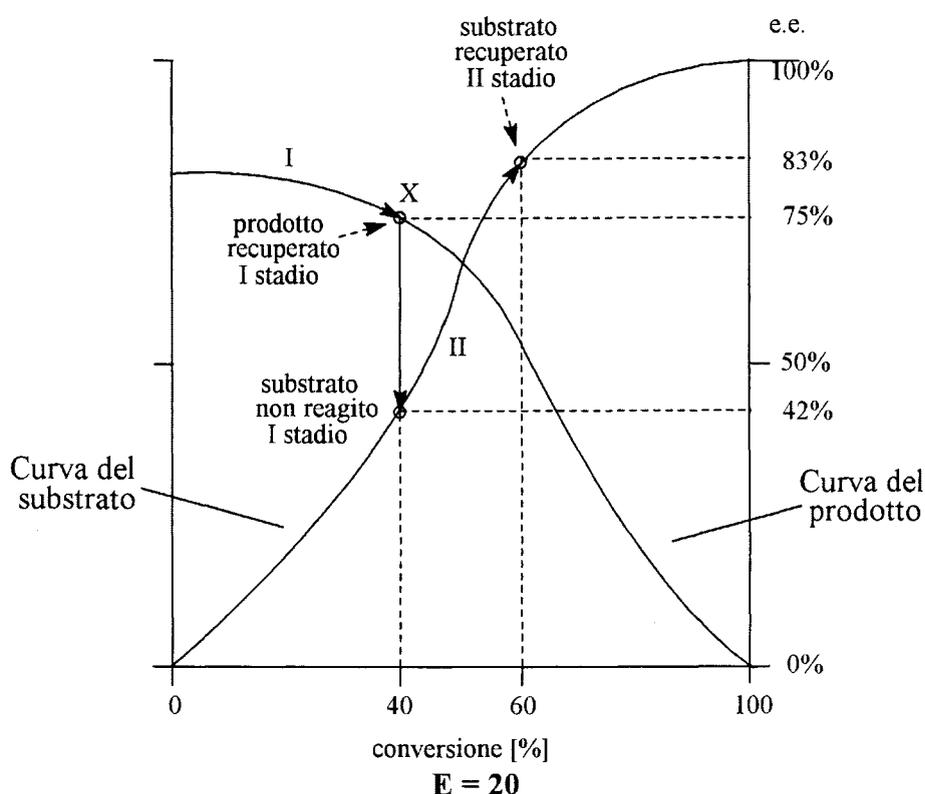
Recentemente sono stati proposti dei metodi alternativi per la determinazione sperimentale dei valori di **E**.³⁹

Il valore di **E** diviene allora una conveniente costante per valutare la "selettività" della risoluzione enzimatica. Usando le equazioni viste, le purezze ottiche di substrato non reagito e prodotto possono essere calcolate per ogni valore di conversione, a partire da un'unica misura di e.e. di substrato e prodotto.

In genere, valori di **E** inferiori a 15 sono troppo bassi per scopi pratici, da 15 a 30 vengono considerati moderati-buoni e al di sopra eccellenti; è da notare che valori di **E** >

200 non possono essere determinati con accuratezza a causa dell'imprecisione nella determinazione degli eccessi enantiomerici (via NMR, GLC, HPLC), poiché in questo range anche una variazione estremamente piccola di e.e._s o e.e._p causa una variazione significativa nel valore di **E**.

Per ottenere ottimi risultati nella risoluzione di substrati racemi, che mostrano una selettività moderata (**E** attorno a 20), si può procedere come segue: la reazione viene bloccata al 40% di conversione dove la curva del prodotto generalmente raggiunge il massimo di resa e di purezza ottica (punto X dello Schema 1.14).^{2a} (I stadio)



Schema 1.14 - Risoluzione enzimatica a due stadi

Si isolano il prodotto e il substrato non reagito; quest'ultimo, che mostra un valore basso di purezza ottica, viene sottoposto ad un secondo stadio idrolitico, finché la conversione totale del processo non raggiunge il 60%. Il substrato viene isolato con massima resa chimica e buona resa ottica. E' da rilevare, tuttavia, che quanto sopra si applica strettamente all'uso di un enzima purificato.

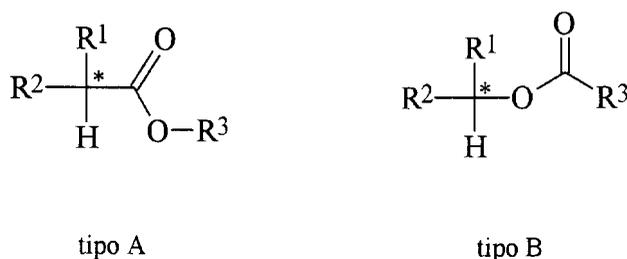
1.1.2.1 Idrolisi di esteri

1.1.2.1.a Esterasi e proteasi

A differenza del gran numero di lipasi microbiche, è disponibile solo uno scarso numero di vere “esterasi”, come le esterasi da fegato di maiale e cavallo (PLE^{40,41} e HLE rispettivamente).

Un'altra esterasi che ha dimostrato di catalizzare idrolisi di esteri non naturali con selettività eccezionalmente elevata è la acetilcolina esterasi. Nuovi enzimi ad attività esterasica continuano a venir introdotti nel campo della sintesi organica.^{42,43,44} Anche un gran numero di proteasi sono in grado di operare idrolisi selettive di esteri di acidi carbossilici e questo compensa il numero limitato di esterasi. Le proteasi usate più frequentemente per questo scopo sono soprattutto l' α -chimotripsina e la subtilisina.

Normalmente la PLE viene trattata assieme all' α -chimotripsina ed alla subtilisina, in quanto molto spesso vengono messe a confronto sugli stessi substrati. (Schema 1.15)



$\text{R}^1, \text{R}^2 =$ alchile, arile; $\text{R}^3 = \text{Me}, \text{Et}$

Schema 1.15 - Substrati per esterasi e proteasi

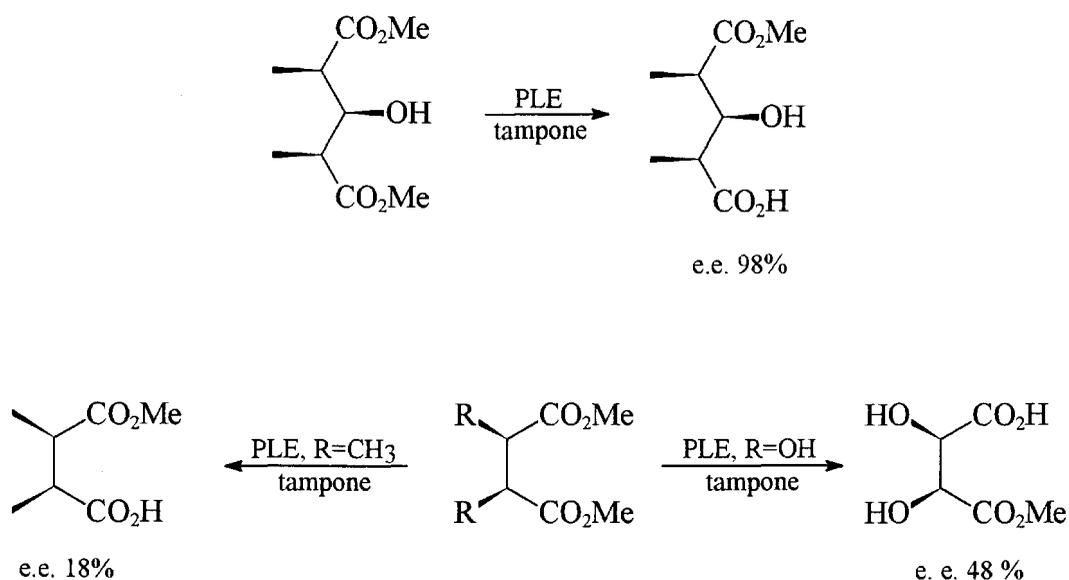
Sia per gli esteri di tipo A (dov'è l'alcol il termine a minor ingombro sterico) che di tipo B (dov'è il gruppo acilico ad essere maggiormente ingombrato) il centro di chiralità deve essere il più vicino possibile al sito di reazione per permettere un ottimo riconoscimento molecolare.

La PLE, che è l'enzima più versatile,⁴⁵ è costituzionalmente complessa e consiste di almeno cinque cosiddetti *iso*-enzimi. Dal punto di vista della chimica organica la miscela grezza può essere considerata come un singolo enzima, poiché tutte le subunità isoenzimatiche possiedono stereospecificità simile.⁴⁶

La PLE agisce idrolizzando gli esteri presenti nella dieta del maiale: ciò spiega l'elevata versatilità dell'enzima. Per le normali operazioni di sintesi organica non è necessario purificare l'enzima. Si utilizza infatti una polvere grezza precipitata dalle sue soluzioni con acetone (PLAP).⁴⁷

In genere la PLE viene utilizzata per rendere asimmetrici composti *meso*, mentre l' α -chimotripsina gioca un ruolo molto più importante nella risoluzione di esteri racemi.

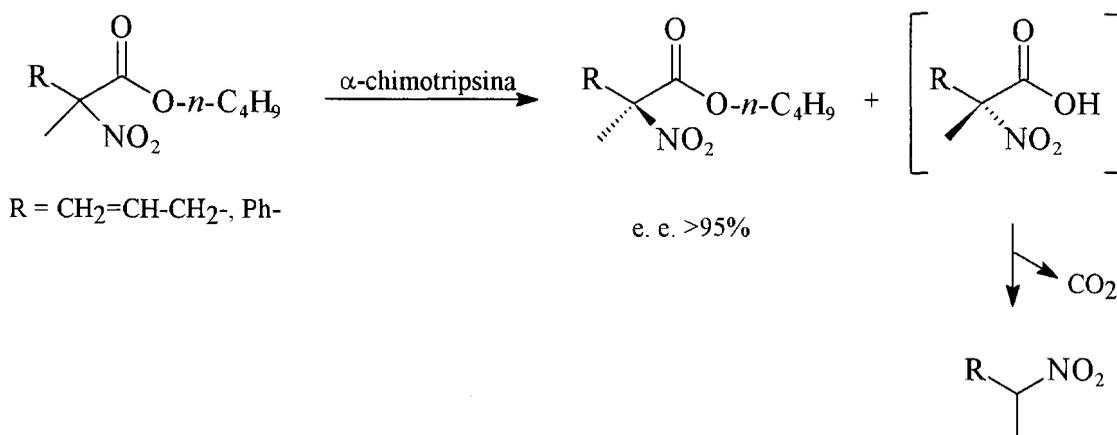
Ad esempio gli esteri aciclici *meso*, aventi come scheletro l'acido succinico o glutarico, sono dei buoni substrati per la PLE.⁴⁸ (Schema 1.16) Gli eccessi enantiomerici a volte sono molto buoni, a volte invece sono piuttosto modesti.



Schema 1.16 - Asimmetrizzazione di esteri *meso*-dicarbossilici aciclici con PLE

Una caratteristica importante perché i substrati esterei di tipo A (vedi Schema 1.15) vengano idrolizzati selettivamente dall' α -chimotripsina, è la presenza di un gruppo polare ed uno idrofobico in posizione α , come infatti si verifica negli amino acidi naturali.

Un esempio interessante è l'idrolisi di un α -nitro estere.⁴⁹ (Schema 1.17)



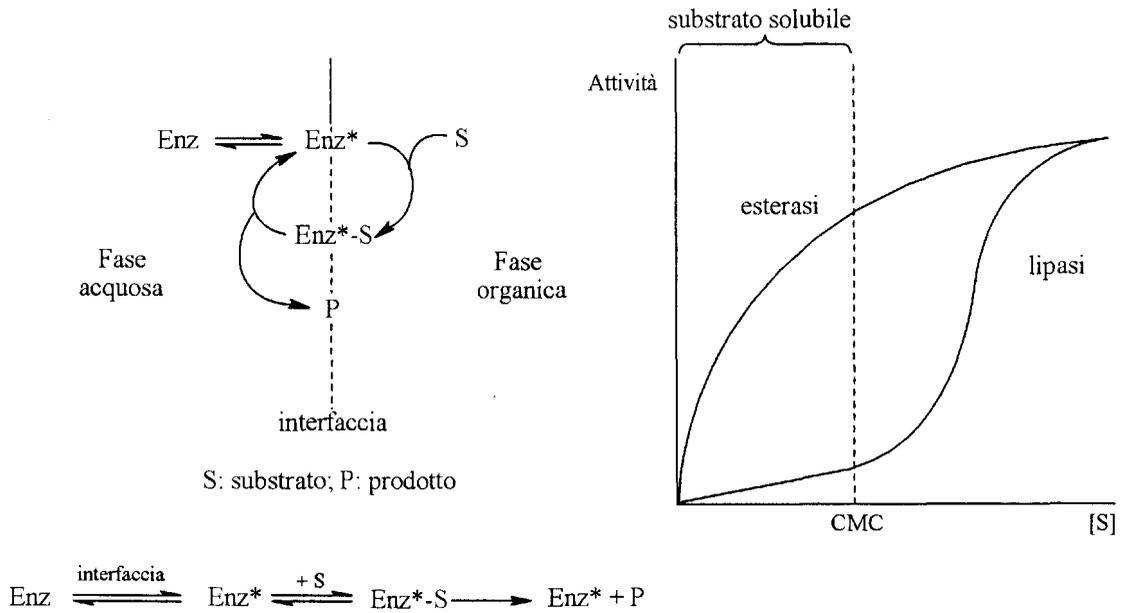
Schema 1.17 - Risoluzione di α -nitro- α -metil carbossilati con α -chymotripsina

Le proteasi come l' α -chymotripsina, la papaina e la subtilisina sono usate spesso per idrolisi regioselettive. La papaina, ottenuta dalla papaia, è uno dei pochi enzimi usati per la sintesi organica che ha origine dalle piante.

1.1.2.1.b Lipasi

Le lipasi sono gli enzimi preposti all'idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi e glicerolo.^{34a,50}

La differenza più importante tra lipasi ed esterasi è la loro interazione chimico-fisica con i substrati. A differenza delle esterasi che mostrano una normale attività secondo Michaelis-Menten, le lipasi mostrano scarsa attività in soluzioni acquose con substrati solubili. Infatti quando la concentrazione del substrato viene aumentata gradualmente fino a raggiungere il suo limite di solubilità, allora si verifica un brusco incremento dell'attività della lipasi. La caratteristica delle lipasi di essere attive solo oltre la concentrazione micellare critica (CMC) viene detta "attivazione interfacciale". (Schema 1.18) Questo suggerisce un cambiamento conformazionale delle lipasi all'interfaccia substrato-acqua. Tale cambiamento conformazionale è supportato da analisi ai raggi X della struttura di lipasi da *Mucor miehei*⁵¹ ed altre. Perciò le idrolisi catalizzate dalle lipasi devono essere condotte in un sistema bifasico. L'aggiunta di un solvente organico, immiscibile con acqua, nelle reazioni catalizzate da lipasi, è una tecnica molto usata per incrementarne l'attività catalitica.^{35,36}

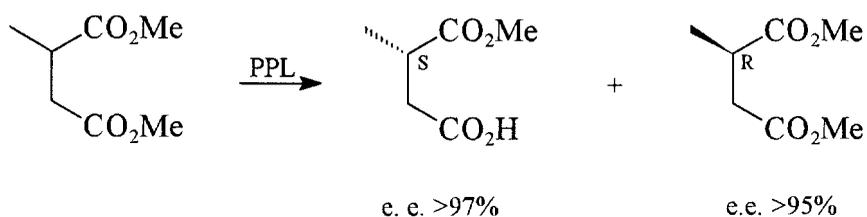


Schema 1.18 - Catalisi all'interfaccia

Un numero elevato di lipasi è prodotto da batteri o funghi, mentre un numero molto minore è estratto da organi di animali; la lipasi più usata è quella isolata dal pancreas di maiale (PPL).^{2a}

Essa è ottenibile in forma semi-purificata ad un prezzo molto elevato. Normalmente viene utilizzata in una forma grezza chiamata "pancreatina" o "steapsina", che è un complesso formato da diversi enzimi a proprietà idrolitiche come l' α -chimotripsina, la carbossipeptidasi B e la colesterol esterasi. L' α -chimotripsina e la colesterol esterasi possono competere con la PPL nell'idrolisi dell'estere. Nonostante la possibile interferenza di differenti enzimi idrolitici, vi sono comunque molti esempi di idrolisi altamente stereoselettive utilizzando la PPL grezza.

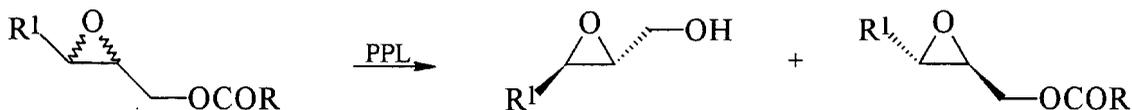
Essa è in grado di idrolizzare con regio- ed enantioselettività substrati come ad esempio il dimetil 2-metil succinato.⁵² Essa mostra una preferenza per l'estere S e l'idrolisi avviene sul gruppo metossicarbonilico più distante dallo stereocentro. (Schema 1.19)



Schema 1.19 - Idrolisi regio- ed enantioselettiva del α -metilsuccinato di dimetile con PPL

Si recupera l'estere non reagito con un eccesso enantiomerico > 95%, mentre il semiestere, che ha un e. e. del 73%, viene riciclato e sottoposto ad una seconda idrolisi portandolo a una purezza ottica del 97%.

E' anche interessante la capacità della PPL di risolvere esteri epossidici, in quanto non viene disattivata da una possibile reazione dei suoi siti nucleofili con il gruppo epossidico. (Schema 1.20)⁵³



R1=H, Me, Et, *n*-Pr; R= Me, Et, *n*-Pr, *n*-Bu

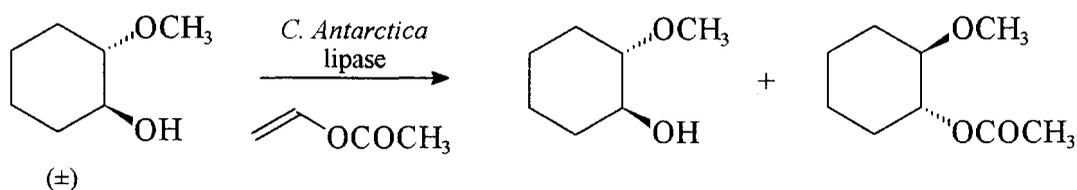
Schema 1.20 - Risoluzione di esteri epossidici con PPL

Diverse lipasi grezze si ottengono dai lieviti *Candida lipolytica*, *Candida antarctica* e *Candida rugosa* (CRL). Ad esempio la CRL riesce ad accogliere nel suo sito attivo anche esteri relativamente ingombranti.^{2a} Viceversa le lipasi batteriche isolate dalla *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, mostrano di possedere un sito attivo più "piccolo" di quello della CRL poiché spesso non riescono ad accogliere substrati ingombranti, mentre invece si mostrano molto selettive verso substrati relativamente piccoli.^{2a}

Le lipasi ottenute dalla specie *Mucor*, come *Mucor miehei* e *Mucor javanicus* (*Rhizomucor*) sono state usate per le biotrasformazioni solo di recente. Lo studio della struttura tridimensionale della lipasi da *Mucor miehei* ha rivelato che l'operatore chimico

di questa idrolasi è la triade catalitica Asp-His-Ser come per le altre lipasi.⁵¹

E' da sottolineare inoltre che le lipasi possono essere reversibilmente utilizzate per le reazioni di esterificazione. Ad esempio la lipasi da *Candida antarctica* in presenza di vinilacetato catalizza selettivamente la formazione dell'estere del *trans*-1-idrossi-2-metossicicloesano racemo. (Schema 1.21)⁵⁴

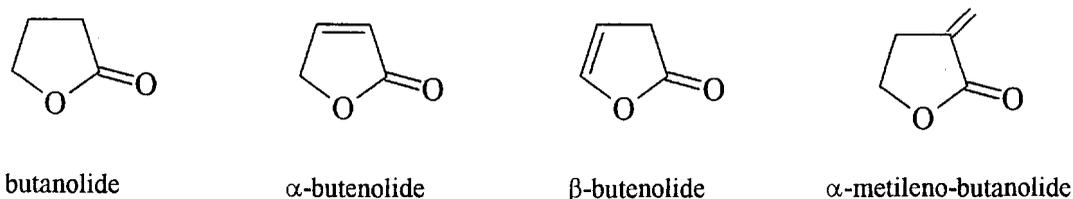


Schema 1.21

La Glaxo Wellcome ha recentemente usato questa procedura, che utilizza l'acetato di vinile sia come solvente che come donatore di acetile, per la produzione industriale (1 tonnellata) di un intermedio per la sintesi di un suo nuovo antibiotico.

1.2 LATTONI

La funzione lattonica è presente in una grande varietà di prodotti naturali e composti biologicamente attivi.⁵⁵ In particolare i γ -lattoni saturi, detti anche genericamente butanolidi e quelli insaturi, detti butenolidi, (Schema 1.22) sono quelli più studiati, data la loro ampia diffusione tra le sostanze naturali, specialmente di origine vegetale.⁵⁶



Schema 1.22 - γ -lattoni saturi ed insaturi

In particolare, γ -lattoni chirali funzionalizzati sono componenti di profumi, feromoni di attrazione sessuale di insetti diversi e regolatori della crescita delle piante. Sono anche utili intermedi chirali nella sintesi di alcaloidi,⁵⁷ antibiotici macrociclici,⁵⁸ lattoni lignei,⁵⁹

feromoni⁶⁰ e farmaci di vario uso tra i quali si annoverano soprattutto antileucemici e antitumorali.⁶¹

L'attività fisiologica di questi γ -lattoni naturali spesso dipende dalla purezza ottica e dalla configurazione assoluta. Ciò accade specialmente nel caso di feromoni sessuali di insetti, dove anche la presenza di piccole quantità dell'enantiomero riduce enormemente l'attività biologica del composto.⁶²

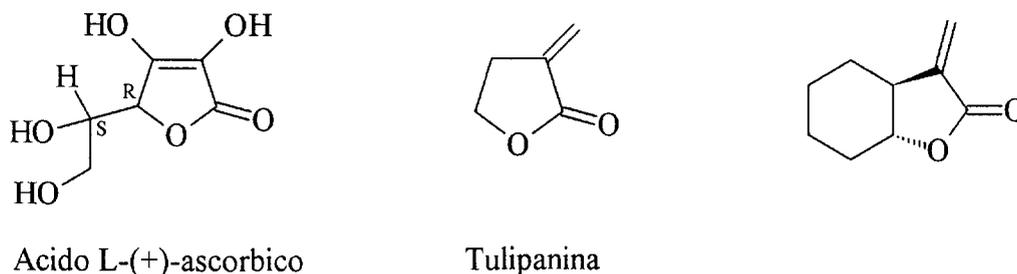
γ -Butirrolattoni- γ -sostituiti otticamente attivi costituiscono una parte molto importante di questa classe di composti. Alcuni di questi sono riportati nello Schema 1.23. Sono stati preparati per trasformazione di prodotti naturali chirali, riduzione microbica di γ -chetoacidi, risoluzione enzimatica o via induzione chirale con reagenti chimici chirali.^{55b}



Schema 1.23 - γ -butirrolattoni- γ -sostituiti

Di particolare interesse sono i γ -lattoni insaturi, con i doppi legami che possono essere *endo* o *eso*. Molti prodotti naturali presentano insaturazione di tipo *endo*,⁶³ ne è un esempio l'acido L-(+)-ascorbico, noto anche come vitamina C (Schema 1.24).

L'interesse per gli α -metileno- γ -lattoni⁶⁴ nasce dalla scoperta che un numero notevole di sesquiterpeni di origine vegetale, contenenti tale nucleo - anche composti semplici quali quelli riportati nello Schema 1.24⁶⁵ - possiedono notevoli proprietà antivirali e/o antitumorali.

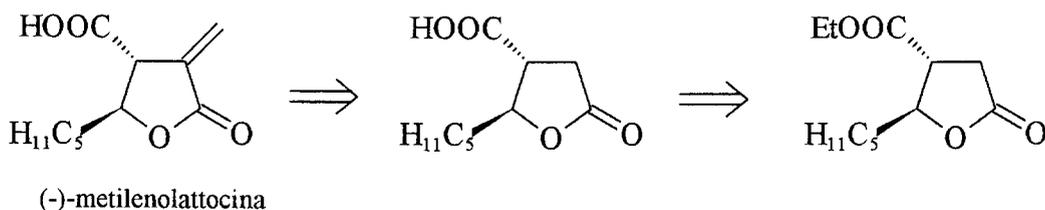


Schema 1.24 - γ -lattoni insaturi

Uno dei α -metileno- γ -lattoni funzionalizzati di maggior interesse per le sue accertate proprietà antitumorali è la (-)-metilenolattocina⁶⁶ (Schema 1.25).

La (-)-metilenolattocina è stata isolata per la prima volta da una coltura di *Penicillium sp.* da Nakayama e collaboratori.^{66b} Recentemente sono state proposte in letteratura alcune sintesi totali della (-)-metilenolattocina. La prima è stata proposta da Greene^{66d}, più di recente G. Zhu^{66e} ha preparato la (-)-metilenolattocina a partire dall'(R)-1-acetossi-2-nonil-4-olo, otticamente attivo, in sette passaggi; lo stesso numero di passaggi sono stati impiegati da Mawson^{66f} attraverso una ciclizzazione radicalica a trasferimento di atomo di iodio. Dato che la (-)-metilenolattocina è facilmente ottenibile per metilazione del lattone acido precursore (Schema 1.25), alcuni autori hanno prestato particolare attenzione alla sintesi di quest'ultimo, ottenuto generalmente secondo processi piuttosto complessi.⁶⁷

Nei laboratori di sintesi organica del Dipartimento di Scienze Chimiche è stato sintetizzato il lattone acido, diretto precursore della (-)-metilenolattocina.⁶⁶ Si è partiti dal corrispondente lattone estereo, che è stato risolto con PPL.^{66a} (Schema 1.25) La PPL ha dato il lattone acido con un e. e. del 98%.



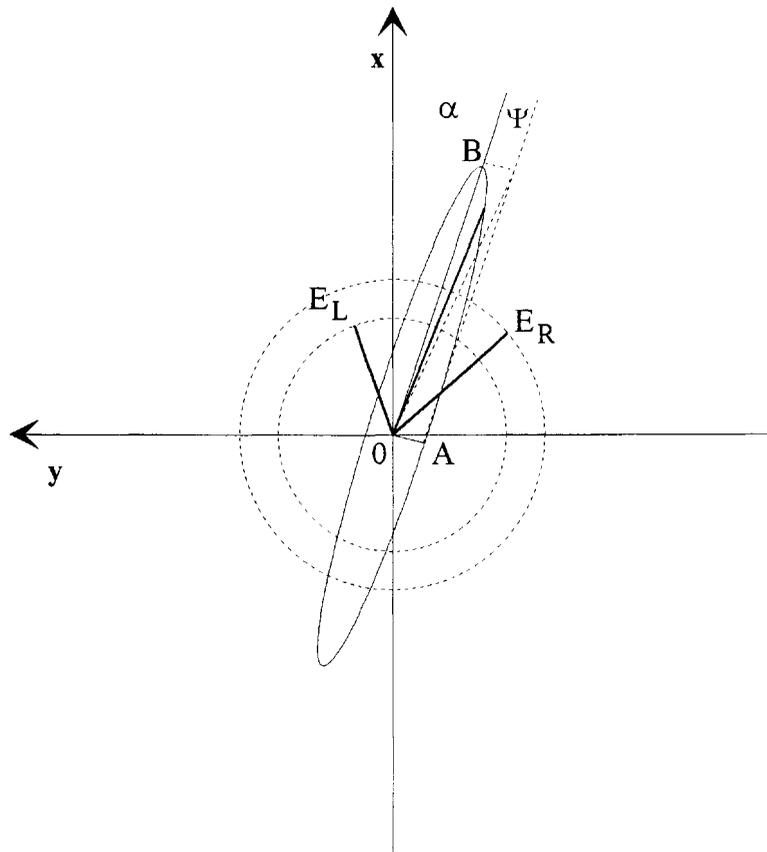
Schema 1.25 - Retrosintesi della (-)-metilenolattocina

1.3 IL DICROISMO CIRCOLARE

La polarimetria, la dispersione ottica rotatoria (ORD - Optical Rotatory Dispersion) e il dicroismo circolare (CD - Circular Dichroism) sono i cosiddetti metodi chirottici. Si basano sull'interazione tra il centro chirale nell'analita e la radiazione elettromagnetica polarizzata incidente.⁶⁸

Il dicroismo circolare è senz'altro la tecnica più sofisticata dei tre metodi chirottici.^{68a} Essa può essere applicata solo a molecole chirali, contenenti cromofori che assorbono nella zona dello spettro elettromagnetico UV. Se il centro chirale e il cromoforo sono strutturalmente adiacenti uno all'altro, si ha un arrangiamento chiamato chiroforo. Si può assumere che la luce piano polarizzata consista di due raggi di luce circolarmente polarizzata in fase, ma con verso opposto di rotazione. In un mezzo chirale, i due raggi circolarmente polarizzati si propagano con velocità differente, cioè si differenziano nella fase, a causa del fatto che l'indice di rifrazione del mezzo non è uguale per entrambi. Ciò comporta una rotazione α del piano della luce polarizzata. Quando è presente un gruppo cromoforo, si ha anche un differente assorbimento dei raggi circolarmente polarizzato a destra e polarizzato a sinistra, ottenendo in uscita un raggio ellitticamente polarizzato. (Schema 1.26) Questo comportamento viene definito effetto Cotton ed è limitato al range di lunghezze d'onda della banda di assorbimento del gruppo cromoforo.⁶⁹ L'asse maggiore dell'ellisse è ruotato rispetto al piano originario di polarizzazione dell'angolo α e l'ellitticità viene definita come:

$$\Psi = \arctg (OA/OB)$$



Schema 1.26 - Rotazione α ed ellitticità Ψ del piano della luce polarizzata

La relazione matematica è:

$$\Psi = 2.303 (A_L - A_R) 180 / 4\pi \quad \text{gradi} \quad (1)$$

dove A_L e A_R sono le assorbienze della luce circolarmente polarizzata sinistra e destra.

L'ellitticità specifica è espressa come:

$$[\Psi] = \Psi / l \quad c$$

mentre l'ellitticità molare viene espressa con la seguente relazione:

$$[\Theta] = [\Psi] M / 100$$

oppure come:

$$[\Theta] = 100 \Psi / c \quad l \quad (\text{gradi } M^{-1} \text{cm}^{-1}) \quad (2)$$

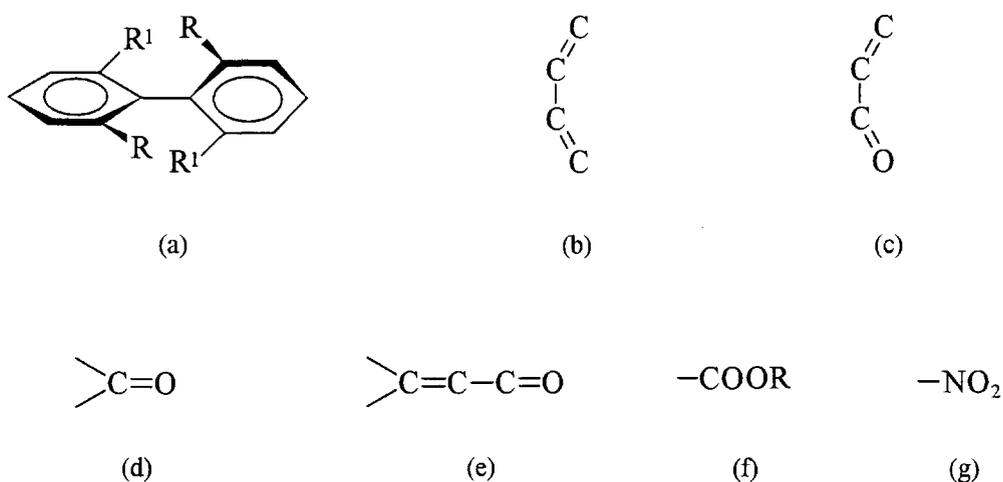
c è la concentrazione espressa in mol/litro e l il cammino ottico espresso in cm.

Talvolta il dicroismo circolare è espresso come $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ dove ε_L ed ε_R sono i coefficienti di estinzione molare della sostanza per la radiazione circolarmente polarizzata sinistra e destra rispettivamente.

Utilizzando le equazioni (1) e (2) e la legge di Lambert-Beer, si trova che l'ellitticità molare è legata al $\Delta\epsilon$ secondo la seguente relazione:

$$[\Theta] \cong 3300 \Delta\epsilon$$

Per quanto riguarda la natura dei cromofori, si possono distinguere due tipi diversi di cromofori, quelli "intrinsecamente dissimmetrici", come ad esempio derivati bifenilici, dieni ed enoni coniugati non planari e quelli "intrinsecamente simmetrici ma perturbati dissimmetricamente", dall'intorno chirale. (Schema 1.27)



Schema 1.27 - (a), (b), (c) sono esempi di cromofori "intrinsecamente dissimmetrici"; (d), (e), (f) e (g) sono cromofori "intrinsecamente simmetrici ma perturbati dissimmetricamente"

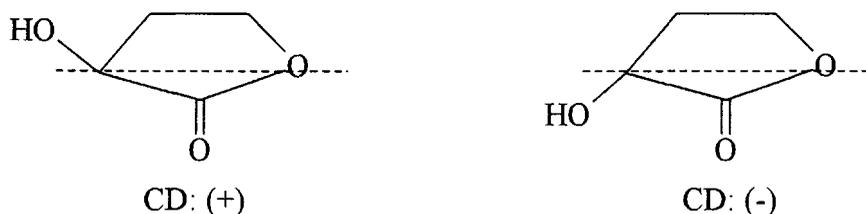
Le tecniche ORD e CD sono indispensabili per la determinazione di configurazioni assolute e relative e di conformazioni. Trovare la relazione tra il segno dell'effetto Cotton e la geometria della molecola non è semplice. E' possibile effettuare calcoli teorici, ma più utilizzato è il metodo semiempirico che prende in considerazione l'effetto della perturbazione indotta dalla presenza di vari sostituenti sul segno dell'effetto Cotton della banda del cromoforo.

In letteratura sono riportate numerose regole per vari cromofori. Vengono nel presente lavoro citate quelle che riguardano la determinazione della configurazione assoluta di γ -lattoni saturi.⁷⁰

1.3.1 Dicroismo Circolare nei lattoni

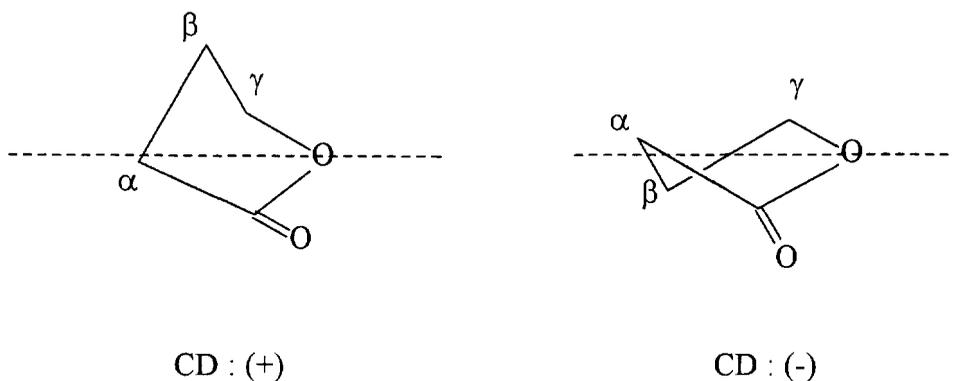
Esistono diverse teorie che correlano la configurazione assoluta dei lattoni saturi con il segno della curva CD, sulla base di valutazioni di carattere strutturale. Tra queste vengono largamente utilizzate, in quanto di semplice applicazione, le regole di Okuda^{70e} e Beecham.^{70b,c}

Per Okuda il segno dell'effetto Cotton della banda correlata con la transizione $n \rightarrow \pi^*$ dipende dalla configurazione del C_α . Orientando l'anello lattonico come riportato nello Schema 1.28, se il sostituente al C_α è situato sopra il piano medio dell'anello lattonico, il segno dell'effetto Cotton è positivo, mentre se è situato al di sotto è negativo.



Schema 1.28 - Regola di Okuda

Secondo Beecham invece, in generale il segno dell'effetto Cotton è determinato dalla chiralità dell'anello eterociclico stesso. In particolare esso dipende dalla posizione che il C_β assume rispetto al piano medio dell'anello. Se il C_β è situato al di sopra, l'effetto Cotton è positivo, se è posizionato al di sotto l'effetto Cotton è negativo (Schema 1.29)



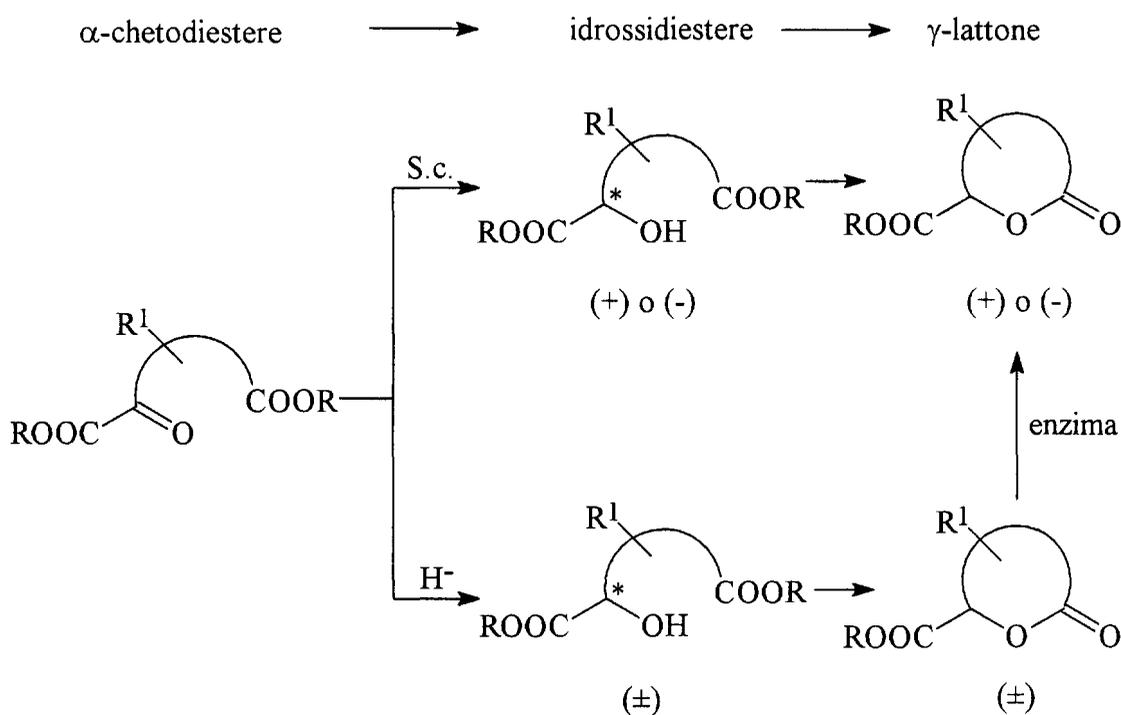
Schema 1.29 - Regola di Beecham

1.4 SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro è parte di un progetto di ricerca che ha come finalità la sintesi di γ -lattone polifunzionalizzati enantiomericamente puri.

I processi coinvolti sono di tipo chemo-enzimatico e la enantiodifferenziazione viene indotta o per bioriduzione di un sistema chetonico prochirale o per risoluzione cinetica enzimatica di uno degli intermedi del processo sintetico o addirittura del lattone finale chirale racemo.

In particolare, ci si è proposti di utilizzare come substrati prochirali α -chetodiesteri di diversa complessità, i quali, per riduzione con lievito da panettiere (*Saccharomyces cerevisiae*), avrebbero fornito l'idrossidiestere chirale, precursore del corrispondente γ -lattone otticamente attivo (Schema 1.30)



Schema 1.30

Alternativamente, una riduzione chimica del chetodiestere avrebbe portato all'idrossidiestere racemo, facilmente lattonizzabile nel corrispondente lattone racemo.

L'utilizzo di idrolasi, del tipo esterasi e lipasi, avrebbe operato la risoluzione cinetica

di questi ultimi, portando ai γ -lattoni enantiomericamente puri.

Per quanto concerne le strutture obiettivo del lavoro, si è operato sia nel campo dei sistemi γ -lattonici polifunzionalizzati monociclici che in quello dei sistemi lattonici condensati biciclici.

Gli uni e gli altri sono stati studiati, come “building blocks” chirali, per l’ottenimento di α -metileno derivati che, in anni recenti, hanno attratto considerevole attenzione.

Infatti l’attività antibiotica e inibitoria tumorale di sesquiterpeni naturali è stata attribuita al sistema α -metileno lattonico. Poiché molti prodotti naturali di questo tipo sono eccessivamente tossici per essere considerati di uso clinico, l’interesse si è rivolto verso la sintesi di composti più semplici, nella speranza che qualcuno di questi potesse esibire un indice terapeutico più favorevole.

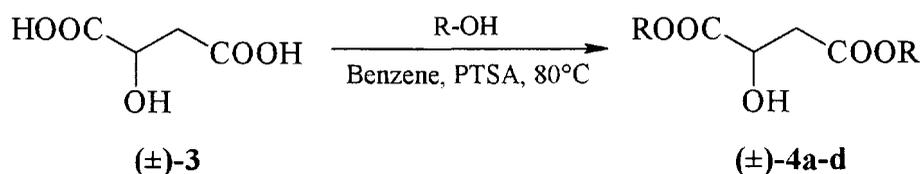
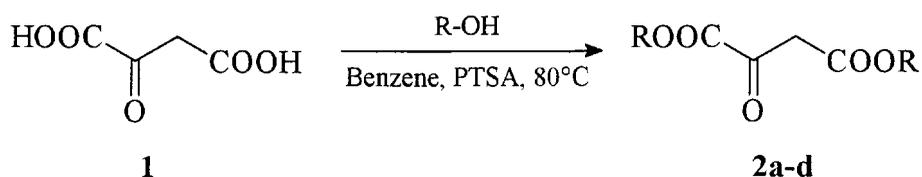
CAPITOLO 2

RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1 RIDUZIONE DI DIALCHIL OSSALACETATI CON LIEVITO DA PANETTIERE (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

L'acido malico **3** otticamente attivo è un sintone chirale estremamente versatile per sintesi enantiomericamente pure di diverse classi di composti come lattoni,⁷¹ feromoni,⁷² idrossi tetraidrofurani.⁷³

Nella prima parte del lavoro di tesi per il dottorato si è affrontata la sua sintesi per via biocatalitica utilizzando il lievito da panettiere, a partire dal corrispondente derivato carbonilico, l'acido ossalacetico **1**.



	R
a	-CH ₃
b	-CH ₂ CH ₃
c	-(CH ₂) ₂ CH ₃
d	-CH(CH ₃) ₂

Schema 2.1 - Sintesi dei dialchil ossalacetati **2a-d** e dei dialchil malati **4a-d**

I dialchil ossalacetati **2a-d** vengono facilmente sintetizzati, per esterificazione dell'acido ossalacetico **1** con i corrispondenti alcoli in benzene o toluene ed acido para-toluensolfonico in quantità catalitica ed eliminando l'acqua di reazione per distillazione azeotropica. Allo stesso modo si sintetizzano i dialchil malati **4a-d** a partire dall'acido

malico racemo **3**. (Schema 2.1).

I diesteri così ottenuti presentano una purezza elevata (tra 90 ed il 98%), stabilita mediante gas cromatografia.

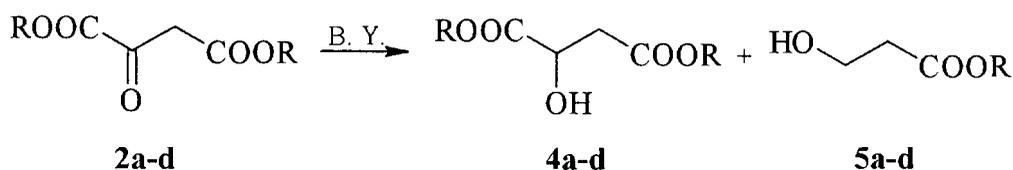
Per quanto riguarda la bioconversione dei sistemi **2a-d** utilizzando il lievito da panettiere, c'è da notare che in letteratura⁷⁴ è stato recentemente riportato l'isolamento dalle sue cellule di sette enzimi, i quali catalizzano la riduzione di chetoesteri ad idrossiesteri.

Uno di questi, designato YKER-III (yeast ketoester reductase), è l'alcol deidrogenasi NAD(P)H-dipendente che catalizza l'ossidoriduzione etanolo-acetaldeide nelle cellule di lievito; YKER-I, -VI e VII corrispondono agli enzimi che sono anche responsabili delle riduzioni dei β -chetoesteri⁷⁵ mentre gli altri tre enzimi YKER-II, -IV e -V sono specifici nelle riduzioni degli α -chetoesteri ed in particolare il primo ed il terzo danno l'alcol a configurazione **S**, mentre il secondo fornisce l'enantiomero **R**.

In presenza di un sistema multienzimatico così complesso, parametri quali l'aggiunta al mezzo di bioconversione di glucosio²⁹, di un solvente^{33,76} e la presenza di eventuali inibitori⁷⁷ possono influenzare sia l'e.e. che la stereoselettività della reazione. Per quanto riguarda questi ultimi ad esempio è stato notato che l'allil bromuro inibisce fortemente l'attività degli enzimi **R** nella riduzione con lievito, e che questo effetto è dipendente dal tempo di preincubazione. Man mano che questi aumenta (fino ad un massimo di 4h) cresce anche l'eccesso enantiomerico dell'alcol a configurazione **S** che si ottiene.

Anche l'allil ioduro si è dimostrato efficiente come inibitore selettivo degli enzimi **R**, mentre al contrario l'allil cloruro non ha avuto alcun effetto.

La bioriduzione con *Saccharomyces cerevisiae* di α -chetoesteri è accompagnata anche da una biotrasformazione parallela.^{24,33,1} Anche per i nostri prodotti si è notata la formazione di un secondo prodotto di reazione individuato come il corrispondente alchil β -idrossipropionato **5a-d**, con rese, conversioni e rapporto tra i due prodotti di reazione variabili e dipendenti dalla natura dell'alchile. (Schema 2.2)



Schema 2.2 - Riduzione con lievito da panettiere

Tutte le riduzioni sono state seguite gascromatograficamente per confronto con i racemi alcolici **4a-d** (Schema 2.1). Gli e.e. degli alcoli **4a-d** sono stati determinati sempre mediante analisi HRGC chirale. Solo l'alcol **4c** non è stato separato da nessuna delle colonne chirali a disposizione: lo si è quindi trasformato per transesterificazione chimica nell'alcol **4b**.

La configurazione assoluta dei dialchil malati **4** è stata determinata per confronto tramite HRGC chirale con gli esteri dell'acido S-(-)-malico **3**, prodotto Aldrich, avente un e.e. del 99%,.

E' stata ripetuta la bioriduzione dell'etil derivato **2b** nelle condizioni utilizzate da Santaniello e coll.⁷⁸ E' stata usata una quantità di sodio dietil ossalacetato pari a 0.07M, con un rapporto lievito/substrato pari a 1.75g/mmol, come nutriente del microrganismo è stato usato il saccarosio; dopo 2h si è ottenuto il dietil S-(-)-malato **4b** con un e.e. del 98%.

La reazione è stata seguita tramite gas-cromatografia chirale e si è osservato che dopo 1h la conversione del chetodiestere **2b** era totale, e che l'alcol **4b** aveva un e.e. solo del 56%. Proseguendo le analisi nel tempo, si è osservato che dopo 24h l'e.e. era del 98%. Evidentemente il lievito operava enzimaticamente sull'alcool da agente di distruzione asimmetrica.^{24,1}

Sono state fatte altre prove variando le condizioni di reazione. (Tabella 2.1)

Tabella 2.1 - Bioriduzioni del composto **2b**

Condizioni	e.e.(%)	Config.	Tempo
A	98%	S	1g
B	95%	S	3g
C	90%	S	6g
D	57%	S	3g
E	-	-	4g

A: condizioni riportate in letteratura;⁷⁸ B: $[2b]=0.05M$, 10g di lievito/mmol di substrato, tempo di incubazione 30min a 50°C; C: $[2b]=0.05M$, 1g di lievito Sigma/mmol di substrato, tempo di incubazione 30min a 50°C; D: 10g di lievito Sigma/mmol di substrato, 0.6ml tampone acetato/g di lievito, 50ml benzene/mmol di substrato; E: $[2b]=0.05M$, 1.4g di lievito Sigma/mmol di substrato, 0.04ml di allil bromuro, 1.5g di saccarosio.

Evitando l'aggiunta di saccarosio e aumentando la quantità di lievito, l'andamento della reazione non cambiava: dopo 3h si aveva la completa riduzione del chetodiestere **2b** ma l'alcol **4b** presentava un modesto e.e. del 36%. Cambiava notevolmente invece il tempo di distruzione asimmetrica: in queste condizioni infatti il lievito ha impiegato 72 ore per portare l'e.e. dell'alcol **4b** al 95%.

Si è voluto valutare se, utilizzando il lievito Sigma (dry baker's yeast Sigma, Type II), si avessero risultati diversi da quelli ottenuti con il comune lievito da panettiere. Il lievito secco ha senz'altro il vantaggio di avere ceppi più selezionati, un contenuto d'acqua più facilmente controllabile rispetto al lievito grezzo e permette l'ottenimento di purezze ottiche più riproducibili. Inoltre la quantità di lievito Sigma utilizzata è di un decimo inferiore a quella utilizzata nel caso del lievito grezzo. Anche dal punto di vista della durata il lievito secco si mantiene attivo per più tempo rispetto al comune lievito. L'aspetto qualitativo più importante è la possibilità di uso del lievito secco in solvente organico.²⁴ L'unico svantaggio del lievito secco è costituito dal costo che è circa 120 volte più alto di quello del lievito comune.

Nella riduzione di **2b** tuttavia l'utilizzo di lievito Sigma ha reso ancora più lenta la reazione: dopo 16h si otteneva l'alcol con un e.e. del 64%, che aumentava al 90%

appena dopo 6 giorni.

Quello che accomuna queste tre riduzioni condotte in condizioni diverse, è comunque sempre la presenza del 3-idrossipropionato di etile **5b**. Nel tentativo di diminuire la formazione dell'idrossiestere **5b**, non voluto perchè abbassa la resa chimica di **4b**, si sono variate le condizioni di biotrasformazione. Come solvente è stato scelto il benzene, che in letteratura è risultato essere il migliore per quanto riguarda le riduzioni degli α -chetoesteri.^{33,76} Poichè la bioriduzione non avviene in solvente organico anidro, si è aggiunta al sistema una soluzione di tampone ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) a pH 5 pari a 0.6ml di $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ di lievito, utilizzando come bioriduttore il lievito Sigma. Sorprendentemente a differenza di quanto trovato da Nakamura e coll.³³ non si è riscontrata alcuna inversione di stereoselettività verso l'enantiomero **R**.

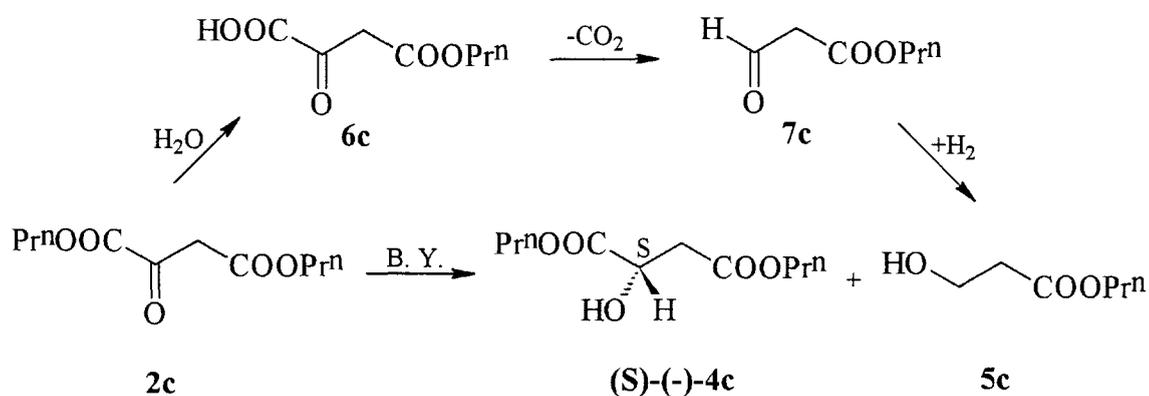
Inoltre è stato provato l'effetto di un inibitore quale il bromuro di allile⁷⁷ efficace sugli enzimi **R**, che presiedono alla riduzione dei β -chetoesteri. Contrariamente ai dati di letteratura,⁷⁷ si è trovato che esso funziona da inibitore sia degli enzimi **R** che degli enzimi **S**. Infatti dopo 4 giorni non vi era alcuna traccia di alcol **4b** né del 3-idrossipropionato di etile **5b**.

Nakamura^{24,33,1} aveva osservato inoltre che alcuni α -idrossiesteri derivati per bioriduzione da α -chetoesteri, quali il piruvato di etile e l' α -oxo-butirrato di etile, subivano, nel mezzo di reazione, una decomposizione asimmetrica con distruzione dell'enantiomero **R**. Per confermare ciò egli mise l'alcol racemo in acqua con il lievito nelle stesse condizioni della bioriduzione dell' α -chetoestere ed osservò nel tempo un aumento dell'e.e. dell'enantiomero **S**, in accordo con l'ipotesi formulata.

In base a quanto trovato da Nakamura e dalle osservazioni fatte durante la riduzione del chetodiesteri **2b**, si è tentato di risolvere l'alcol **4b** nelle stesse condizioni utilizzate da Santaniello.⁷⁸ (Schema 2.3).

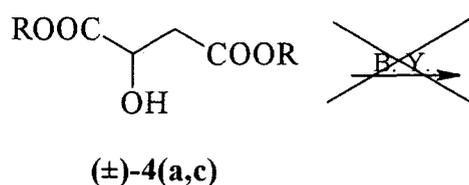
La bioriduzione viene seguita nel tempo e contrariamente ai casi precedenti non vi è distruzione asimmetrica di **4a**. L'e.e. infatti rimane costante nel tempo. A conferma di ciò, il tentativo di risolvere l'alcol **4a** racemo con il lievito non ha dato alcun risultato. Infatti, anche dopo 4 giorni, si recupera inalterato l'alcol racemo. Non è stato possibile individuare la presenza del composto decarbossilato **5a**.

Un comportamento analogo è stato trovato per il di-*n*-propil ossalacetato **2c**. Dopo 2h dall'inizio della bioriduzione si isola l'alcol S-(-)-**4c** con un e.e. del 94% (Schema 2.5).



Schema 2.5 - Riduzione con lievito di **2c**

Contrariamente al caso del metil derivato è stato isolato il *n*-propil 3-idrossipropionato **5c**. Se la riduzione si protrae per 24h, nel grezzo di reazione si trova solo il composto **5c**. Ciò sta a significare che il chetone **2c** viene completamente consumato dal lievito. Anche in questo caso non avviene la risoluzione dell'alcol **4c** (Schema 2.6).



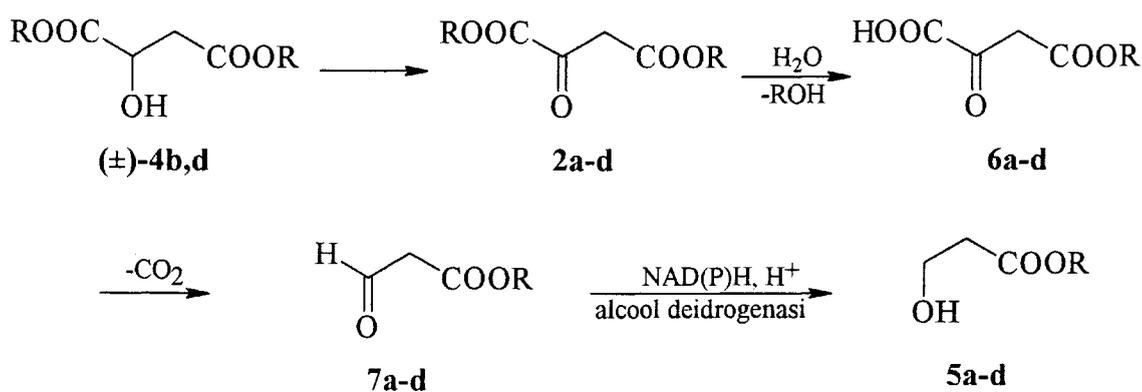
Schema 2.6

Si suppone quindi che, nel caso dei composti **2a** e **2c**, la biotrasformazione avvenga a

livello del chetodiesteri di partenza e non a livello dell'alcol secondario.

E' noto d'altra parte che nel lievito, mediante un processo di fermentazione che si svolge in due stadi, l'acido piruvico viene trasformato anaerobicamente in etanolo ed anidride carbonica. Nella prima reazione, la piruvico-decarbossilasi trasforma l'acido piruvico in acetaldeide, mentre nella seconda reazione l'alcol-deidrogenasi NAD(P)H-dipendente riduce l'acetaldeide ad etanolo.⁸⁰

E' pertanto probabile che, per tutti i chetodiesteri, il lievito catalizzi inizialmente l'idrolisi regioselettiva del gruppo estereo prossimo al carbonile per dare il semiestero **6a-d**, quindi si abbia decarbossilazione con formazione dell'aldeide corrispondente **7a-d** ed infine riduzione dell'aldeide al corrispondente alcol primario **5a-d**. Si può supporre inoltre che, nel caso degli alcoli **4b** e **4d**, si abbia prima una reazione di ossidazione che fornisce i chetodiesteri **2b,d** e quindi la sequenza di reazioni già descritte sopra (Schema 2.7).



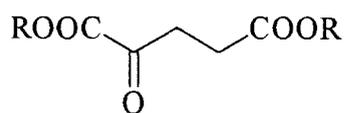
Schema 2.7 - Processo di decomposizione dei chetodiesteri

2.2 RIDUZIONE DEL DIETIL 4-METIL-2-OXOGLUTARATO

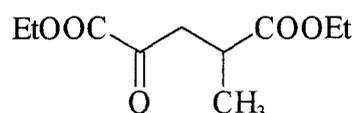
2.2.1 Riduzione chimica

E' stato anche approfondito lo studio riguardante la riduzione con lievito da panettiere di alcuni diesteri dell'acido α -oxoglutarico **8**⁸¹ estendendolo al dietil 4-metil-2-oxoglutarato **9**,⁸² (Schema 2.8) per una maggior comprensione del processo di formazione degli

idrossi derivati.



8



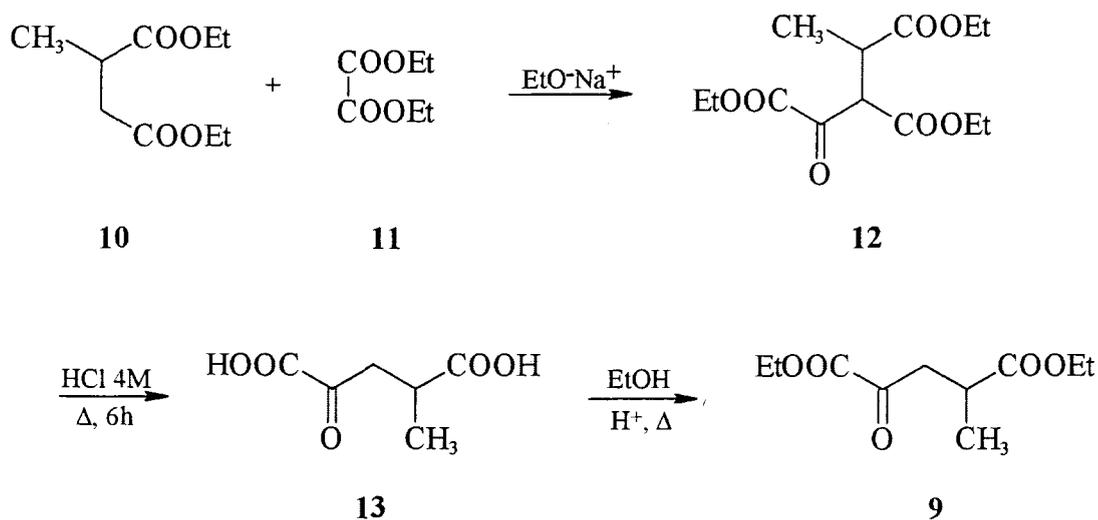
9

R= Me, Et, n-Pr

Schema 2.8

Il composto **9** è stato sintetizzato, in accordo con Blaise e Gault,⁸³ per condensazione tra il dietil 2-metilsuccinato **10** e il dietilossalato **11**, seguita da idrolisi acida e decarbossilazione del triestere **12**.

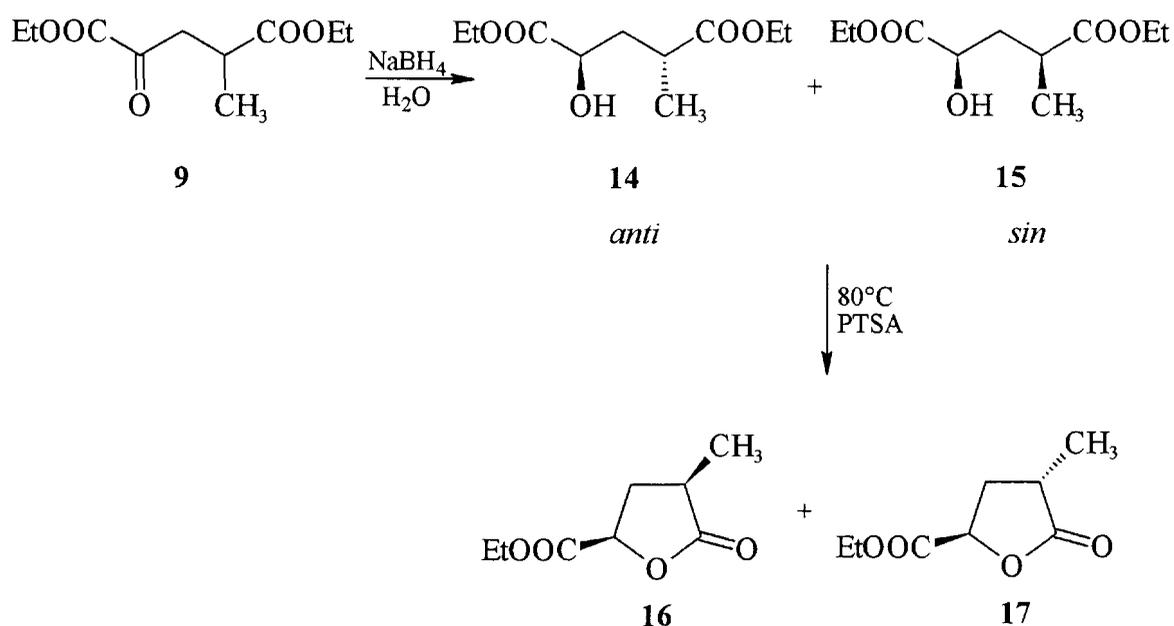
Si è ottenuto l'acido 4-metil-2-oxoglutarico **13**⁸⁴ che è stato successivamente esterificato con EtOH per dare il composto **9** (Schema 2.9).



Schema 2.9 - Sintesi del dietil 4-metil-2-oxoglutarato **9**

Il chetodiester **9** è stato ridotto con sodioboroidruro in acqua ottenendo una miscela di alcoli **14** e **15**, che non sono stati isolati, e dei lattoni **16** e **17** (Schema 2.10). Gli alcoli **14** e **15** non sono distinguibili alla gas cromatografia in quanto escono come un picco unico a 37.7 min (Carbowax, 100 °C per 10 min, 3 °C/min fino a 200 °C per 40 min).

Dall'analisi ^1H NMR del grezzo di riduzione è stato possibile distinguere solo i segnali dei due protoni $-\text{CH}_2-$ a 1.96 ppm (ddd, J_1 6.2, J_2 9.5, J_3 13.9) e a 1.76 ppm (ddd, J_1 4.0, J_2 7.7, J_3 13.9) per l'alcol più abbondante *anti* **14**, che dà il lattone più abbondante *cis* **16**, ed a 2.14 ppm (ddd, J_1 4.0, J_2 9.9, J_3 13.7) e 1.59 (ddd, J_1 4.4, J_2 9.3, J_3 13.7) per l'alcol *sin* **15**. Sempre in base all'analisi ^1H NMR si sono stabilite le seguenti percentuali: **14** (46%), **15** (30%), **16** (16%) e **17** (8%).



Schema 2.10 - Riduzione di **9** con NaBH_4

Si ha la completa lattonzizzazione, se la miscela di reazione viene trattata a caldo in benzene con tracce di acido p-toluensolfonico (PTSA). In tal modo si sono ottenuti quantitativamente i lattoni *cis*-**16** e *trans*-**17** in rapporto 60:40. Essi sono stati separati mediante cromatografia su colonna. La stereochimica del lattone **17** è stata assegnata in base ad esperimenti DIFNOE.

Infatti, come si vede nella Figura 2.1, nel lattone *trans* **17** i protoni indicati con le lettere A (4.9 ppm), B (2.8 ppm), C (2.6 ppm) e D (2.2 ppm) sono perfettamente separati e quindi è stato possibile fare gli esperimenti DIFNOE. Viceversa nel lattone *cis* **16** (Figura 2.2) i protoni B e C (2.7 ppm) sono sovrapposti quindi questo composto non è stato sottoposto ad esperimenti DIFNOE.

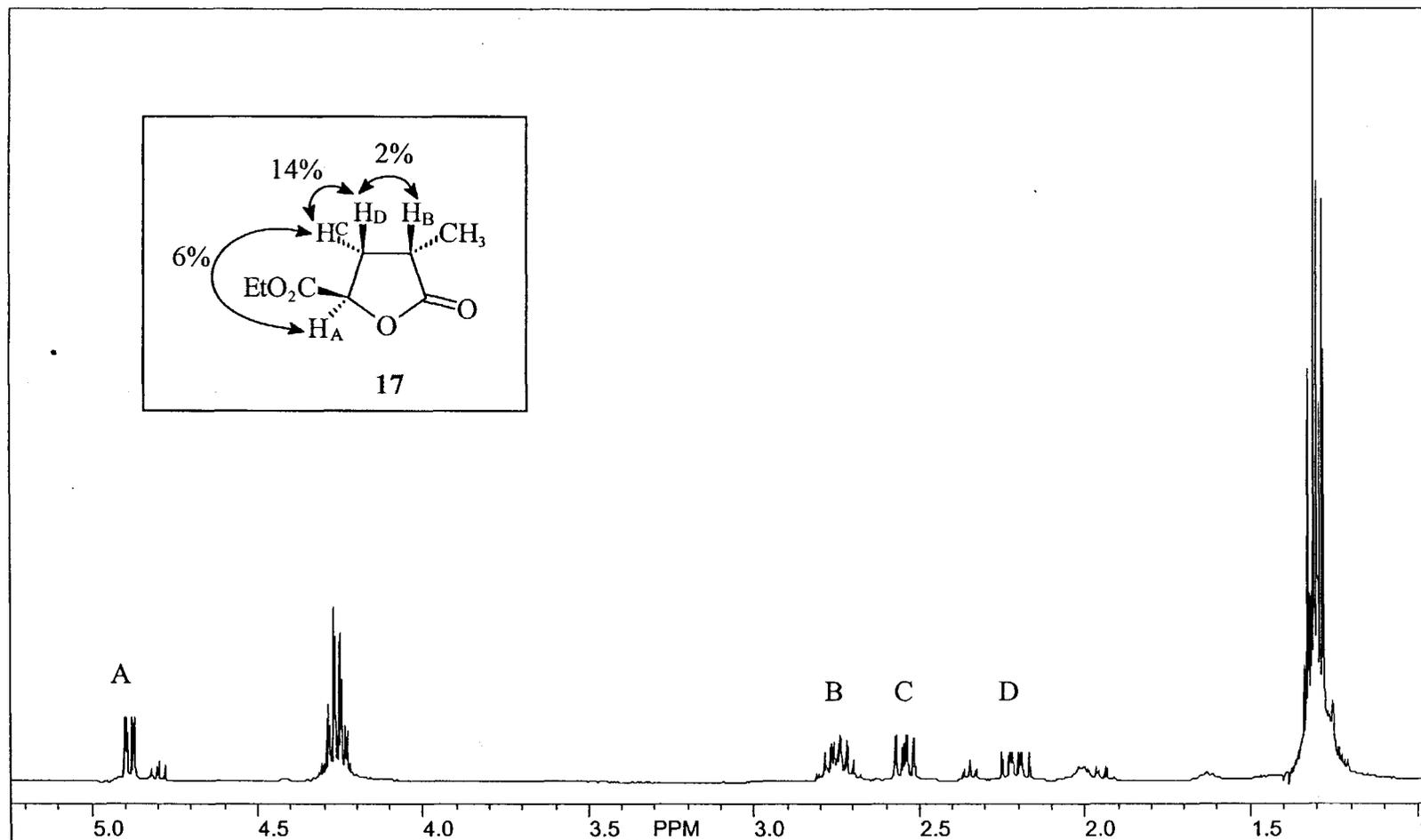


Figura 2.1 – Spettro ^1H NMR a 400MHz del composto 17

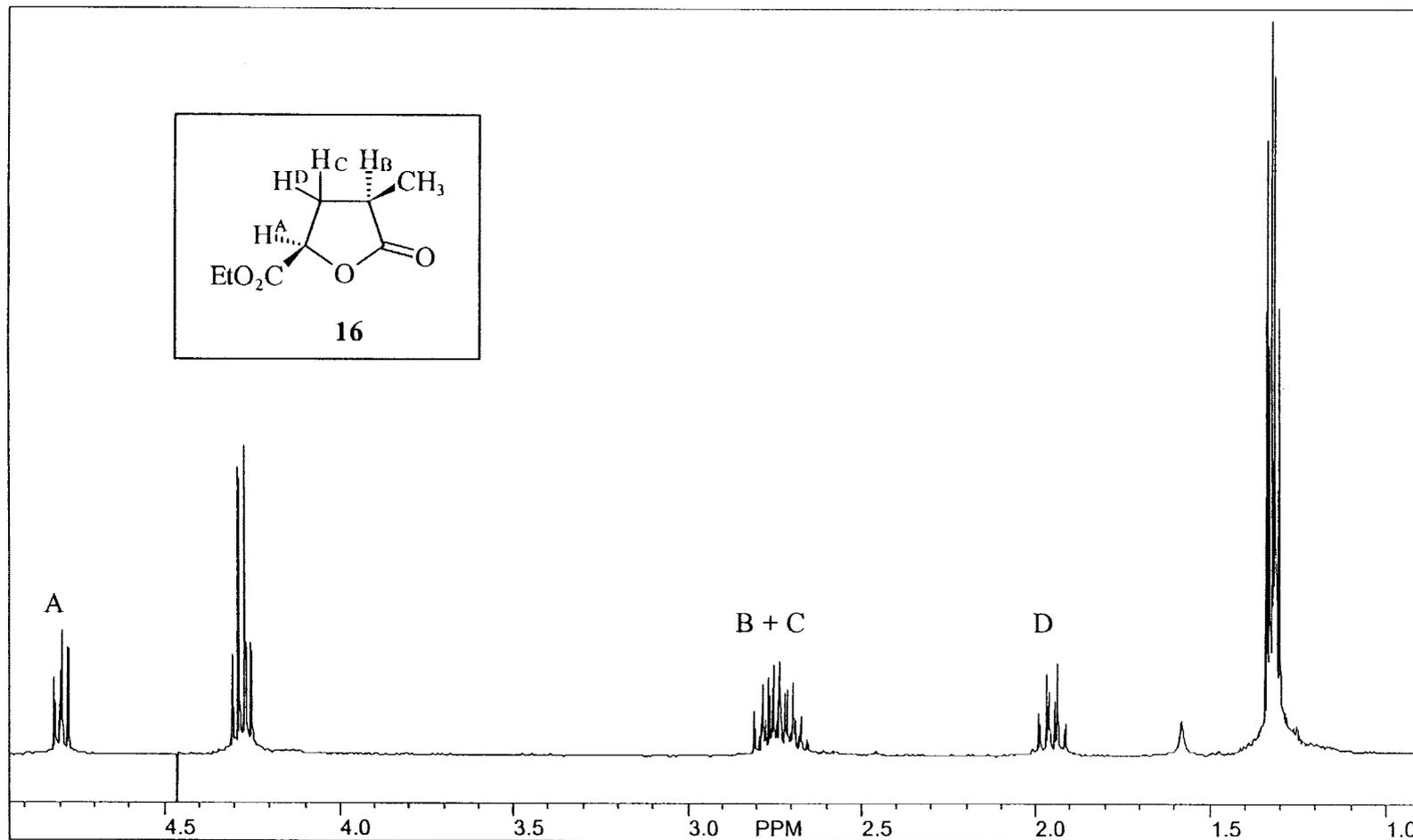
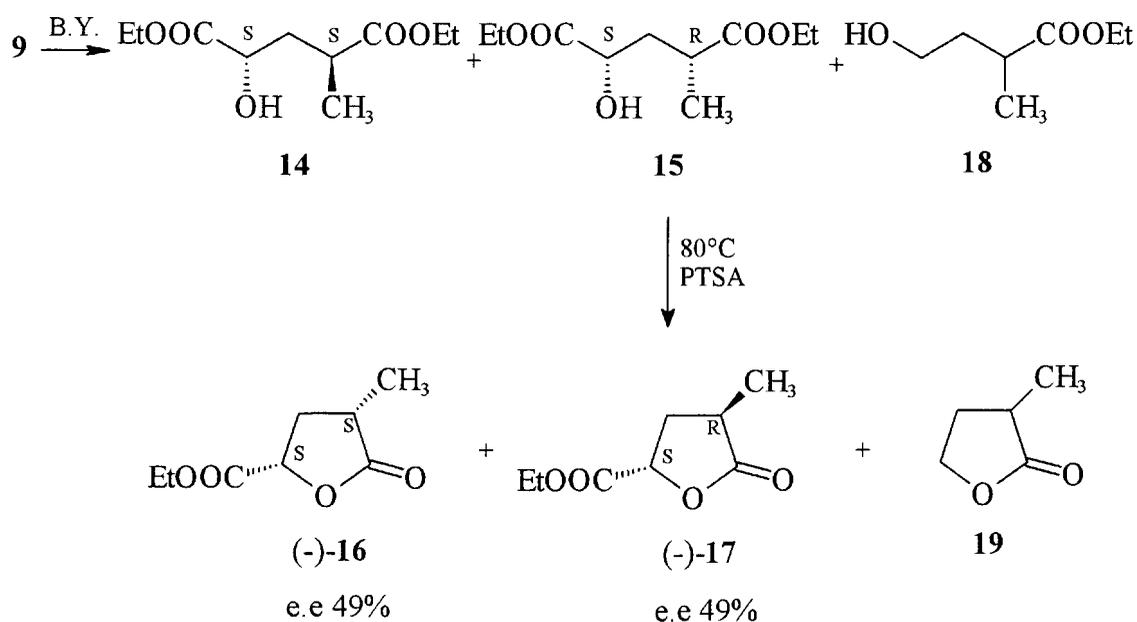


Figura 2.2 – Spettro ¹H NMR a 400MHz del composto 16

I lattoni **16** e **17** sono stati isolati successivamente con lo scopo di operare la loro risoluzione cinetica enzimatica.

2.2.2 Riduzione con lievito da panettiere

Il dietil 4-metil-2-oxoglutarato **9** è stato sottoposto a bioriduzione con lievito da panettiere, seguendo l'andamento della riduzione gascromatograficamente. Dopo 2h si è ottenuta una miscela di alcoli diastereoisomeri **14** e **15** e dell'etil 4-idrossi-2-metil butirrato **18**, essendo circa 1:1 il rapporto tra la miscela di alcoli secondari e l'alcol primario (Schema 2.11).



Schema 2.11 - Riduzione di **9** con lievito da panettiere

La miscela di reazione è stata trattata, anche in questo caso, in benzene con tracce di acido p-toluensolfonico. Si è ottenuta una miscela costituita dai lattoni **16**, **17**, otticamente attivi, e dal 2-metilbutanolide **19**⁸⁵ (Schema 2.11) in rapporto 32:24:44 rispettivamente, rapporto determinato gascromatograficamente.

Entrambi i lattoni **(-)-16** e **(-)-17** presentano un eccesso enantiomerico del 49%, determinato mediante gascromatografia chirale.

Anche in questo caso, come già visto nel paragrafo precedente, l'idrossiestere **18** è

presente in concentrazione rilevante. Si suppone quindi che la biotrasformazione avvenga a livello del chetodiastere di partenza e non al livello dell'alcol secondario. Un'ulteriore conferma è dovuta al fatto che se si protrae la riduzione per diversi giorni, comunque il rapporto tra gli alcoli ed il composto decarbossilato **18** non cambia. E' importante notare che se si cambiano le condizioni della bioriduzione, come ad esempio evitando la preincubazione del lievito, dopo 2h si ottiene esclusivamente il prodotto **18**. E' quindi evidente che la preincubazione disattiva parzialmente il complesso enzimatico che porta all'idrossiestere.

2.3 IDROLISI ENZIMATICA

Il metodo alternativo, studiato per l'ottenimento di γ -lattoni otticamente attivi è la risoluzione enzimatica del lattone racemo, ottenuto per lattonizzazione dell'alcol racemo. Gli enzimi usati come catalizzatori di idrolisi sono stati scelti fra le molte lipasi, idrolasi e peptidasi commercialmente disponibili. Innanzitutto sono state valutate le diverse enantioselettività mostrate dai seguenti enzimi, Porcine Pancreatic lipase (PPL), *Mucor Miehei* lipase (MML), *Pseudomonas Fluorescens* lipase (PFL), *Candida Rugosa* lipase (CRL), Pig Liver Acetone Powder (PLAP), Horse Liver Acetone Powder (HLAP), α -Chimotripsina (α -CT), utilizzando come substrati i lattoni racemi **16** e **17**.

Il risultato delle idrolisi di ciascun composto viene espresso in modo tabellare (Tab. 2.2 e 2.3), elencando la quantità di enzima usato, i tempi di reazione, gli eccessi enantiomerici dell'acido e dell'estere e riportando pure il valore del rapporto enantiomerico, **E**.

mg/mmol). Al 30% di conversione, in soli 10 min, si isola l'acido⁸⁶ destrogiro **16a** con un e.e. del 92%. (Schema 2.12)

Analizzando il grafico dell'e.e. dell'estere rispetto alla conversione (Figura 2.3), teoricamente è possibile idrolizzare l'estere fino al 60% di conversione ed ottenere il substrato con un e.e. del 99%.

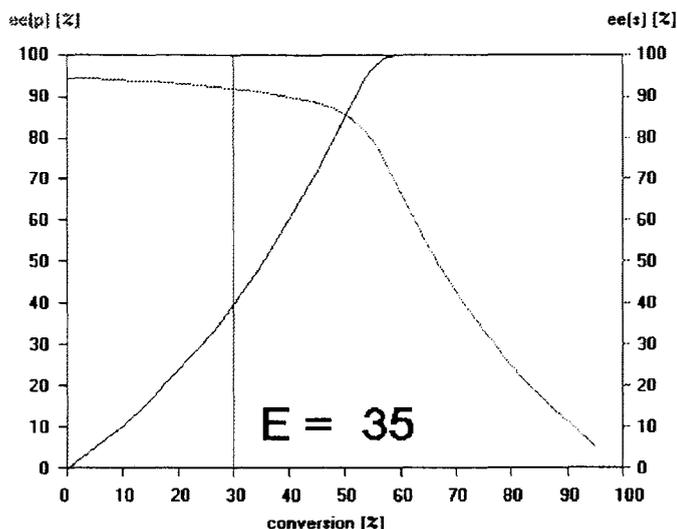


Figura 2.3

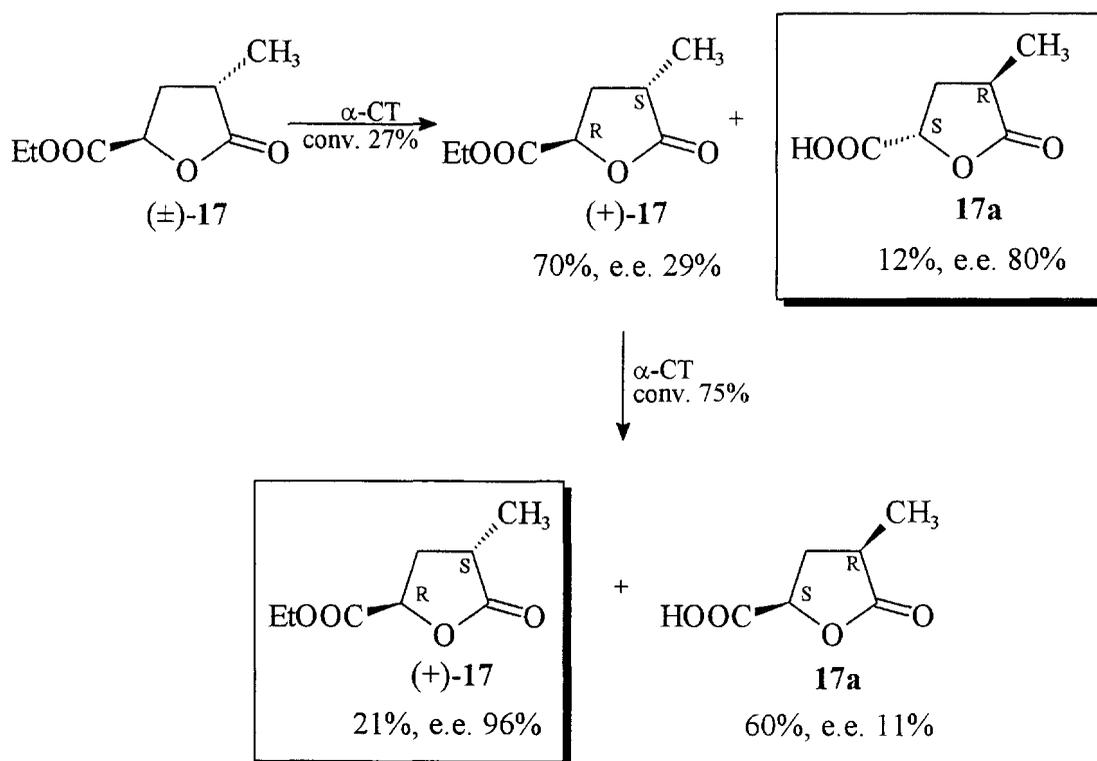
L'estere lattonico (-)-**16**, con un e.e. del 40%, sottoposto nuovamente a risoluzione enzimatica, è stato ottenuto enantiomericamente puro (99%) al 65% di conversione.

Buoni risultati si sono ottenuti anche con l' α -CT (1000U/mmol) ($E=13$) che dà l'acido (+)-**16a** con e.e. dell'82%. Anche l'estere (-)-**16**, ottenuto dall'idrolisi con α -CT, che presentava un e.e. del 34% è stato nuovamente idrolizzato nelle medesime condizioni ottenendo l'estere con un e.e. del 99%.

Le idrolisi con i restanti enzimi portano ad acidi con purezza ottica molto modesta. Nel caso dell'enzima grezzo HLAP si è notato un comportamento diverso dagli altri enzimi (Schema 2.13). Al 20% di conversione si recupera, per estrazione a pH 7.4, l'estere non reagito (+)-**16** con un e.e. del 32%. L'acidificazione delle acque madri (pH 2), seguita da estrazione con etere etilico, ha fornito l'acido (-)-**16a** con un e.e. molto basso (36%), in miscela con l'estere (-)-**16** che presentava un e.e. del 77%. Questo risultato viene interpretato come conseguenza dell'azione di due enzimi diversi: il primo

Tabella 2.3 - Idrolisi enzimatiche del composto 17

Enzima	tempo	conv. (%)	e.e. acido (%)	e.e. estere (%)	E
α -CT (1000U/mmol)	15min	27	80	29	11
CRL (14000U/mmol)	2h	20	0	0	-
PPL (80mg/mmol)	8min	22	69	20	7
HLAP (100mg/mmol)	5min	20	0	0	-
PLAP (100mg/mmol)	5min	20	0	0	-
MML (150mg/mmol)	10min	20	0	0	-
PFL (1300U/mmol)	20min	31	56	25	5

Schema 2.14 - Risoluzione cinetica enzimatica catalizzata dall' α -CT del lattone racemo 17

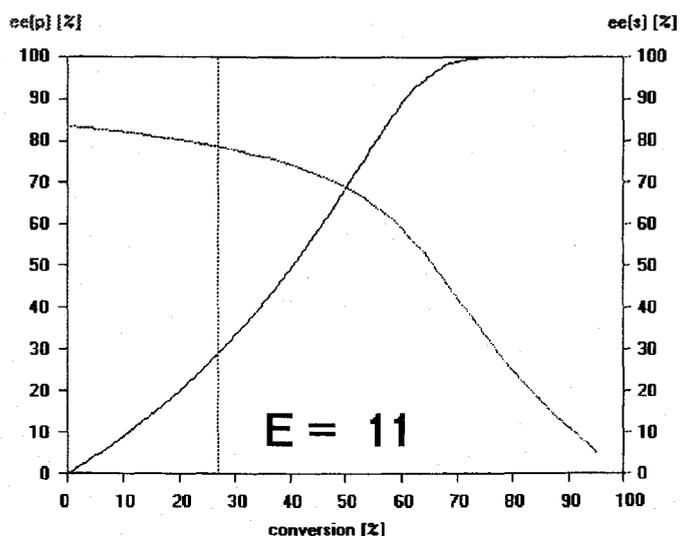


Figura 2.4

Dal diagramma di **E** (Figura 2.4) si verifica quindi che per ottenere l'estere con una elevata purezza ottica è necessario spingere la reazione al 90% di conversione. In questo caso bisogna raggiungere un compromesso tra il valore dell'e.e. e la resa finale della reazione che diminuisce man mano che la purezza ottica aumenta. Per ottenere almeno una resa del 20% si deve limitare l'e.e. di (+)-17 al 96%.

2.3.3 Determinazione della configurazione assoluta

La determinazione della configurazione assoluta di tutti i lattoni è stata effettuata tramite la spettroscopia di Dicroismo Circolare. Si è applicata la regola di Okuda^{70e} per i γ -lattoni.

È stato dimostrato che la regola di Okuda mantiene validità anche per γ -lattoni sostituiti in γ con diversi gruppi alchilici e anche per γ -lattoni condensati con anelli carbociclici.⁸⁷ In questo caso vi è un sostituente in γ , l'etossicarbonile, che è esso stesso un cromoforo. Si è pensato quindi di verificare l'effetto di tale gruppo sulla curva CD. L'etil 5-oxo-2-tetraidrofuranocarbossilato S-(+)-21 (e.e. 98%)⁸¹ mostra effetto Cotton positivo a 213 nm (Figura 2.5). Quindi lo stereocentro C-2 contribuisce positivamente all'effetto Cotton.

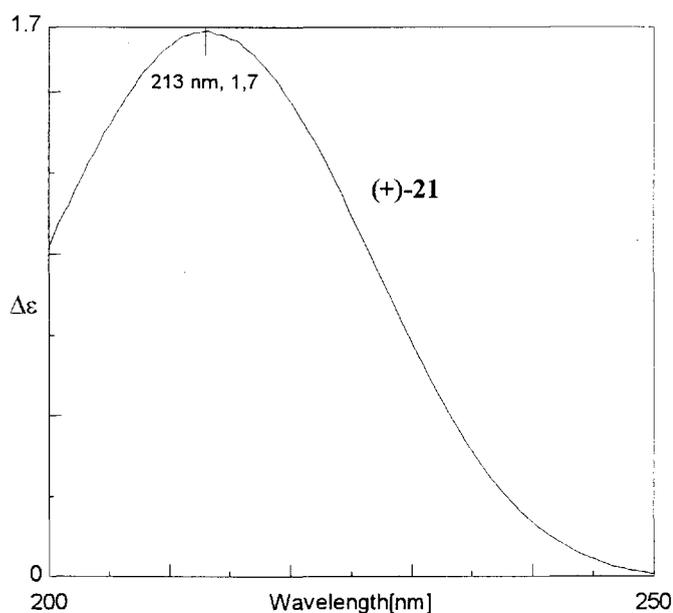
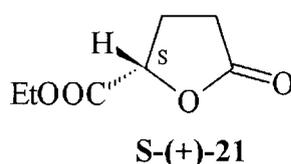


Figura 2.5 - Curva CD del lattone estereo S-(+)-21

Il butanolide (-)-16 (Figura 2.6) che oltre al gruppo etossicarbonile in γ ha anche un metile in α , in configurazione *cis* mostra una banda con effetto Cotton positivo a 215 nm. Evidentemente $-\text{CH}_3$ è sopra il piano medio della molecola, quando questa è orientata come prescritto da Okuda. Quindi, sempre secondo la regola di Okuda, il lattone (-)-16 dovrebbe avere configurazione assoluta 2S,4S. L'acido (+)-16a (Figura 2.7) mostra una banda ad effetto Cotton negativo, quindi la configurazione assoluta sarà 2R,4R. Anche in questo caso si può ipotizzare che sia il metile in α , che il cromoforo in γ contribuiscono a rendere negativo il segno dell'effetto Cotton del lattone acido (+)-16a. Il lattone (+)-17 (Figura 2.8) mostra una banda ad effetto Cotton positivo, quindi la configurazione assoluta, secondo la regola di Okuda, dovrebbe essere 2R,4S. In questo caso si ipotizza un contributo positivo dovuto al metile al C- α , però vi è anche un contributo negativo, visibile nella Figura 2.8, dovuto all'etossicarbonile al C- γ . Non è stato possibile isolare l'acido 17a sufficientemente puro per eseguire una misura CD.

Dallo studio delle curve CD è stata assegnata anche la configurazione assoluta ai lattoni (-)-16 e (-)-17 ottenuti dalla bioriduzione del chetodiester 9. Il carbonio carbinolico è risultato di configurazione assoluta S in entrambi i lattoni.

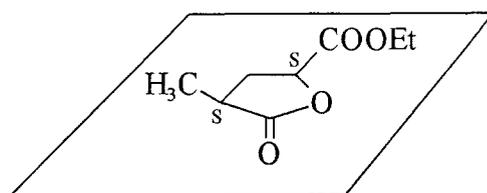
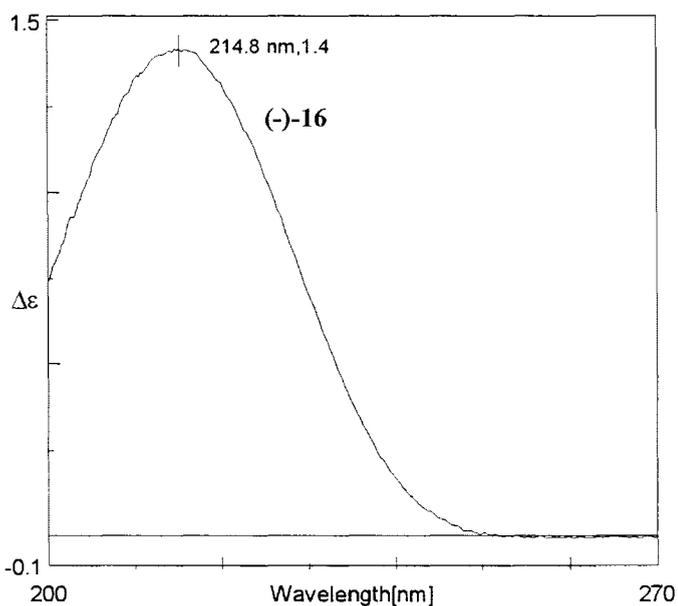


Figura 2.6 - Curva CD del lattone estereo (-)-16

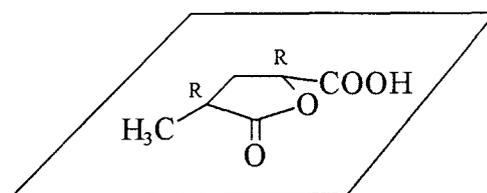
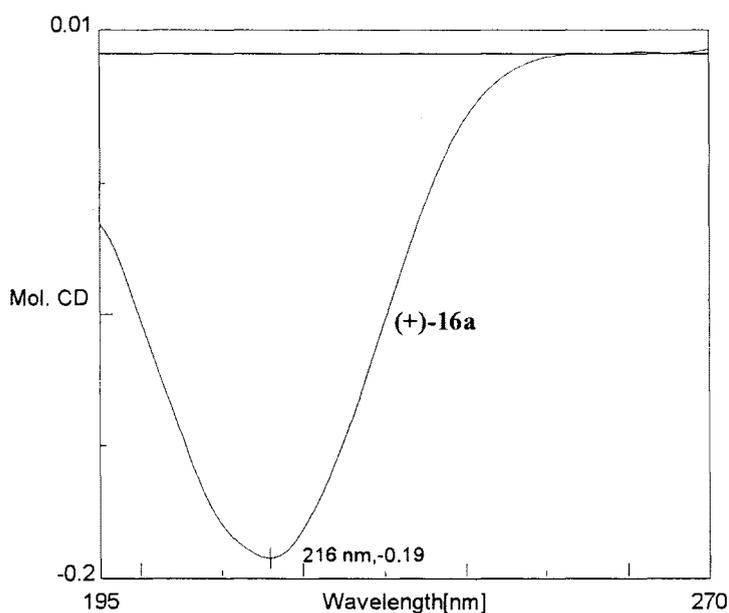


Figura 2.7 - Curva CD del lattone acido (+)-16a

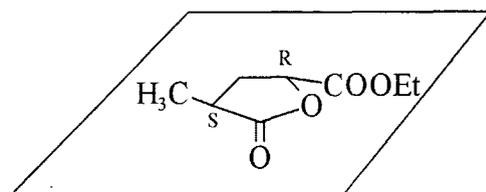
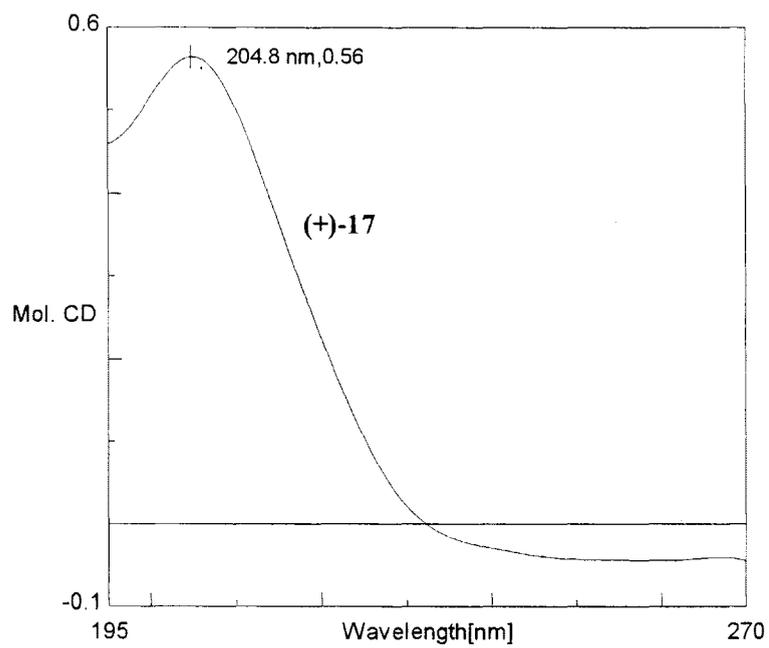
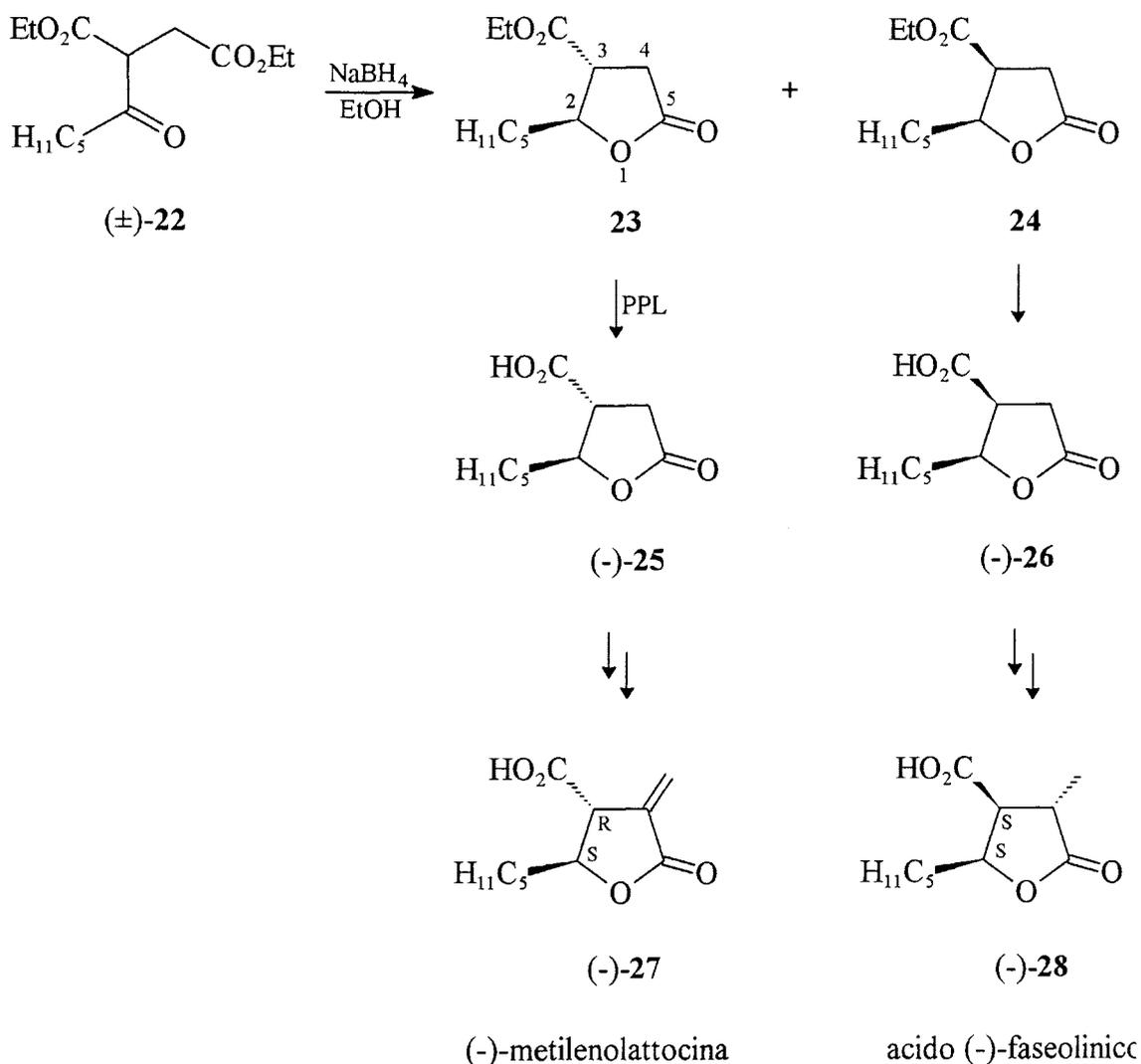


Figura 2.8 - Curva CD del lattone estereo (+)-17

2.4 RISOLUZIONE ENZIMATICA DELL'ETIL *CIS*-5-OXO-2-PENTIL-TETRAIDROFURAN-3-CARBOSSILATO 24

Recentemente nei nostri laboratori ci si è dedicati all'utilizzo del lievito da panettiere per ottenere γ -butirolattoni otticamente puri.^{87b} Il nostro interesse è derivato dal fatto che molti γ -lattoni con importanti attività biologiche sono presenti in natura.^{55b} Si è anche studiata la risoluzione asimmetrica del derivato racemo dell'etil estere dell'acido *trans*-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossilico **23** utilizzando la Porcine Pancreas Lipase (PPL) (Schema 2.15)^{66a} con lo scopo di ottenere il corrispondente acido (-)-**25**, precursore della (-)-metilenolattocina **27**, antibiotico antitumorale.^{66b,d,e}

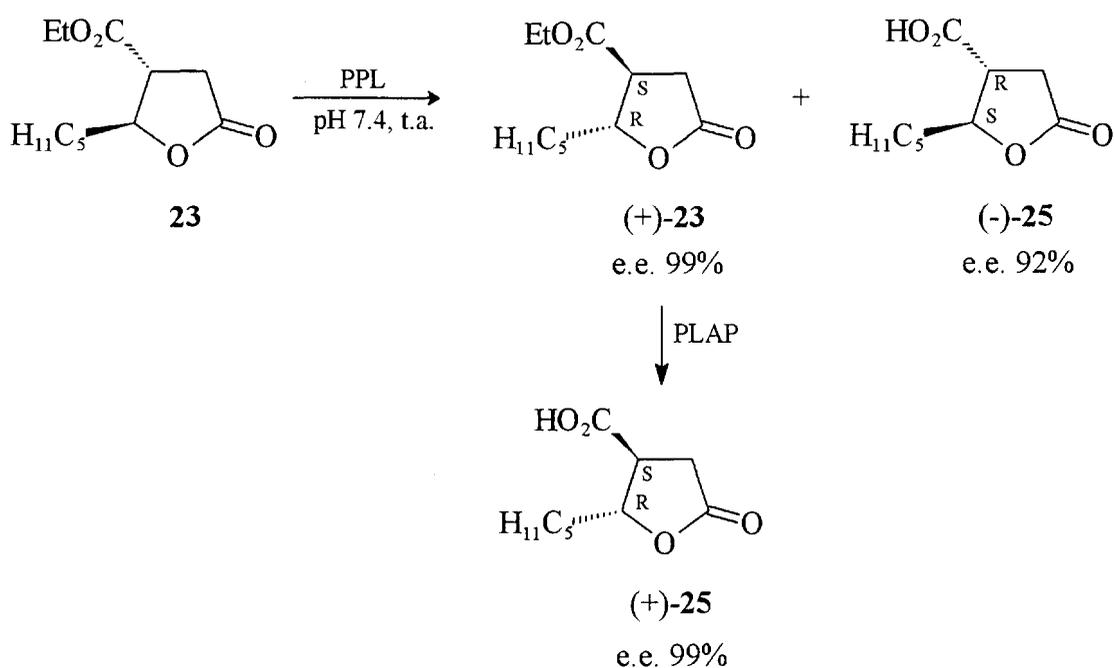


Schema 2.15 - Sintesi dei lattoni diastereoisomeri racemi **23** e **24**

Poiché nella sintesi del lattone *trans* racemo **23** (Schema 2.15) si forma anche il lattone diastereoisomero *cis* **24**, si è operato anche su questo una risoluzione enzimatica. L'obiettivo era di ottenere l'acido *cis*-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossilico (-)-**26**, precursore di un altro interessante lattone naturale, l'acido (-)-faseolinico **28**,⁸⁸ metabolita del fungo *Macrophomina phaseolina*.

2.4.1 Idrolisi asimmetrica dell'etil (\pm)-*trans*-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossillato **23**

Utilizzando Porcine Pancreatic Lipase (PPL) come enzima idrolitico^{66a} è stato possibile ottenere entrambi gli enantiomeri (+)- e (-)-**25** con elevata enantioselettività. Quando l'idrolisi della funzione esterea al C-3 del lattone racemo **23** è stata condotta utilizzando 150 mg/mmol di PPL per 6 h, si isola il lattone levogiro **25** con il 19% di resa e un e.e. del 92% (Schema 2.16). Al contrario, se l'idrolisi viene condotta utilizzando la PPL per 42 h, si recupera l'estere non reagito (+)-**23** con una resa del 29% ed un e.e. del 99%.



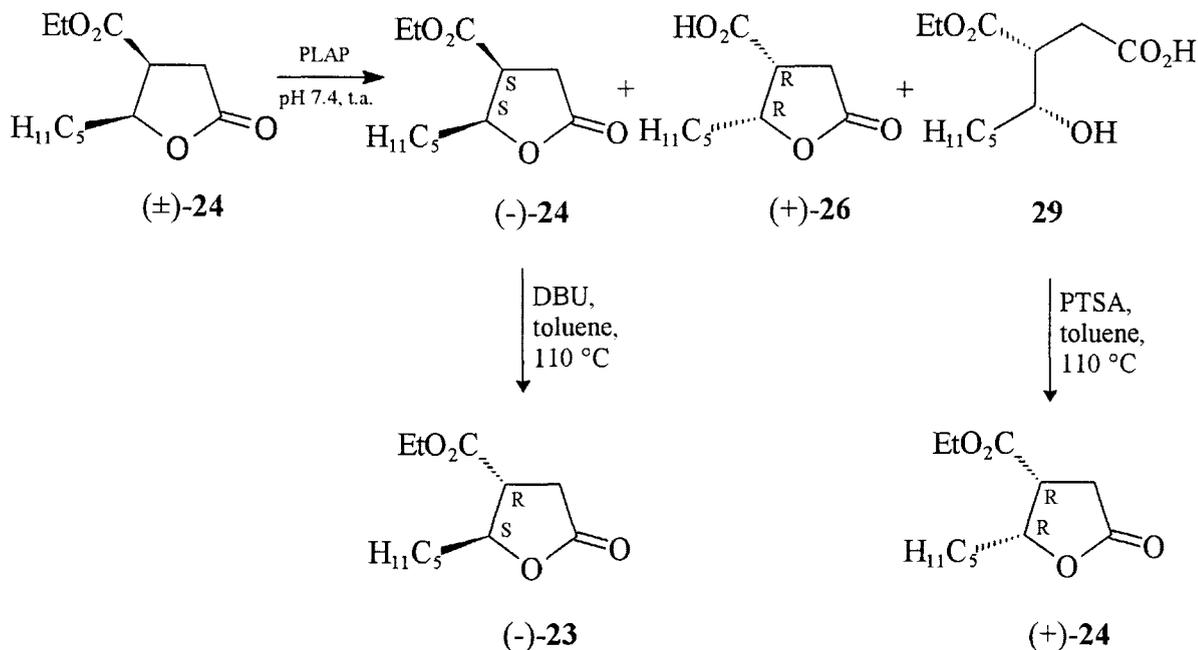
Schema 2.16 - Risoluzione asimmetrica del lattone *trans* **23**

L'estere (+)-**23** è stato idrolizzato nel corrispondente acido (+)-**25** con la stessa purezza ottica (determinata mediante l'uso della gascromatografia su colonna chirale del

derivato etil estereo⁸⁹) utilizzando Porcine Liver Acetone Powder (PLAP). L'idrolisi chimica di (+)-**23** (e.e. 99%) in condizioni acide e basiche dava anche il corrispondente acido (+)-**25** però con un discreto abbassamento della purezza ottica (e.e. 88% e 87% rispettivamente).^{66a} E' da notare che la resa della biotrasformazione in acido isolato è più bassa di quella delle idrolisi chimiche (39% vs 98%).

2.4.2 Idrolisi asimmetrica dell'etil (\pm)-*cis*-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossillato **24**

L'idrolisi asimmetrica del (\pm)-*cis*-butanolide **24** è stata effettuata con PLAP nelle condizioni riportate nella parte sperimentale (Schema 2.17).



Schema 2.17 - Risoluzione asimmetrica del lattone *cis* **24**

Quando l'idrolisi è stata fermata dopo 5 h, si è ottenuto l'estere non reagito (-)-**24** (resa 66%, e.e. 25%). Dopo acidificazione ed estrazione della fase acquosa, è stata isolata una miscela 1:2 del lattone acido (+)-**26** e dell'idrossisemiester **29**. Quest'ultimo composto deriva dall'azione dell'enzima sul gruppo lattonico del sistema (+)-**24**. Benchè individuato tramite spettroscopia NMR, non è stato possibile isolare il composto **29** a causa della sua forte tendenza alla lattonizzazione. Perciò la miscela di (+)-**26** e **29** è

stata reflussata in toluene per alcuni minuti in presenza di tracce di acido *p*-toluensolfonico (PTSA) per indurre la completa ciclizzazione di **29** nel corrispondente estere (+)-**24**. La miscela 2:1 dell'estere (+)-**24** e dell'acido (+)-**26** è stata separata come descritto nella parte sperimentale. L'estere (+)-**24**, derivato dalla ciclizzazione di **29** è risultato avere un e.e. del 87%, mentre l'e.e. di (+)-**26** era del 48%, al solito determinato tramite gascromatografia chirale del derivato estereo.⁸⁹ Al contrario, quando l'idrolisi è stata condotta fino ad alte conversioni utilizzando la PLAP, si è recuperato l'estere non reagito (-)-**24** con una resa del 14%, dopo purificazione per cromatografia flash, e con un e.e. del 96%. Anche in questo caso si è ottenuta la miscela 1:1 di (+)-**26** e **29** (resa totale 39%). Una volta ottenuto il lattone (+)-**24** per trattamento acido, questi è stato separato da (+)-**26** con un trattamento con NaHCO₃ acquoso. La resa di (+)-**24** era del 14% con e.e. del 46% e quella di (+)-**26** ancora del 14% con e.e. 22%.

La configurazione assoluta dell'isomero *cis* (-)-**24** è stata determinata per conversione nell'isomero *trans* (-)-**23**, di cui è nota la configurazione assoluta.^{66d} La conversione è stata condotta reflussando (-)-**24** in toluene per alcuni minuti in presenza di DBU in rapporto equimolare (Schema 2.17). Poichè l'equilibratura di (-)-**24** avviene con inversione di configurazione al C-3 e la configurazione assoluta di (-)-**23** è 2S,3R, di conseguenza la configurazione assoluta di (-)-**24** non può che essere 2S,3S. Quindi la configurazione assoluta di (+)-**24** è 2R,3R.

Gli altri enzimi utilizzati per l'idrolisi asimmetrica del derivato lattone racemo **24** hanno dato risultati insoddisfacenti. Infatti la PLE (500 u/mmol) ha fornito l'acido (+)-**26** con una resa pari al 19% ed un e.e. del 19%. In questo caso non si è osservata apertura dell'anello lattone, contrariamente a quanto osservato usando la PLAP. PPL e PFL (*Pseudomonas Fluorescens* Lipase) non hanno mostrato alcuna attività e il *Lipozyme*^R ha idrolizzato senza alcuna selettività. Anche la HLAP (Horse Liver Acetone Powder) e la CRL (*Candida Rugosa* Lipase) hanno portato ai lattoni acidi, ma con basse rese e bassi eccessi enantiomerici.

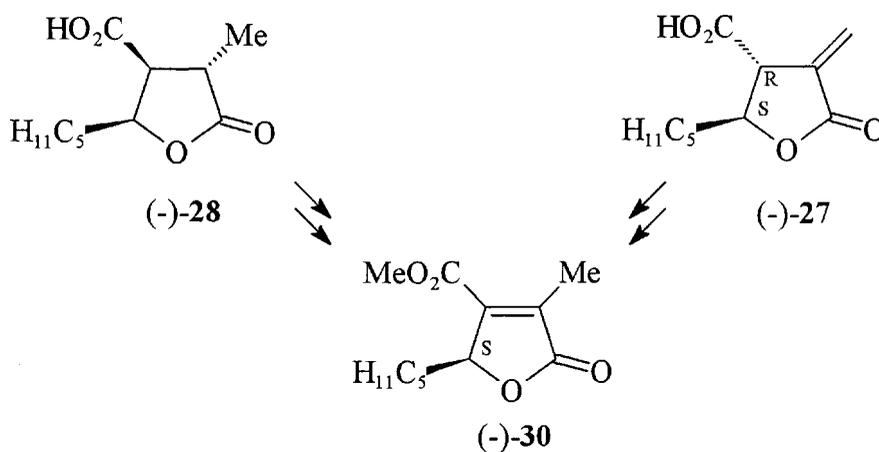
Per poter operare la metilazione stereocontrollata secondo Grieco,⁹³ era necessario idrolizzare i lattoni esterei (-)-**24** e (+)-**24** ai corrispondenti acidi (-)-**26** e (+)-**26**. L'idrolisi chimica però ha comportato una notevole perdita di purezza ottica e d'altra

parte l'acido (+)-**26**, isolato dalla risoluzione enzimatica, era ottenuto in quantità modeste.

Si è preferito allora sintetizzare l'acido faseolinico (-)-**28** otticamente attivo con un'altra procedura.

2.5 SINTESI DELL'ACIDO (+)- E (-)-FASEOLINICO E REVISIONE DELLA CONFIGURAZIONE ASSOLUTA DEL PRODOTTO NATURALE

Come già detto, recentemente ha destato notevole interesse l'acido (-)-faseolinico **28**,⁸⁸ metabolita del fungo *Macrophomina phaseolina* (Schema 2.18), e al riguardo sono state pubblicate due sintesi totali di questo composto.⁹⁰ Si è assunto come obiettivo del lavoro la sintesi di entrambi gli enantiomeri dell'acido faseolinico **28** e la determinazione della configurazione assoluta dell'enantiomero naturale levogiro per mezzo di correlazioni chimiche e spettroscopiche. In letteratura la configurazione assoluta è stata riportata essere 2R,3R,4R.^{88,90a,b} Si è pensato di correlare l'acido (-)-faseolinico **28** con la (-)-metilenolattocina **27** attraverso il comune butenolide (-)-**30** (Schema 2.18).

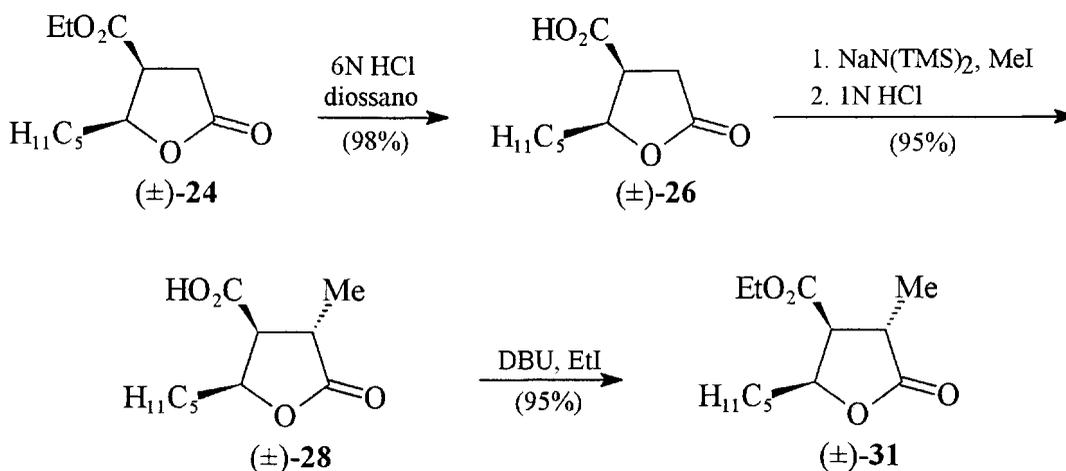


Schema 2.18

Come si può notare nello Schema 2.15 del paragrafo precedente, la (-)-metilenolattocina **27** e l'acido (-)-faseolinico **28** si possono preparare a partire dai due lattoni diastereoisomeri (-)-**25** e (-)-**26** rispettivamente. Questi ultimi si ottengono dal chetodiester **22**,⁹¹ come già proposto⁹² da F. Johnson e coll. per la sintesi dell'acido protolichesterinico racemo. Se la riduzione del composto **22** viene condotta a -15 °C, il rapporto diastereoisomerico **23**:**24** è risultato 1:4 in favore dell'isomero meno stabile **24**.

Gli enantiomeri dell'acido faseolinico sono stati sintetizzati come descritto nello Schema 2.19.

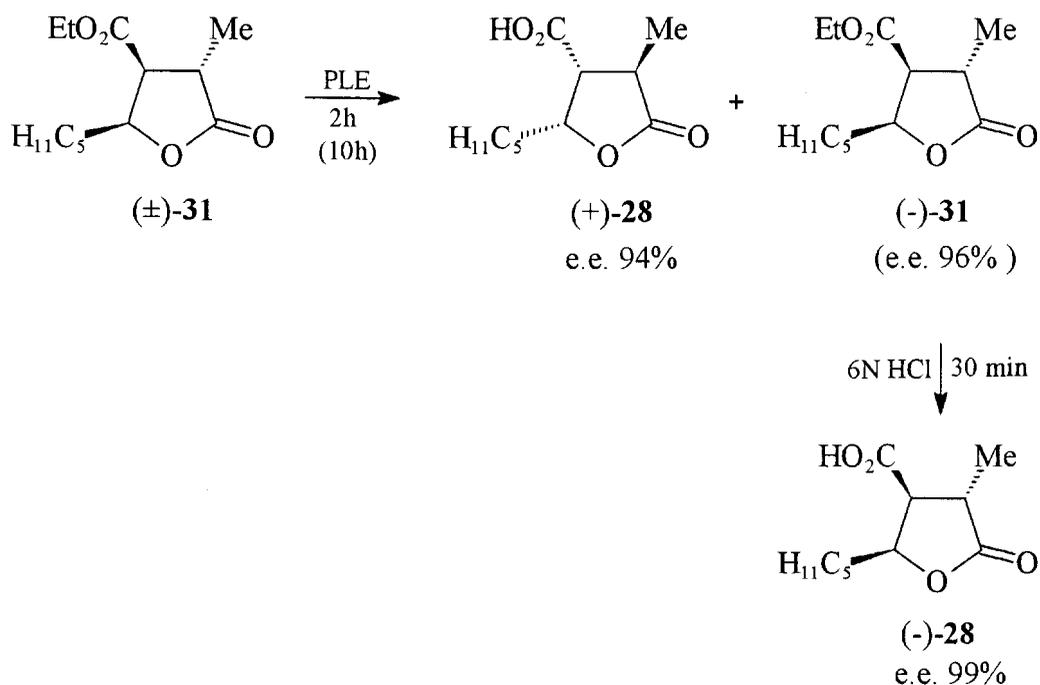
Il gruppo etossicarbonilico del lattone *cis* **24** racemo è stato idrolizzato chimicamente per dare il lattone acido **26** che è stato successivamente trasformato nell'acido faseolinico racemo **28** per α metilazione stereocontrollata secondo Grieco e Miyashita,⁹³ utilizzando però come base $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$ invece dell'LDA, e un largo eccesso di metil ioduro per incrementare le resa. L'acido faseolinico **28** così ottenuto è stato poi esterificato con etil ioduro in presenza di DBU, a temperatura ambiente,⁸⁹ portando al butanolide **31**. Va ricordato che la metilazione stereocontrollata decorre solo in presenza del gruppo carbossilico e non del raggruppamento estereo. Da ciò si è resa necessaria l'idrolisi chimica, operata nel primo stadio.



Schema 2.19 - Sintesi del lattone **31** racemo

Il lattone racemo **31** è stato risolto enzimaticamente utilizzando la PLE a temperatura ambiente. Dopo 2 ore, per una conversione del 20%, è stato ottenuto l'acido faseolinico (+)-**28** con una resa del 15% e con un e.e. del 94%, determinato al solito tramite gascromatografia su colonna chirale del corrispondente estere metilico o etilico, mentre l'estere non reagito (-)-**31** (59%) è stato recuperato con un e.e. del 32% (Schema 2.20).

Quando si prolunga il tempo di reazione (alta conversione, 10 ore) si ottiene l'estere non reagito (-)-**31** con una resa pari al 35% ma con un e.e. del 96%, mentre l'acido (+)-**28** che si isola con una resa del 35% presenta un e.e. del 47%.



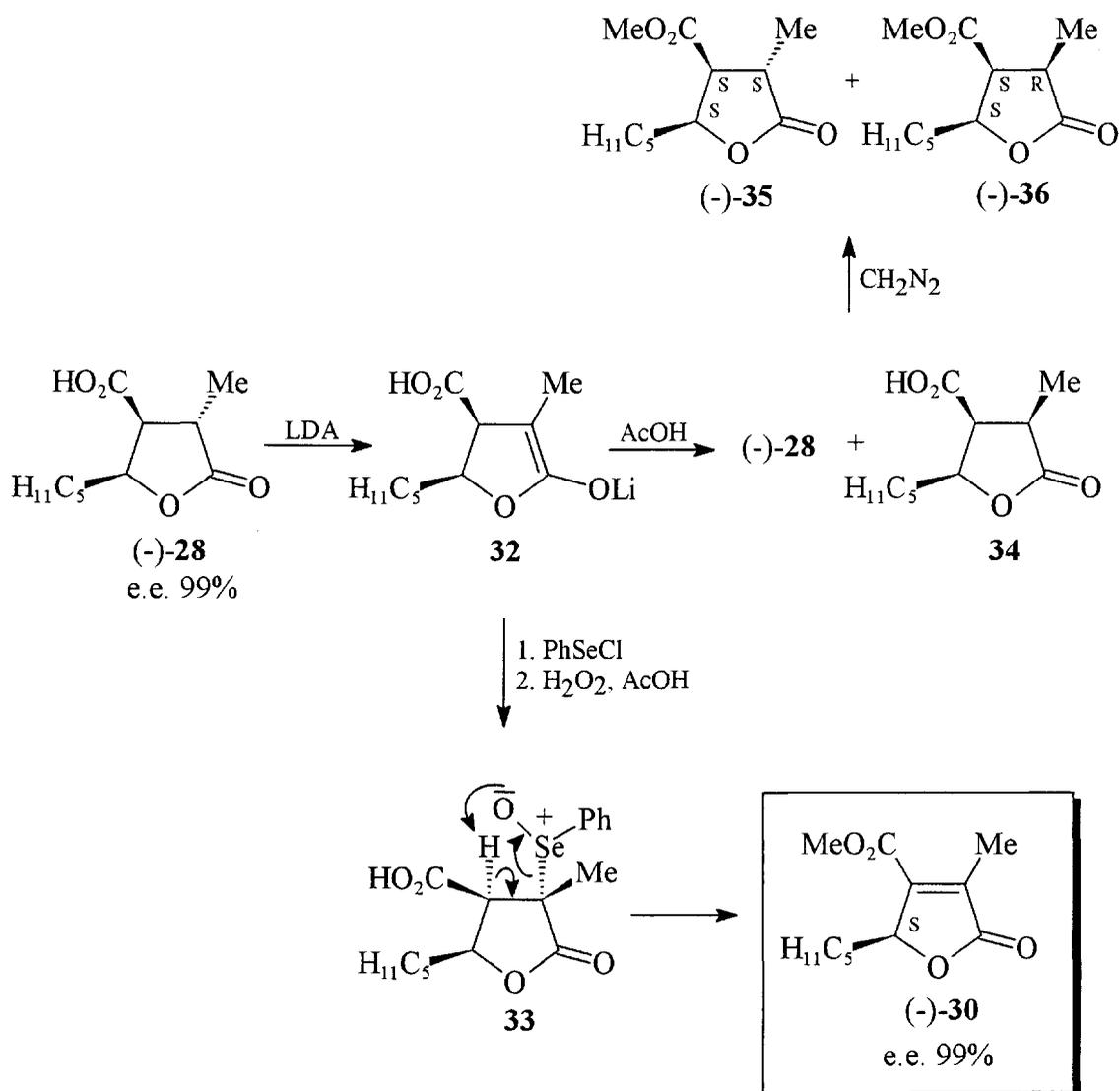
Schema 2.20 - Risoluzione cinetica enzimatica del composto (±)-**31**

L'idrolisi di (-)-**31**, condotta in diossano a refluxo con catalisi acida per 30 min, ha portato all'acido faseolinico (-)-**28** con e.e. del 99%, dopo cristallizzazione.

In questo modo, è stato possibile ottenere entrambi gli enantiomeri dell'acido faseolinico **28** con soddisfacente resa ed eccellente purezza ottica.

Altri enzimi come la CRL (*Candida Rugosa* lipase) e la PPL (Porcine pancreatic lipase) si sono dimostrati inefficaci, mentre la PLAP (Porcine liver acetone powder) ha dato l'acido (+)-**28** con una resa del 10 % ed un e.e. del 88% (al 25% di conversione) e l'estere (-)-**31** con una resa del 25% e un e.e. del 97% (75% di conversione).

Per determinare la configurazione assoluta della molecola naturale, l'acido (-)-faseolinico **28**, ottenuto con e.e. del 99%, è stato trasformato nel butenolide corrispondente (-)-**30** (Schema 2.21).



Schema 2.21

La sequenza delle reazioni comprende innanzitutto l' α -fenilselenilazione in presenza di LDA, come base, con aggiunta di HMPA, successiva ossidazione e *syn* eliminazione dell'acido fenilselenoico dall'intermedio, in accordo con la procedura di Grieco e Miyashita.⁹³ La resa della reazione è soddisfacente, ma comunque non quantitativa, solo se il cloruro di fenilselenio viene usato in largo eccesso. Poiché la reazione non va a completezza, la miscela grezza è stata trattata con diazometano per esterificare i gruppi carbossilici presenti, in modo da poter separare i prodotti mediante cromatografia su colonna. Infatti assieme con il butanolide (-)-30, che ha il 99% di e.e., erano presenti l'estere metilico dell'acido faseolinico non reagito (-)-35 e il lattone *tutto-cis* (-)-36

(Schema 2.21). I tre lattoni (-)-30, (-)-35 e (-)-36 erano in rapporto 75:15:10.

La geometria di (-)-35 è stata determinata in base ad esperimenti DIFNOE (Figura 2.9). Irradiando il protone H-2 a 4.65 ppm si ha un innalzamento pari al 10% del protone H-3, mentre irradiando il doppietto del metile a 1.30 ppm si osserva innalzamento dei segnali relativi ai protoni H-2, H-3 e H-4 pari al 2%, 3% e 4% rispettivamente. Evidentemente H-2, H-3 e il CH₃ al C-4 sono *cis* tra loro. Anche la geometria di (-)-36 è stata determinata con esperimenti DIFNOE. Irradiando il protone H-2 a 4.34 ppm si ha innalzamento del doppio doppietto di H-3 (6%) e del doppio quartetto di H-4 (4%), mentre irradiando il protone H-3 a 3.25 ppm si ha innalzamento dei segnali relativi ai protoni H-2 e H-4 pari al 6% e 3% rispettivamente. Infine irradiando il protone H-4 a 2.83 ppm si è osservato un innalzamento dei segnali relativi ad H-2 e H-3 pari al 3% e 4% rispettivamente.

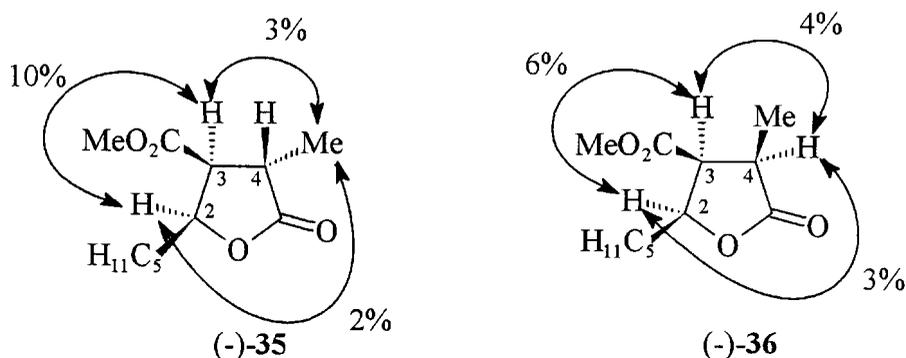


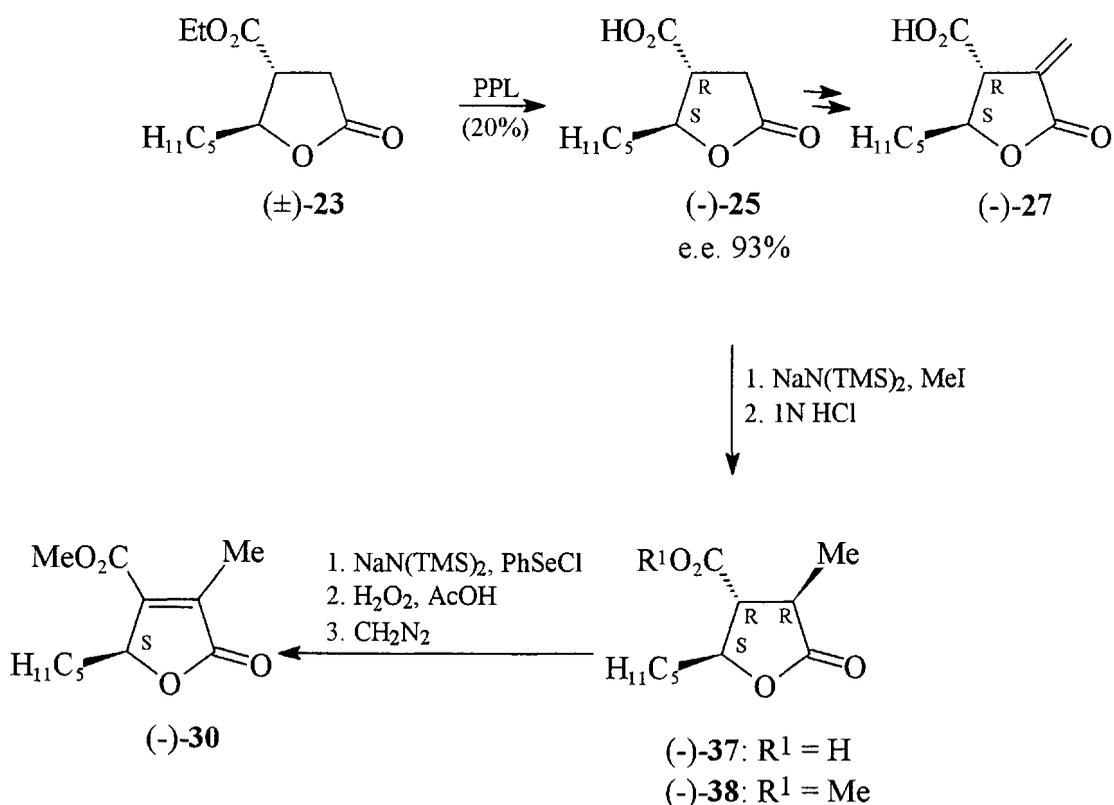
Figura 2.9 - Esperimenti DIFNOE sui composti (-)-35 e (-)-36

La formazione dei lattoni (-)-35 e (-)-36 è dovuta al fatto che la fenilselenilazione dell'enolato dell'acido faseolinico non è completa. Di conseguenza il successivo trattamento acido porta all'acido faseolinico stesso e al diastereoisomero, per protonazione non diastereoselettiva dell'enolato.

Lo stesso butenolide (-)-30 si ottiene partendo dal lattone (-)-25 (Schema 2.22) la cui configurazione è nota^{66a,d} essere 2S,3R, in quanto diretto precursore della (-)-metilenolattocina 27.

Il lattone acido (-)-25,^{66a} con un e.e del 93%, è stato α -metilato nelle condizioni stereocontrollate di Grieco usando come base la sodio bis trimetilsililamide.⁹³ Il risultante

lattone (-)-**37**, ottenuto con resa dell'88% viene trasformato nel butenolide (-)-**30** attraverso la stessa sequenza di reazioni già riportate per la conversione di (-)-**28** in (-)-**30** (Schema 2.21). Il butenolide (-)-**30** è stato isolato con una resa del 18% e un e.e. del 94%, dopo separazione cromatografica dall'estere metilico del lattone non reagito (-)-**38** (resa 35%, e.e. 93%). La geometria di (-)-**38** è stata stabilita attraverso esperimenti di DIFNOE (Figura 2.10). Irradiando il protone H-2 si è osservato un innalzamento pari al 4% del doppio quartetto di H-4, mentre l'irradiamento di H-3 a 2.64 ppm ha portato ad un innalzamento pari al 4% del doppietto del metile a 1.31 ppm.



Schema 2.22 - Formazione del butenolide (-)-**30** a partire dall'acido (-)-**25**

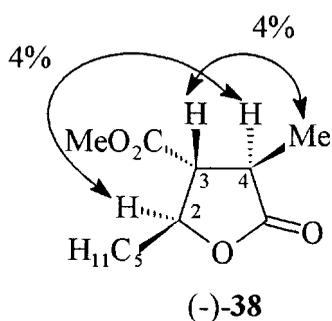
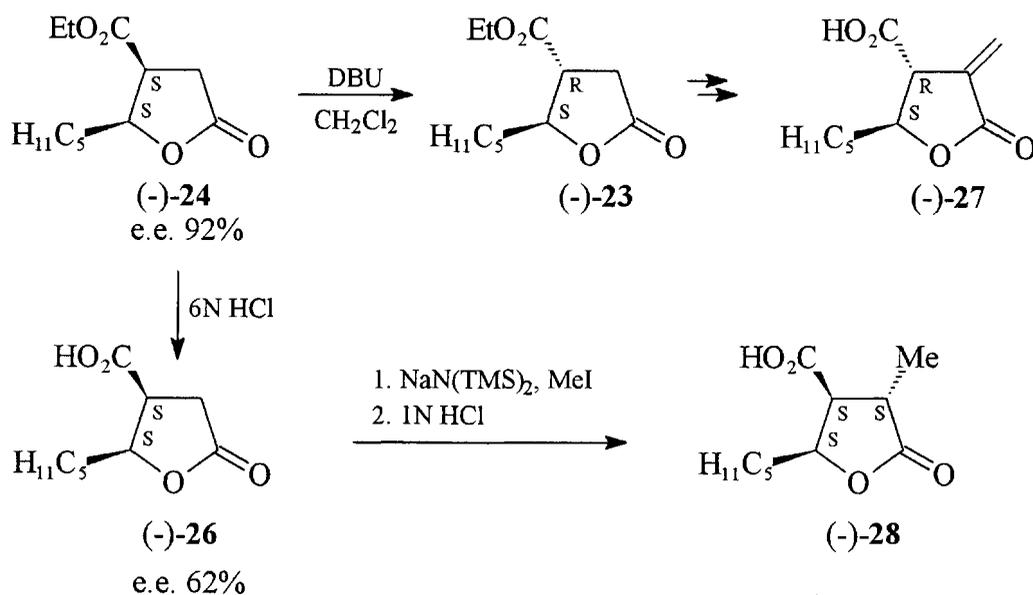


Figura 2.10 - Esperimento DIFNOE sul composto (-)-38

Il butenolide (-)-30, derivato dal lattone (-)-25, è lo stesso enantiomero ottenuto dall'acido faseolinico (-)-28. Poiché il C-2 di (-)-30 non è stato coinvolto in alcuna delle reazioni sopra menzionate, è ragionevole assegnare la stessa configurazione S al C-2 sia dell'acido faseolinico (-)-28, che della (-)-metilenolattocina (-)-27.

Sono stati fatti ulteriori esperimenti per confermare la configurazione assoluta (-)-28, come indicato nello Schema 2.23



Schema 2.23

Il lattone estereo (-)-24 ottenuto con e.e. del 92%⁹⁴ per risoluzione enzimatica con PLAP, come detto precedentemente, è stato isomerizzato nel composto (-)-23 per trattamento con DBU in diclorometano a refluxo. Poiché è impossibile che l'inversione

di configurazione avvenga al C-2 e tenendo conto del fatto che il lattone (-)-**23** è l'estere etilico del lattone acido (-)-**25**, diretto precursore della (-)-metilenolattocina **27** (Schema 2.23), la configurazione del C-2 in (-)-**23** e quindi in (-)-**24** deve essere S.

L'idrolisi chimica del gruppo etossicarbonilico nel composto (-)-**24** a dare il corrispondente lattone acido (-)-**26** è avvenuta con diminuzione drastica della purezza ottica (62%). La successiva α -metilazione del lattone (-)-**26** con metilioduro in eccesso e come base sodio bis trimetilsililamide $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$, ha fornito l'acido faseolinico (-)-**28**, con un e.e. del 63% (Schema 2.23).

Resta quindi confermato che la configurazione del C-2 deve essere la stessa sia nell'acido faseolinico (-)-**28** che nella metilenolattocina (-)-**27**.

Un'ulteriore conferma a questa conclusione è stata portata dall'analisi degli spettri di dicroismo circolare sia dell'acido faseolinico (-)-**28** come del butenolide (-)-**30**.

L'acido faseolinico (-)-**28** mostra un effetto Cotton positivo ($\Delta\epsilon_{216} = +2.2$, diossano, lett.: $^{88} \Delta\epsilon = +1.76$) dovuto alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ (Figura 2.11).

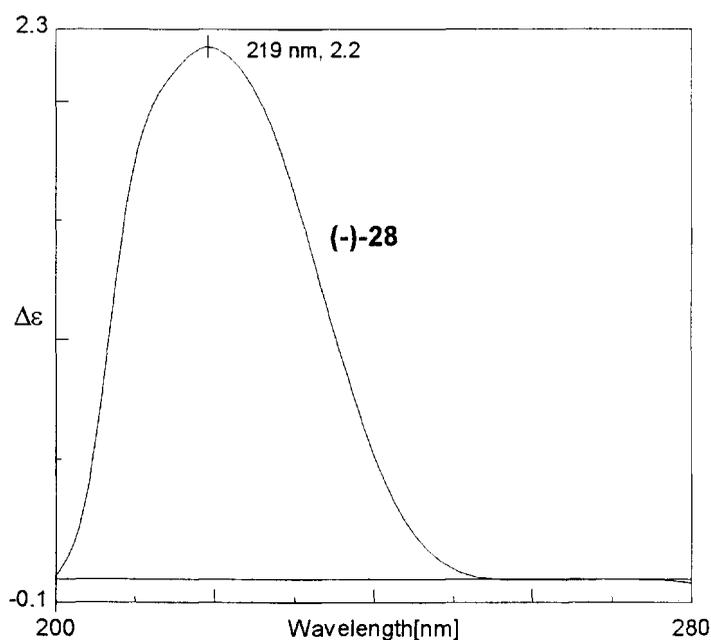


Figura 2.11 - Curva CD dell'acido (-)-faseolinico **28**

E' interessante notare che l'acido pertusarinico (-)-**39**⁹⁵ (Figura 2.12), che possiede la stessa configurazione 2S,3S,4S, ma differente catena alifatica al C-2, mostra una curva

ad effetto Cotton positivo a 221 nm ($\Delta\epsilon_{221} = + 1.38$, CH_3CN).

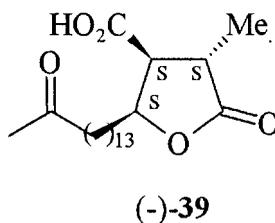


Figura 2.12 - Acido pertusarinico (-)-39

Il butenolide (-)-30 mostra uno spettro CD con un picco poco intenso a effetto Cotton negativo a 256 nm ($\Delta\epsilon_{256} = -0.6$) dovuto alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ e una banda a forte effetto Cotton positivo a 229 nm ($\Delta\epsilon_{229} = +2.5$) dovuta alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$. Entrambe le bande sono compatibili con la configurazione S dello stereocentro⁹⁶ (Figura 2.13).

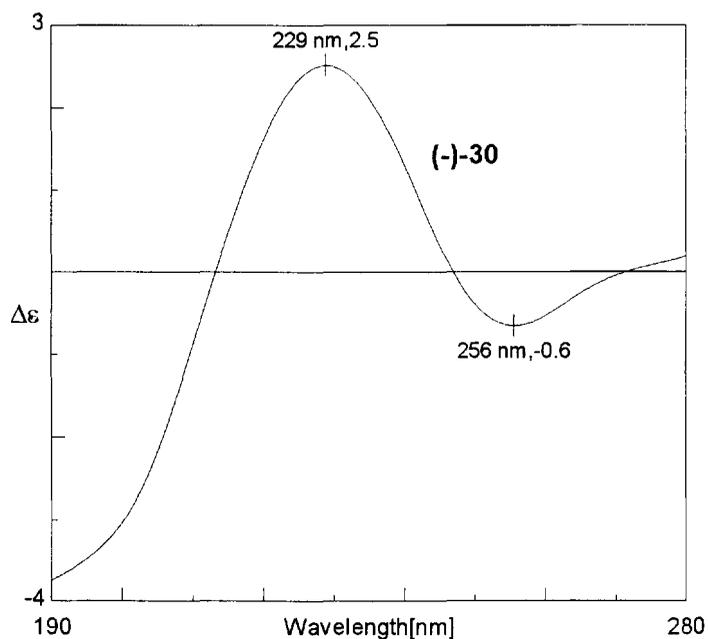


Figura 2.13 - Curva CD del butenolide (-)-30

Infatti questa attribuzione deriva dagli studi iniziati da Uchida^{96a} e ripresi recentemente da Gawronski^{96b} e Kirby^{96c} su una serie di α -butenolidi sostituiti nella

posizione γ . (Figura 2.14).

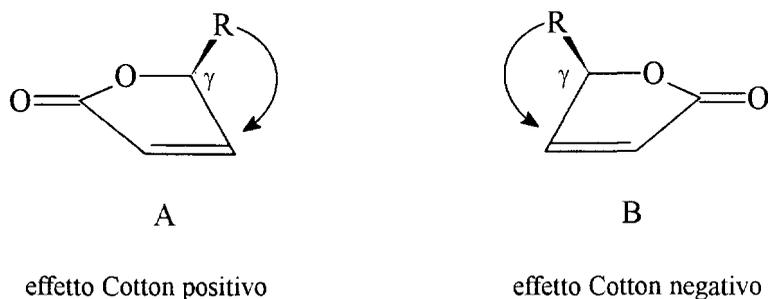


Figura 2.14 - Regola di Gawronski per la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$

Essi hanno trovato che il segno dell'effetto Cotton di entrambe le transizioni è correlabile con la configurazione assoluta del C- γ del γ -lattone α,β -insaturo. Come si può vedere nello Figura 2.14, un'ellitticità destra (caso A) del sistema R-C(γ)-C=C comporta un effetto Cotton positivo per la banda dovuta alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, mentre un'ellitticità sinistra (caso B) comporta un effetto Cotton negativo.

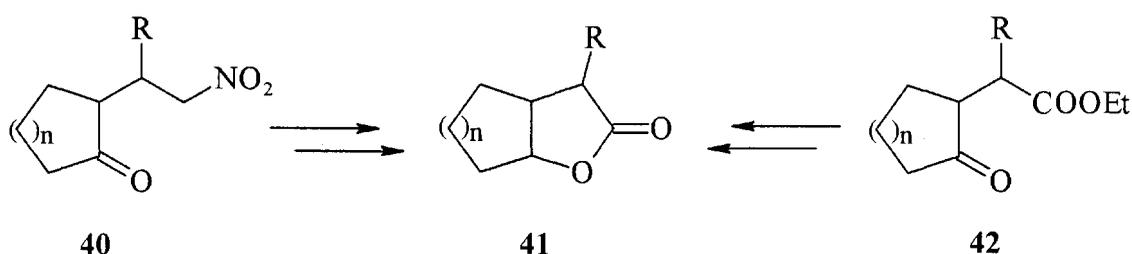
La prima situazione è riferibile alla configurazione S dello stereocentro, la seconda alla configurazione R. Dato che (-)-**30** ha effetto Cotton positivo per la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, la sua configurazione è S.

Dall'insieme dei risultati esposti si può quindi trarre la conclusione che la configurazione assoluta dell'acido faseolinico naturale levogiro è 2S,3S,4S e non 2R,3R,4R come riportato in letteratura.^{88,90a,b}

2.6 SINTESI E RISOLUZIONE ENZIMATICA CON IDROLISI DI γ -LATTONI CONDENSATI

2.6.1 (1R,3aS,7aS)*-ottaidro-2-oxo-benzofuranilacetato di etile

Recentemente è stato utilizzato il lievito da panettiere per ottenere γ -lattoni biciclici condensati otticamente attivi **41**, a partire da 2-(γ -nitroalchil)cicloalcanoni **40**⁹⁷ e da etil 2-oxocicloalchilalcanoati **42**^{87b} (Schema 2.24).

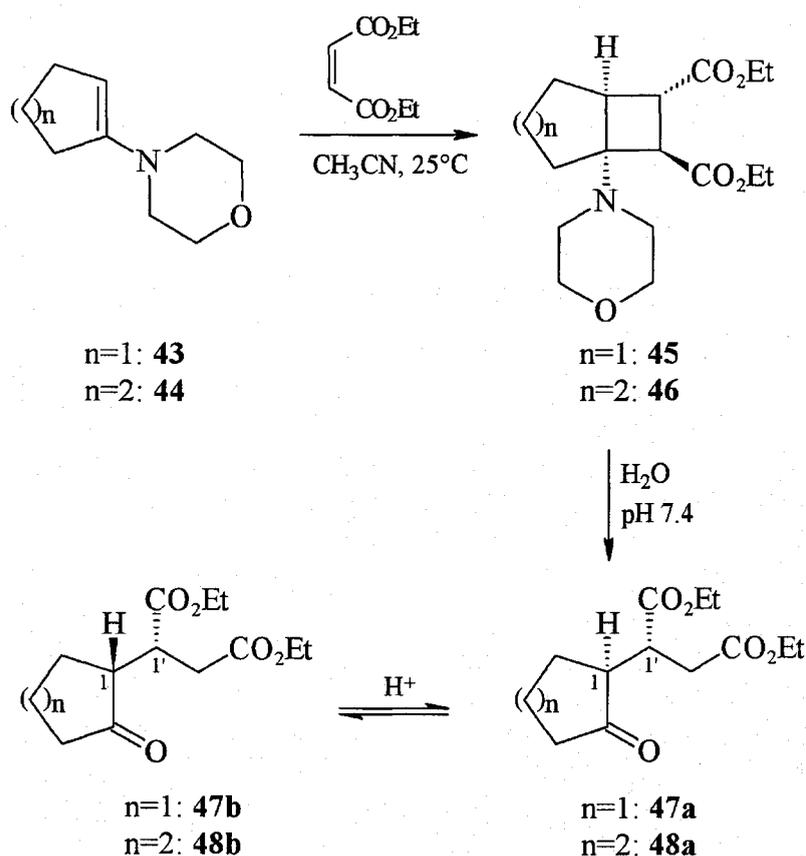


$n = 1, 2$; $R = \text{H, Me}$

Schema 2.24

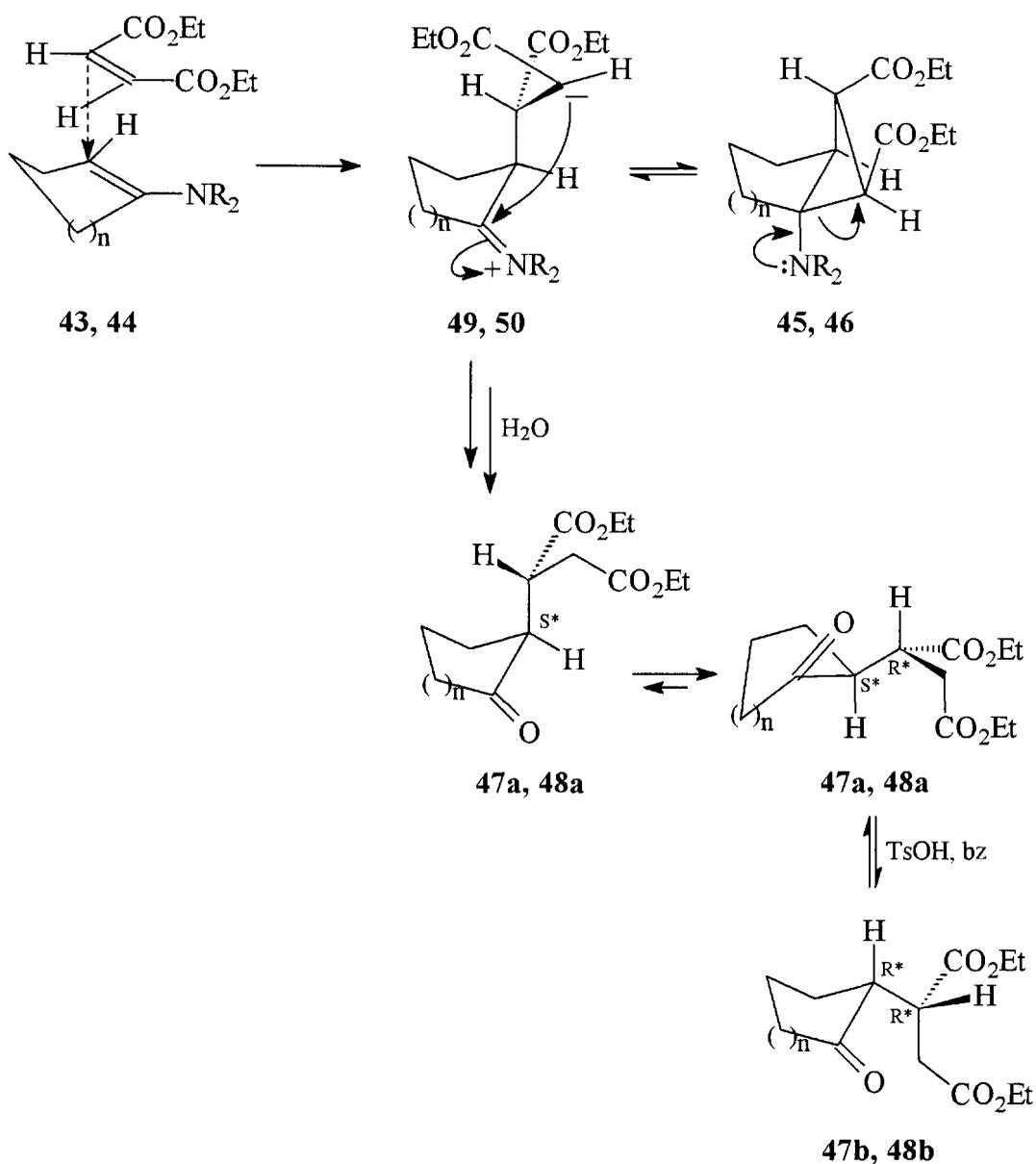
Si è pensato quindi di sintetizzare altri sistemi γ -lattonici biciclici condensati utilizzando come substrati di partenza dietilsuccinati 2-oxocicloalchilsostituiti del tipo **47** e **48** (Schema 2.25) e di risolverli mediante l'utilizzo di enzimi.

La sintesi dei derivati **47** e **48** è stata effettuata a partire dai 1-(1-morfolinil)-cicloalcheni **43** e **44** e il dietilmaleato (o fumarato) (Schema 2.25). Si ottengono i corrispondenti biciclo derivati **45** ($n=1$) e **46** ($n=2$).^{98,99} Una reazione perfettamente analoga è stata condotta sul corrispondente dimetilestere, perchè era stata fatta tempo addietro l'analisi ai raggi-X su cristallo singolo.¹⁰⁰ Tale analisi aveva rivelato la fusione *cis* tra gli anelli e la relazione *trans* tra i gruppi metossicarbonilici. Poiché lo spettro NMR dei diesteri metilico ed etilico del ciclobutanderivati è praticamente sovrapponibile, è stata assegnata la stessa stereochimica anche al dietil derivato **46**, come riportato nello Schema 2.25.



Schema 2.25

L'apertura dei ciclobutani **45** e **46** è stata condotta in tampone fosfato (pH 7.4) a temperatura ambiente. In queste condizioni è stato possibile isolare i prodotti di formazione cinetica **47a** e **48a** con elevata diastereoselettività (d.e. 70% per il composto **47a** e 94% per **48a**). L'equilibratura acida dei chetoni **47a** e **48a** ha portato a miscele di composizione circa 1:1 dei diastereoisomeri *unlike* e *like* **a** e **b** rispettivamente. La configurazione *unlike* è stata assegnata ai composti **47a** e **48a** sulla base del meccanismo di formazione dell'anello ciclobutanico che prevede un approccio topologico Re*Re* tra enamina e diestere, come proposto da Seebach e collaboratori¹⁰¹ (Schema 2.26).



Schema 2.26

I conseguenti intermedi zwitterionici **49**, **50** portano ai ciclobutanderivati **45** e **46** per collasso delle cariche. Esso è però anche intermedio nell'apertura nucleofila dei derivati biciclici stessi. L'attacco nucleofilo dell'acqua sul suo carbonio immonico seguita da eliminazione della morfolina, porta ai chetodiesteri di formazione cinetica **47a** e **48a** rispettivamente, che sono *unlike* o *anti*. Di conseguenza i chetodiesteri **47b** e **48b** sono *like* o *sin*. Per il composto **48a** la stereochimica è stata attribuita anche dal confronto tra le costanti di accoppiamento vicinali tra $\text{H}(1)\text{-H}(1')$ nei due diastereoisomeri. In accordo

con l'equazione di Karplus, la costante di accoppiamento vicinale nell'isomero *unlike* (*eritro*) è maggiore (J 6.8 Hz) di quella dell'isomero *like* (*treo*) (J 4.4 Hz) (Figura 2.15).¹⁰²

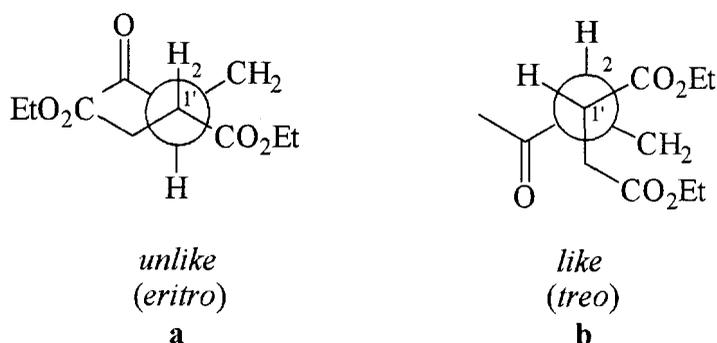
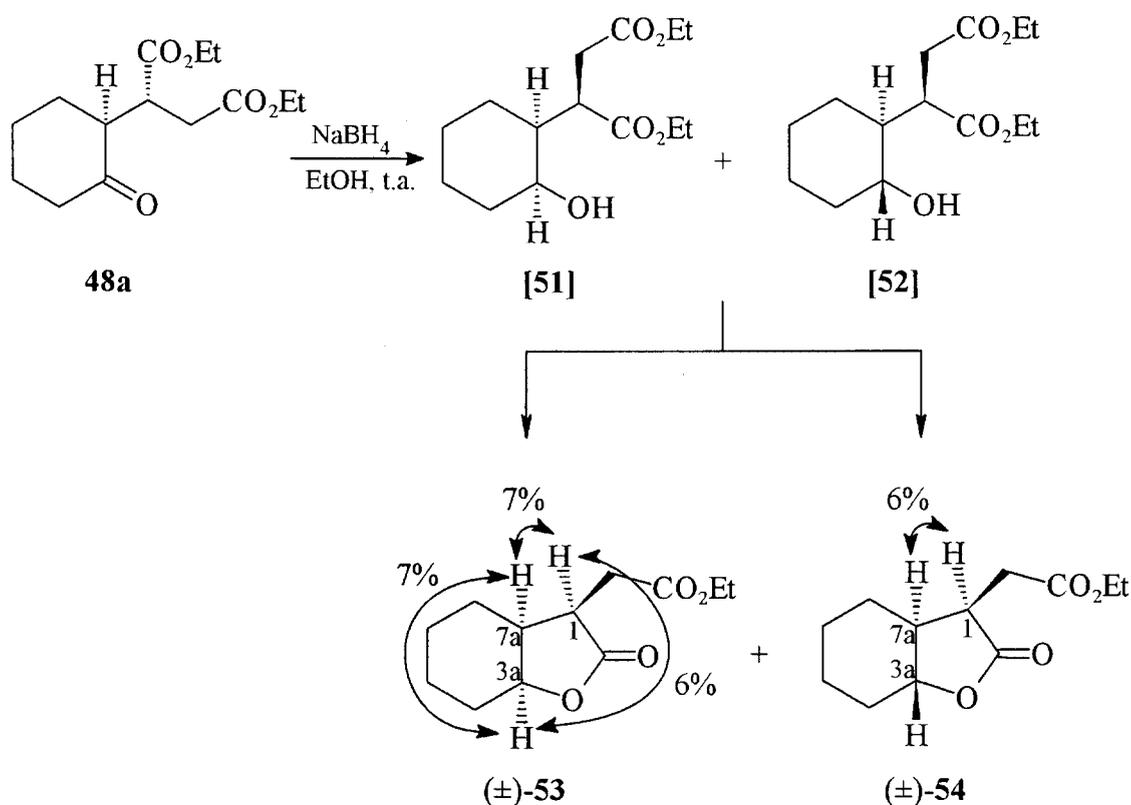


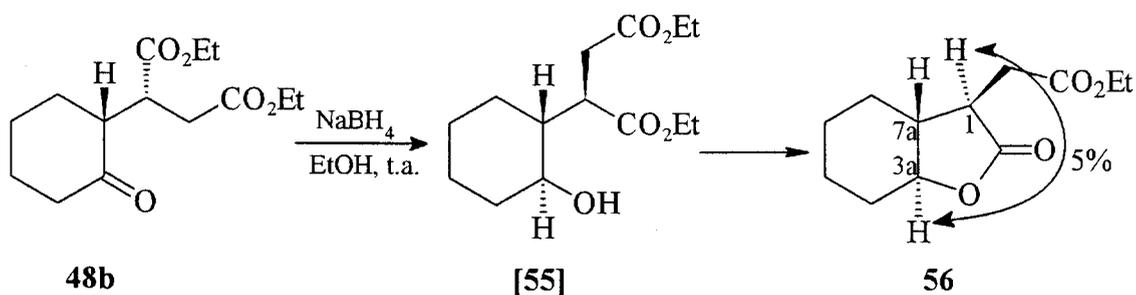
Figura 2.15

Durante i primi tentativi di risoluzione enzimatica dei chetoni cinetici, ci si è accorti che, anche nella blande condizioni di pH utilizzate, si aveva concorrente equilibratura del substrato all'idrolisi enzimatica. Perciò la risoluzione cinetica dei composti **47a** e **48a** non è stata possibile. Tuttavia, nel caso del composto **48a**, è stato osservato che la riduzione chimica con sodio boridruro avveniva prima che avesse luogo l'equilibratura. Infatti quando il chetodiestere **48a** è stato ridotto con NaBH_4 in etanolo si è avuta una ciclizzazione spontanea e rapida degli idrossidiesteri risultanti con formazione dei due lattoni isomeri **53** e **54** in rapporto 85:15, derivanti entrambi dal chetone **48a** (Schema 2.27). Essi differiscono per il tipo di fusione, come conseguenza di un attacco non diastereoselettivo dell'idruro sul gruppo carbonilico chetonico.



Schema 2.27 - Riduzione con NaBH_4 di **48a**

Quando la miscela **48a** e **48b**, in rapporto 1:1 (Schema 2.28), è stata ridotta nelle stesse condizioni, si sono ottenuti i lattoni **53**, **54** e **56** in rapporto 41:8:41 rispettivamente.



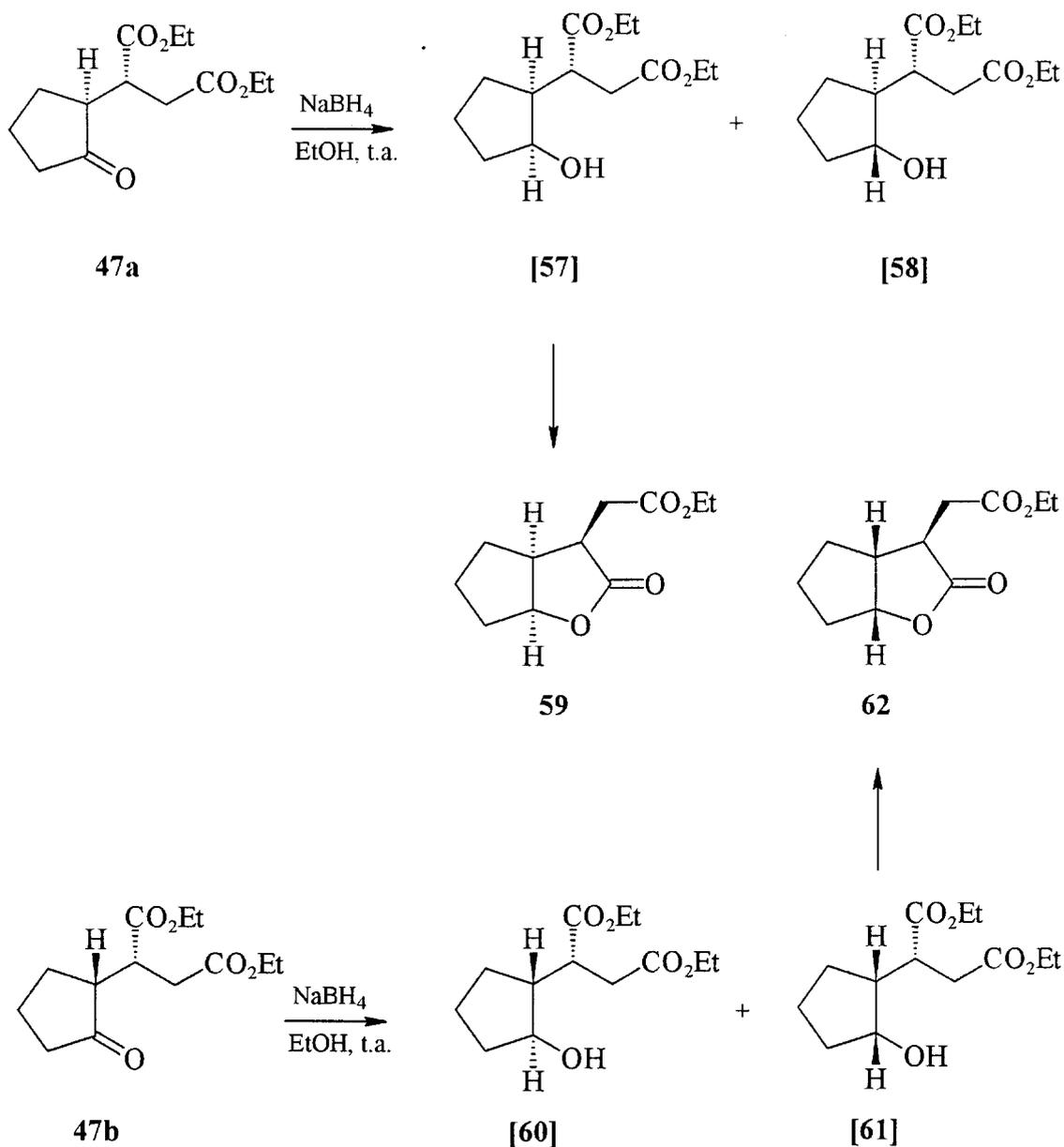
Schema 2.28 - Riduzione con NaBH_4 di **48b**

Non è stato possibile separare completamente per cromatografia dal lattone **53** il lattone **56**. E' stato comunque possibile fare degli esperimenti DIFNOE sul lattone **56**

parzialmente purificato. Essi hanno dimostrato che la fusione tra gli anelli è di tipo *trans*, e che la configurazione relativa al C(1) e al C(7a) è la stessa del chetodiestere **48b**.

2.6.2 Etil (1R,3aS,6aS)*-2H-esaidro-2-oxo-ciclopenta[b]furanacetato e (1S,3aS,6aS)*-2H-esaidro-2-oxo-ciclopenta[b]furanacetato

Contrariamente al caso precedente, nel caso del chetodiestere **47a**, la riduzione chimica non riesce ad avvenire prima che abbia luogo l'equilibratura. Infatti sia nel caso della riduzione con NaBH₄ della miscela cinetica **47a/47b** = 85:15 che in quello della miscela termodinamica **47a/47b** = 50:50 si è avuta la formazione dei due lattoni isomeri **59** e **62** in rapporto 50:50, derivanti uno dal chetodiestere **47a** e l'altro dal **47b** attraverso i rispettivi precursori alcolici *cis* **57** e **61** (Schema 2.29). La fusione degli anelli è risultata di tipo *cis* in entrambi i casi. I due lattoni quindi differiscono solo per la configurazione del C(1). Non è stato possibile separare i due lattoni **59** e **62** per cromatografia flash.



Schema 2.29 - Riduzione con NaBH_4 della miscela 47a, 47b

2.6.3 Risoluzione enzimatica del lattone biciclico 53

Il lattone biciclico (\pm)-53, l'unico che si è riusciti ad isolare puro, è stato sottoposto a risoluzione cinetica enzimatica.

Si sono utilizzate diverse idrolasi e i risultati sono riportati nella Tabella 2.4, nella quale sono stati evidenziati anche la configurazione assoluta degli enantiomeri ottenuti ed il segno di α .

Tabella 2.4 - Idrolisi enzimatica di (\pm)-**53**

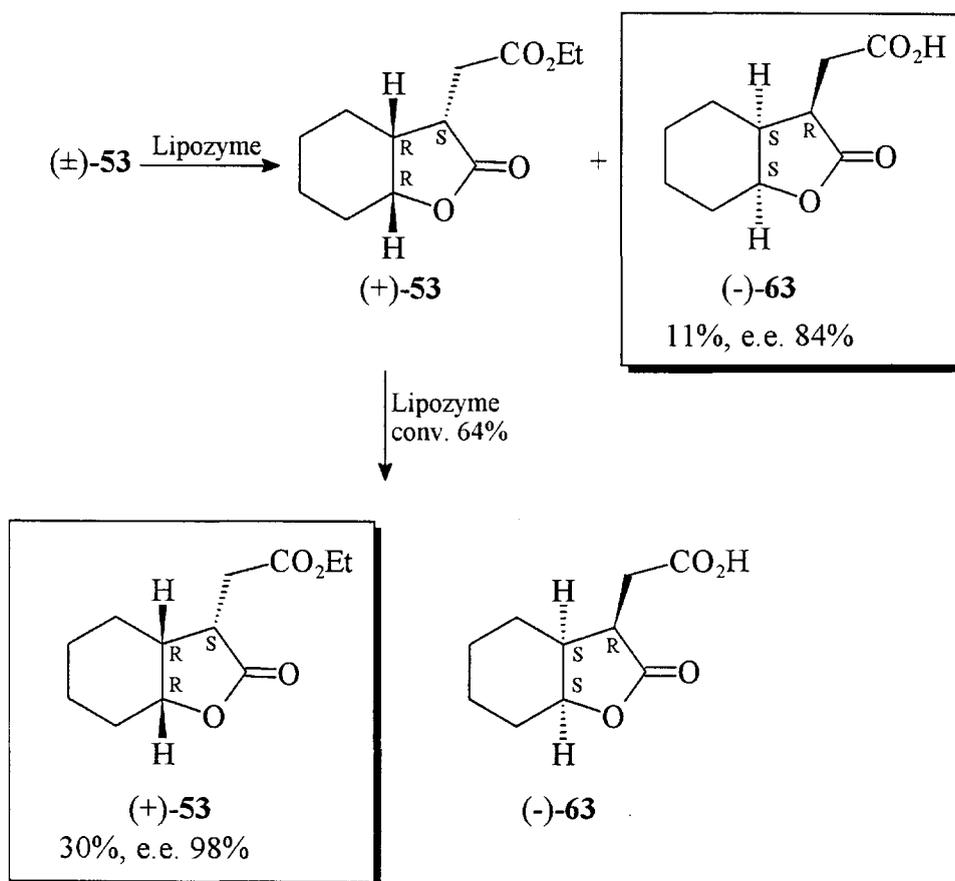
	Esteri				Acido				Conv. %	E
	Resa %	e.e. ^b %	Conf. Ass.	Segno di α	Resa %	e.e. ^c %	Conf. Ass.	Segno di α		
<i>basse conv.</i>										
HLAP (200mg/mmol) ^a	40	42	1R,3aS,7aS	(-)	20	0	-	-	25	-
Lipozyme (180 mg/mmol) ^a	50	14	1S,3aR,7aR	(+)	11	84	1R,3aS,7aS	(-)	14	13
CAL-B (10 mg/mmol) ^a	65	27	1S,3aR,7aR	(+)	11	76	1R,3aS,7aS	(-)	26	10
<i>alte conv.</i>										
HLAP (200mg/mmol) ^a	25	85	1R,3aS,7aS	(-)	45	0	-	-	70	-
Lipozyme (180mg/mmol) ^a	30	98	1S,3aR,7aR	(+)	33	55	1R,3aS,7aS	(-)	64	-
CAL-B (10 mg/mmol) ^a	34	92	1S,3aR,7aR	(+)	35	51	1R,3aS,7aS	(-)	64	-

^ain tampone fosfato 0.1M a pH 7.4 a temperatura ambiente. ^bdeterminato via HRGC chirale. ^cdeterminato per HRGC chirale degli esteri etilici.

Sebbene nessun enzima sia caratterizzato da un valore di **E** molto elevato, la Horse Liver acetone powder (HLAP), il Lipozyme e la *Candida Antarctica* Lipase B (CAL-B) hanno permesso di isolare l'estere **53** e l'acido **63** con discreti eccessi enantiomerici (Schema 2.30). La HLAP mostra un'attività enantiocomplementare rispetto al Lipozyme e alla CAL-B, portando la prima alla formazione di (-)-**53** con un e.e. dell'85% mentre gli ultimi due enzimi hanno portato all'enantiomero (+)-**53** con un e.e. del 98% e del 92% rispettivamente. (Tabella 2.4)

Per quanto riguarda l'ottenimento dell'acido otticamente attivo la HLAP non si è dimostrata enantioselettiva, mentre gli altri due enzimi hanno dato l'acido levogiro **63** con e.e. dell'84% e del 76% rispettivamente.

Il successivo Schema 2.30 riporta la risoluzione del bicilolattone (\pm)-**53** con il Lipozyme.



Schema 2.30 - Idrolisi enzimatica con Lipozyme del composto **(±)-53**

Degli altri enzimi testati, la *Candida Rugosa* Lipase (CRL), la Pig Liver acetone powder (PLAP) e la Pig Liver esterase (PLE) non sono risultate enantioselettive, mentre la Porcine pancreatic Lipase (PPL) e l' α -Chimotripsina (α -CT) non hanno mostrato attività idrolitica.

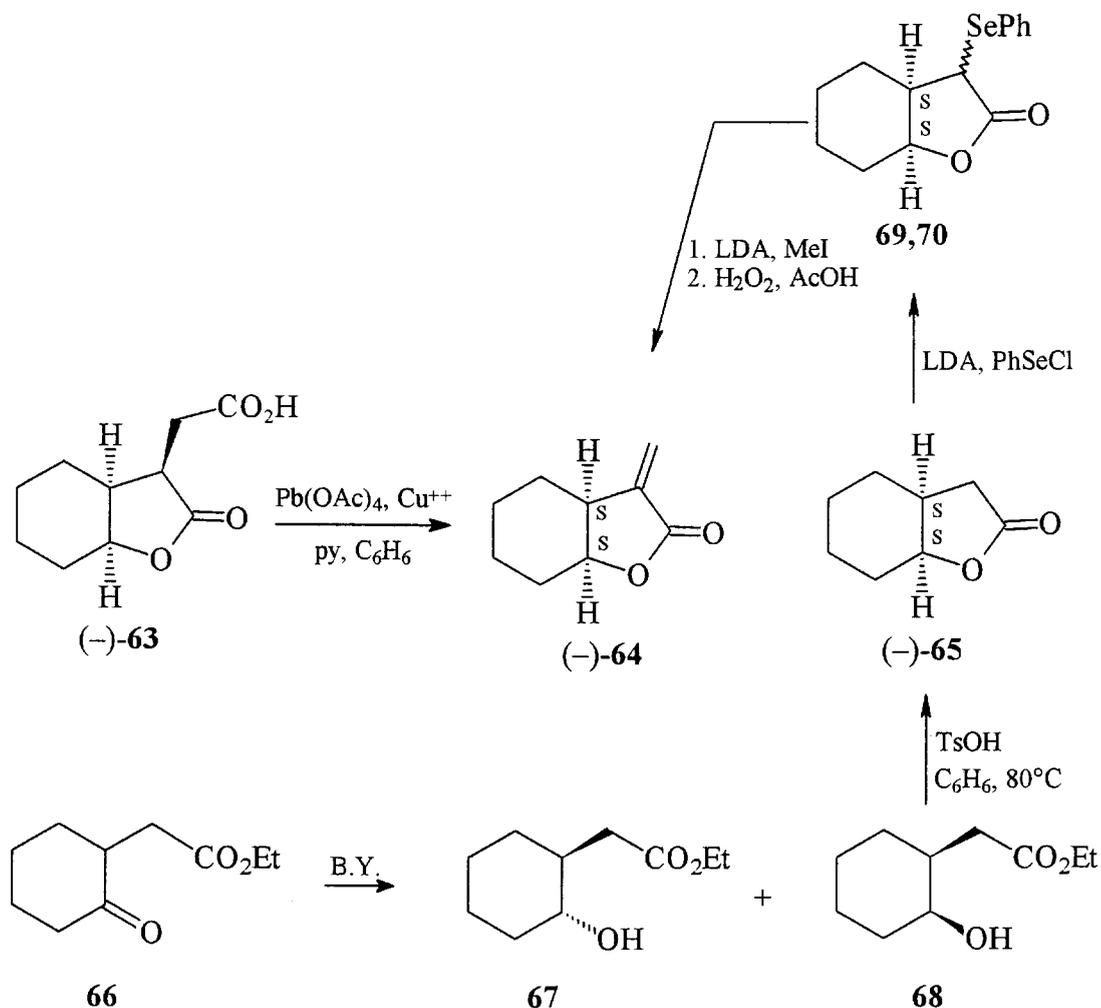
La configurazione assoluta dei lattoni **(+)-53** e **(-)-63** è stata determinata sia per correlazione con un'altro biciclolattone a configurazione assoluta nota che attraverso l'analisi degli spettri CD.

L'acido **(-)-63** è stato trasformato nel corrispondente α -metilenolattone **(-)-64**⁹³ (Schema 2.31) nelle condizioni di Kochi¹⁰³. Per stabilire la configurazione assoluta di **(-)-64**, si è utilizzato come precursore il biciclolattone **(-)-65** a configurazione assoluta (S,S) e lo si è sottoposto ad α -metilazione secondo Grieco e Miyashita⁹³.

Il biciclolattone **(-)-65** è stato sintetizzato per bioriduzione con lievito da panettiere del γ -chetoestere **66**. Si è ottenuta una miscela di alcoli diastereoisomeri *trans* e *cis* **67** e

68¹⁰⁴ in rapporto 1:1, aventi entrambi un e.e. del 99%, determinato gascromatograficamente. Dopo la separazione della miscela, l'alcol *cis* **68** è stato trasformato nel corrispondente γ -lattone *cis* (-)-**65** di cui si conosce la configurazione assoluta (3aS,7aS)^{97a,105} (Schema 2.31). Quest'ultimo composto è stato fenilselenilato.⁹³ Sono stati isolati e caratterizzati i derivati fenilselenilati **69** e **70**¹⁰⁶ entrambi con e.e. del 99%. La miscela **69**, **70** è stata metilata, quindi per ossidazione e trattamento con CH₃CO₂H si è ottenuto il lattone (-)-**64**, che è risultato lo stesso derivato da (-)-**63** per degradazione secondo Kochi.¹⁰³

Di conseguenza resta determinata anche la configurazione del lattone acido (-)-**63** e del suo estere etilico (-)-**53** come (1R,3aS,7aS).



Schema 2.31

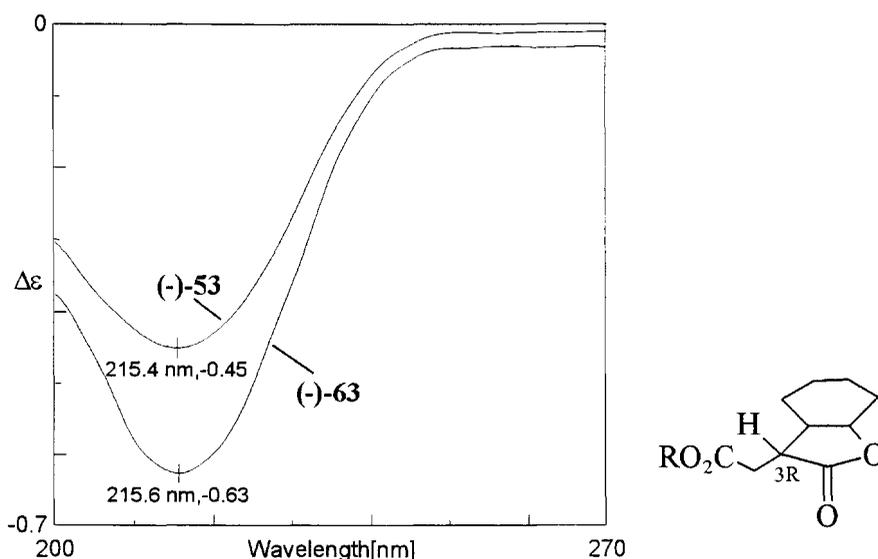


Figura 2.16

Il lattone acido (-)-**63** così come il suo estere etilico (-)-**53** presentano spettri CD con effetto Cotton negativo associato alla transizione $n \rightarrow \pi^*$. (Figura 2.16)

Come detto precedentemente, la regola di Okuda,^{70c} formulata per lattoni aventi un gruppo OH in posizione α , è risultata valida anche quando il sostituito in α era CH_3 o CH_2CH_3 . Siccome la configurazione assoluta sia di (-)-**53** che di (-)-**63** è 1R,3aS,7aS, il gruppo $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$ si trova sotto il piano medio della molecola, per cui la regola di Okuda risulta valida anche quando il sostituito in α al gruppo carbonilico è il gruppo $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$.

Lo spettro CD dell' α -metileno γ -lattone (-)-**64**, che mostra una banda a debole effetto Cotton positivo a 256 nm, (Figura 2.17) associato alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ e un intensa banda a effetto Cotton negativo a 214 nm, associata alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$, è in accordo con quanto trovato per altri α -metileno γ -lattoni biciclici analoghi con configurazione assoluta 3aS,7aS.^{87b}

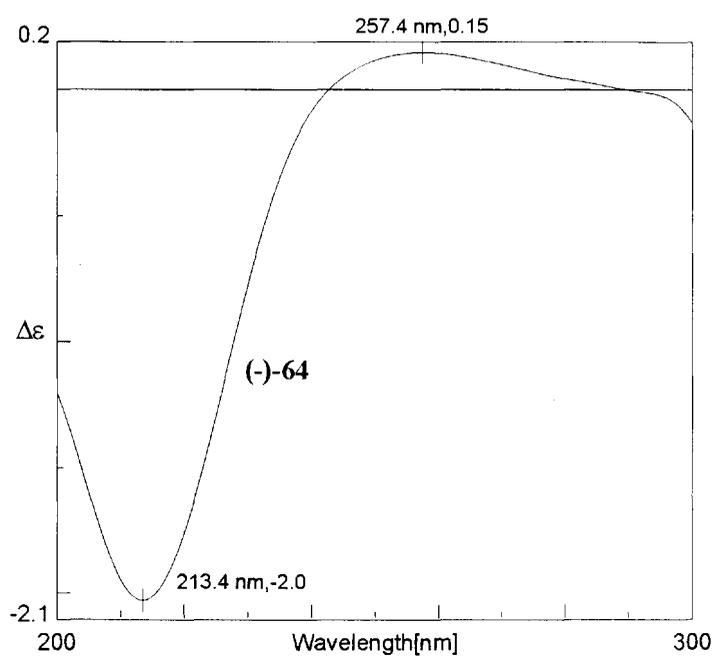


Figura 2.17 - Curva CD di (-)-64

CAPITOLO 3

PARTE SPERIMENTALE

3.1 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Büchi 510 e non sono corretti. Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Jasco FT/IR 200. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati con uno spettrometro JEOL GX-400 (400MHz) usando CDCl_3 come solvente e tetrametilsilano come standard interno (se non diversamente indicato); i valori di J sono espressi in Hz. Gli spettri $^{13}\text{C-NMR}$ sono stati registrati con un JEOL GX-400 (100.4MHz). La registrazione degli spettri di massa è stata effettuata con uno spettrometro VG 7070 a 70eV. Il potere rotatorio specifico è stato determinato con un polarimetro Perkin-Elmer 241. Gli spettri UV sono stati registrati su uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 5 e uno Jasco 241. Gli spettri CD sono stati registrati con uno spettropolarimetro JASCO J-500A. I gascromatogrammi sono stati effettuati con un gascromatografo CARLO ERBA GC 8000, utilizzando due colonne capillari, una CARBOWAX (30m x 0.32mm) ed una OV 1701 (25m x 0.32mm), alle seguenti condizioni: gas di trasporto He, pressione in testa 40KPa, split 1:50, temperatura detector (FID) 250°C, temperatura iniettore 250°C. Per la determinazione degli eccessi enantiomerici si è utilizzato un gascromatografo SHIMADZU 14B con due colonne capillari: una ChiralDEXTM tipo G-TA, trifluoroacetil γ -ciclodestrine, 40m x 0.25mm alle seguenti condizioni: gas di trasporto He, pressione in testa 180kpa, split 1:100, temperatura detector (FID) 260°C, temperatura iniettore 240°C; e una DMePeBETACDX, β -ciclodestrine, (30m x 0.32mm) alle seguenti condizioni: gas di trasporto He, pressione in testa 110kpa, split 1:50, temperatura detector (FID) 260°C, temperatura iniettore 240°C. Per le separazioni cromatografiche in colonna è stata adoperata la tecnica Flash-Chromatography utilizzando silica gel 230-400 mesh ASTM, Kieselgel 60, Merck. Come fase mobile sono state usate miscele di etere di petrolio 40° - 70° e acetato di etile nella composizione di volta in volta indicata. La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata eseguita con lastre KGF (Whatman) di 250mm di spessore, ricoperte di silica gel; come fase mobile sono state utilizzate miscele di etere di petrolio 40° - 70° e acetato di etile in rapporto 80/20 (se non diversamente indicato).

3.2 ENZIMI

Le lipasi (EC 3.1.1.3) da pancreas di maiale (PPL, tipo II, grezza, No L-3126) e da *Candida Rugosa* (CRL, No. L-1754), l'esterasi da fegato di maiale (PLE, EC 3.1.1.1.) in una sospensione 3.2 M di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (No. E-2884), la PLE grezza (HLAP, No. L-8251) e l'esterasi grezza da fegato di cavallo (HLAP, No. L-9627) sono state acquistate dalla Sigma Chemicals Co.; il Lipozyme[®] (lipasi da *Mucor miehei*, immobilizzata), la lipasi da *Candida Antarctica* ricombinata B (CAL-B, 62288; 9.2 U/mg), α -Chymotrypsin (α -CT, 27272; 53.1 U/mg) sono state acquistate dalla Fluka Bio-Chemica.

3.3 PROCEDIMENTO GENERALE DI ESTERIFICAZIONE DELL'ACIDO OSSALACETICO 1 E DELL'ACIDO MALICO 3

5g di acido ossalacetico **1** (37.9mmol), 132.6mml (3.5 eq) dell'alcol corrispondente ed acido *p*-toluenosolfonico in quantità catalitica sono messi a riflusso in benzene utilizzando un apparecchio di Markusson per la distillazione azeotropica dell'acqua. Terminata la formazione di acqua, la soluzione viene lavata con H_2O , con una soluzione satura di NaHCO_3 e nuovamente con H_2O .

Dopo aver anidrificato la soluzione su Na_2SO_4 anidro ed aver eliminato il solvente al rotavapor, si ottiene l'estere. La stessa procedura viene applicata per l'acido malico (\pm)-**3**.

Il dietil ossalacetato **2b** si compra dalla Aldrich. I dati del dimetil ossalacetato **2a** corrispondono a quelli di letteratura.¹⁰⁷ Gli esteri ossalacetici si trovano in equilibrio con la forma enolica.

Di-n-propil ossalacetato 2c: olio, ^1H NMR (400MHz) δ 11.7 (0.8H, bs, OH), 5.97 (0.8H, s, CH), 4.19 (2H, t, J 6.8, OCH_2), 4.13 (1.6H, t, J 6.8, OCH_2), 4.07 (0.4H, t, J 6.8, OCH_2), 3.78 (0.4H, s, COCH_2), 1.68 (4H, m, CH_2CH_3), 0.94 (6H, m, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 171.9 (s), 161.8 (s), 159.3 (s), 96.8 (0.8d), 67.8 (t), 66.8 (t), 45.2 (0.2t), 21.7 (t), 10.2 (q).

Di-i-propil ossalacetato 2d: olio; ^1H NMR (400MHz), δ 11.7 (0.7H, bs, OH), 5.97 (0.7H, s, =CH), 5.16 (2H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.77 (0.6H, s, COCH_2), 1.33 (6H, d, J 6.1, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.30 (6H, d, J 6.1, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

3.4 RIDUZIONE CON LIEVITO DA PANETTIERE (GENERALE)

3.4.1 Riduzione in ambiente acquoso

30g di lievito di birra (o 3g se si utilizza il lievito Sigma) in 60ml di acqua vengono preincubati a 50°C per 30min.

Dopo aver lasciato raffreddare il sistema a temperatura ambiente, si aggiungono 3mmol del chetodiestere **2a-d** e si pone la miscela sotto agitazione fino al termine della riduzione.

L'andamento della reazione viene seguito tramite HRGC ad intervalli di tempo. Quando la riduzione è giunta a completezza si procede all'estrazione con etere etilico con estrattore in continuo per 48 h. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄.

3.4.2 Riduzione in benzene

0.5 mmol di chetodiestere **2b** e 5g di lievito (dry baker's yeast, Sigma, typeII) vengono messi sotto agitazione in 28ml di benzene, aggiungendo alla miscela 2ml di tampone 0.1M a pH=5.

Terminata la riduzione si anidrifica la fase organica su Na₂SO₄, si svapora il solvente e si procede all'analisi del grezzo di reazione.

La configurazione assoluta degli alcoli è stata determinata via HRGC chirale per confronto con l'acido S-(-)-malico (e.e.> del 99%, Aldrich) opportunamente esterificato.

3.4.3 Dimetil malato **4a**

La riduzione del chetodiestere **2a** con lievito in acqua, ultimata dopo 4h, ha portato alla formazione dell'alcol **4a** a configurazione S con e.e. pari all'82%.

Il tentativo di risolvere il dietil malato **4a** con il lievito da panettiere non ha dato alcun risultato.

HRGC (Carbowax, 100°C per 5min, 3°C/min fino a 200°C) t_R 29.25min; (β -Ciclodestrine, 120°C per 20min 3°C/min fino a 150°C) t_R 9.33min per R-(+)-**4a**, 9.85min per S-(-)-**4a**.

3.4.4 Dietil malato 4b

La riduzione del composto **2b** con lievito in acqua è stata seguita via HRCG chirale, dopo 3h non vi è più il chetodiestere **2b** ma solo l'alcol **4b** con e.e. del 36%. Si è notato comunque un aumento nel tempo dell'e.e. dell'alcol **4b**. Dopo 3 giorni si ottiene infatti l'alcol S-(-)-**4b** con un e.e. del 97%. Accanto all'atteso alcol **4b**, dalla gascromatografia si nota la presenza di un altro prodotto, che è stato identificato come l'etil 3-idrossi-propionato **5b**. E' stato impossibile isolare il prodotto vista la sua elevata volatilità, sono stati però individuati i segnali dallo spettro NMR. Sul composto **2b** sono state fatte altre prove: con il lievito Sigma l'andamento della reazione è sempre lo stesso appare solo più lento, dopo 16 h si ha solo l'alcol **4b** con un e.e. del 60% e dopo sei giorni raggiunge un e.e. del 90%; in benzene i risultati sono scarsi, la reazione è lenta e poco enantioselettiva (57% e.e. dopo 3g).

Si è pensato quindi di tentare la risoluzione dell'alcol (\pm)-**4b** utilizzando il lievito da panettiere con le stesse quantità utilizzate per il composto **2b**. La reazione ha dato ottimi risultati: si è ottenuto l'alcol S-(-)-**4b** con un e.e.>99% dopo 30h; anche questa volta è stato identificato il decarbossilato **5b**.

Dietil malato 4b: HRGC (Carbowax, 100°C per 5min 3°C/min fino a 200°C) t_R 31.42min; (β -Ciclodestrine, 120°C per 20min 3°C/min fino a 150°C) t_R 16.19min per R-(+)-**4b**, 16.56min per S-(-)-**4b**; i dati 1H MNR sono identici a quelli riportati in letteratura.⁷⁸ ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 173.3 (s), 170.4 (s), 67.2 (d), 61.9 (d), 60.9 (t), 38.6 (t), 14.0 (q).

3.4.5 Di-n-propil malato 4c

La bioriduzione con lievito, condotta come nei casi precedenti, del composto **2c** ha portato alla formazione dell'alcol **4c** in 2h con un e.e. del 94%. La stessa reazione condotta per 1 giorno ha permesso di ottenere esclusivamente il prodotto di decarbossilazione, n-propil 3-idrossi propionato **5c**.

L'e.e. di **4c** è stato determinato per transesterificazione nel composto **4b**, non essendo il composto **4c**, nè il derivato trifluoroacetilato separabili con le colonne chirali a disposizione. Anche in questo caso è stato fatto un tentativo di risolvere in lievito l'alcol

(±)-**4c**, ma dopo 5 giorni l'alcol si presenta ancora come un perfetto racemo.

Di-n-propil malato 4c: HRGC (Carbowax, 100°C per 5min 3°C/min fino a 200°C per 30min) t_R 35.09min; 1H NMR, (400MHz) δ 4.44 (1H, dd, J_1 4.4, $CHOH$), 4.09 (2H, t, J 6.8, OCH_2), 2.76 (2H, dd, J_1 4.4, J_2 11.4, CH_2CO), 1.61 (4H, m, CH_2CO), 0.87 (6H, 2t, CH_3); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 170.5 (s), 67.4 (t), 67.20 (d), 66.5 (t), 38.6 (t), 21.7 (t), 10.1 (q).

n-Propil 3-idrossi-propionato 5c: olio, IR (film) 3500 (OH), 1735 (CO_2CH_2); 1H NMR, (400MHz) δ 3.97 (2H, t, J 6.8, OCH_2), 3.77 (2H, t, J 5.6, CH_2OH), 2.48 (2H, t, J 5.9, CH_2CO), 1.56 (2H, m, CH_2CH_3), 0.84 (3H, t, J 7.6, CH_3); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 172.9 (s), 66.2 (t), 58.1 (t), 36.7 (t), 21.8 (t), 10.2 (q).

3.4.6 Di-i-propil malato 4d

La riduzione del composto **2d** in acqua con lievito da panettiere fornisce l'alcol **4d** dopo 3h con un e.e. del 28%. Come nel caso del composto **4b** anche questa volta si nota un aumento dell'e.e. nel tempo fino ad arrivare ad un 76%. Si nota di nuovo la presenza del composto di decarbossilazione **5d**, che viene isolato per flash chromatography.

La risoluzione dell'alcol (±)-**4d** con lievito da panettiere ha dato ottimi risultati: dopo due giorni si ottiene l'alcol S-(-)-**4d** con e.e. del 99%.

i-Propil malato 4d: olio, HRGC (Carbowax, 100°C per 5min, 3°C/min fino a 200°C per 30min) t 27.95min; (β -Ciclodestrine, 100°C per 20min, 3°C/min fino a 150°C per 30min) t_R 31.35min per S-(-)-**4d**, 32.06min per R-(+)-**4d**; 1H NMR, (400MHz) δ 4.98 (2H, m, $CH(CH_3)_2$), 4.37 (1H, dd, J_1 4.4, J_2 5.9, $CHOH$), 2.72 (1H, dd, J_1 4.4, J_2 16.1, CH_2CO), 2.66 (1H, dd, J_1 5.9, J_2 16.1, CH_2CO), 1.18 (12H, d, $CH(CH_3)_2$)

i-Propil 3-idrossi-propionato 5d: 1H NMR, (400MHz) δ 5.11 (1H, m, $CH(CH_3)_2$), 3.91 (2H, t, J 5.6, CH_2OH), 2.59 (2H, t, J 5.6, CH_2CO_2), 1.30 (6H, d, J 6.3, CH_3).

3.5 SINTESI DEL DIETIL 4-METIL-2-OXOGLUTARATO 9

L'acido 4-metil-2-oxoglutarico **13** viene preparato in accordo con Blaise e Gault⁸³ per condensazione del dietil metilsuccinato **10** con il dietil ossalato **11**, si ottiene il triestere

12 con una resa del 60%.

Il composto **13** si ottiene per idrolisi e decarbossilazione del triestere **12** a refluxo in HCl 4N per circa 6 h. I dati spettroscopici sono in accordo con quelli di letteratura.⁸⁴

10g di acido **13** (62.5 mmol), 3.5 eq di EtOH e acido *p*-toluensolfonico (tracce) sono messi a refluxo in benzene utilizzando un apparecchio di Markusson per la distillazione azeotropica dell'acqua. Quando non si nota più la formazione di acqua, la soluzione viene lavata con H₂O e con una soluzione satura di NaHCO₃. Dopo aver anidrificato la soluzione su Na₂SO₄ anidro ed eliminato il solvente si ottiene il diestere **9**, che viene purificato per distillazione. Resa 47%. I dati spettroscopici sono in accordo con quelli di letteratura.⁸²

3.6 RIDUZIONE DELL'ETIL 4-METIL-2-OXOGLUTARATO 9

3.6.1 Riduzione con sodioboroidruro

Ad una soluzione di 2g di chetodiestere **9** in 4.6 ml di H₂O si aggiungono a piccole aliquote, a temperatura ambiente, 175mg di NaBH₄; la miscela viene mantenuta sotto agitazione fino a completa scomparsa del chetone verificata mediante analisi gascromatografica.

La fase acquosa si acidifica con HCl 1:4 a pH 2 e si estrae più volte con etere etilico.

Dopo aver anidrificato la fase organica su Na₂SO₄, si elimina il solvente e ottiene una miscela costituita dagli alcoli *anti* **14** e *sin* **15**, dal lattone *cis* **16** e *trans* **17** in rapporto 46:30:18:6 rispettivamente. Lo spettro ¹H NMR è stato registrato sulla miscela ma, dove è stato possibile, i segnali degli alcoli sono stati dati separatamente. Per lo spettro ¹³C NMR non è stato possibile distinguere i segnali.

Dietil (2R,4R)*-2-idrossi-4-metil-glutarato 14: HRGC (Carbowax, 100 °C per 10 min, 3 °C/min fino a 200 °C per 40 min) t_R 37.75min; ¹H NMR (400MHz) δ da 4.22 a 4.20 (5H, m, CH₂CH₃, CHOH), 2.66 (1H, m, CHCH₃), 1.96 (1H, ddd, J₁ 6.2, J₂ 9.5, J₃ 13.9, -CH₂-), 1.76 (1H, ddd, J₁ 4.0, J₂ 7.7, J₃ 13.9, -CH₂-), da 1.26 a 1.12 (9H, m, -CH₃ + CH₂CH₃)

Dietil (2R,4S)*-2-idrossi-4-metil-glutarato 15: HRGC (Carbowax, 100 °C per 10

min, 3 °C/min fino a 200 °C per 40 min) t_R 37.75min; 1H NMR (400MHz) δ da 4.22 a 4.20 (5H, m, CH_2CH_3 , $CHOH$), 2.66 (1H, m, $CHCH_3$), 2.14 (1H, ddd, J_1 4.0, J_2 9.9, J_3 13.7, $-CH_2-$), 1.59 (1H, ddd, J_1 4.4, J_2 9.3, J_3 13.7, $-CH_2-$), da 1.26 a 1.12 (9H, m, $-CH_3$ + CH_2CH_3)

Tale miscela viene messa a riflussare in benzene ed acido *p*-toluensolfonico (tracce) per circa 1 h. Dopo la normale procedura si ottiene una miscela (resa 57%) costituita dai lattoni *cis* **16** e *trans* **17** in rapporto 60:40 rispettivamente. I prodotti vengono separati per flash chromatography (eluente: etere di petrolio-acetato di etile, gradiente da 0 a 10%)

Etil *cis*-4-metil-5-oxo-tetraidro-2-furancarbossilato 16: HRGC (γ -ciclodestrine, 100°C per 10 min 3°C/min fino a 200°C per 40 min) t_R 40.95 min; IR 1770, 1736; 1H NMR (400MHz) δ 4.80 (1H, dd, J_1 7.1, J_2 9.3, CHO), 4.28 (2H, q, J 7.1, OCH_2CH_3), 2.75 (2H, m, $CHCH_3$ + $-CH_2-$), 1.95 (1H, ddd, $J_1=J_2$ 9.2, J_3 12.5, $-CH_2-$), 1.32 (3H, t, J 7.1, CH_2CH_3), 1.32 (3H, d, J 7.0, CH_3); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 178.0 (s), 169.5 (s), 74.0 (d), 61.9 (t), 34.4 (d), 34.0 (t), 15.4 (q), 14.0 (q); MS, m/z : 172 (M^+ , 1), 99 (100), 71 (38), 43 (38).

Etil *trans*-4-metil-5-oxo-tetraidro-2-furancarbossilato 17: HRGC (γ -ciclodestrine, 100°C per 10 min 3°C/min fino a 200°C per 40 min) t_R 38.42 min; 1H NMR (400MHz) δ 4.88 (1H, dd, J_1 2.2, J_2 9.2, CHO), 4.26 (2H, q, J 7.1, OCH_2CH_3), 2.74 (1H, m, $CHCH_3$), 2.55 (1H, ddd, J_1 2.2, J_2 8.8, J_3 13.2, $-CH_2-$), 2.21 (1H, ddd, J_1 9.2, J_2 11.2, J_3 13.2, $-CH_2-$), 1.30 (3H, t, J 7.1, CH_2CH_3), 1.32 (3H, d, J 7.0, CH_3); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 178.8 (s), 169.5 (s), 73.7 (d), 62.0 (t), 34.4 (d), 34.2 (t), 15.2 (q), 14.0 (q); MS, m/z : 172 (M^+ , 1), 99 (100), 71 (39), 43 (52). DIFNOE: l'irraggiamento del segnale a 4.88 ppm porta ad un innalzamento del 5.6 % del segnale a 2.21 ppm; l'irraggiamento del segnale a 2.21 ppm non porta ad alcun innalzamento del segnale a 2.74 ppm, mentre irraggiando il segnale a 2.55 ppm si ha un innalzamento del 2.1 % del segnale a 2.74 ppm.

3.6.2 Riduzione con lievito da panettiere del chetodiesteri 9

Viene seguita la procedura già indicata nel Raragrafo 3.4 utilizzando 1g di chetodiesteri

9. La reazione viene seguita via HRGC nel tempo, dopo 2,5 h si ha la completa scomparsa del composto 9. Dopo estrazione si ottiene un grezzo costituito dagli alcoli *sin* + *anti* (non distinguibili alla gascromatografia) e da un ulteriore prodotto di reazione l'etil 4-idrossi-2-metil-butirrato 18 in rapporto 1:1 rispettivamente.

Il grezzo viene messo a riflussare in benzene ed acido *p*-toluensolfonico (tracce) per circa 1 h e si trasforma in una miscela costituita dai lattoni *cis* 16, *trans* 17 e dal 2-metilbutanolide 19, in rapporto 32:24:44 rispettivamente. I lattoni vengono separati per flash chromatography. Si ottiene il lattone *cis* (2S,4S)-16 con e.e pari al 49%, non è stato possibile separare il lattone *trans* (2S,4R)-17 (e.e. 49%) dal 2-metilbutanolide 19, sono stati individuati nello spettro NMR i segnali relativi a quest'ultimo composto e corrispondono a quelli di letteratura.⁸⁵

Se la reazione di riduzione viene condotta senza preincubare il lievito l'andamento della reazione è diverso: dopo due ore si ha solo la presenza del estere etilico dell'acido 4-idrossi 2-metil-butirrico 18.

3.7 PROCEDIMENTO GENERALE DI IDROLISI ENZIMATICA

Il lattone estereo in tampone fosfato a pH 7.4 viene mantenuto sotto vigorosa agitazione. Viene aggiunto l'enzima e si segue la reazione con un pH-metro facendo aggiunte successive di NaOH 1 N in modo da mantenere il pH al valore iniziale. La reazione viene fermata al 20÷25% di conversione. La fase acquosa viene estratta quattro volte con etere e la fase organica viene seccata su Na₂SO₄ anidro. La fase acquosa viene quindi acidificata con HCl 1:4 a pH \cong 1, estratta nuovamente quattro volte con etere; la fase organica viene anidrificata. Allontanato il solvente, l'acido che si ottiene viene ricristallizzato da etere di petrolio e acetato di etile.

Per gli enzimi che dimostrano un elevato valore di *E* si è operata anche l'idrolisi dell'estere fino ad un valore di conversione più elevato in modo da ottenere l'estere otticamente attivo con elevata purezza ottica. Gli esteri a basso eccesso enantiomerico, ottenuti dalle idrolisi al 20% di conversione sono stati idrolizzati con le medesime modalità viste sopra, seguendo la variazione dell'eccesso enantiomerico nel tempo mediante analisi gas-cromatografica.

3.7.1 Risoluzione enzimatica dell'Etil *cis*-4-metil-5-oxo-tetraidro-2-furan carbossilato 16 e dell'Etil *trans*-4- metil-5-oxo-tetraidro-2-furan carbossilato 17

Per testare gli enzimi si sono utilizzati in genere 200mg di lattone. Gli eccessi enantiomerici sono stati determinati via HRGC chirale esterificando l'acido con CH₂N₂.

Acido (2R,4R)-(+)-*cis*-4-metil-5-oxo-tetraidro-2-furancarbossilico 16a: HRGC (γ -ciclodestrine: 100 °C per 10 min 3°C/min fino a 150°C per 40 min) t_R 33.61 per (-)-16a, 41.26 (+)-16a esterificati con CH₂N₂; ¹H NMR (400MHz) δ 9.12 (1H, s, COOH), 4.87 (1H, dd, J_1 7.1, J_2 9.2, CHO), 2.81 (2H, m, CHCH₃ + -CH₂-), 2.00 (1H, ddd, $J_1=J_2$ 9.2, J_3 11.7, -CH₂-), 1.32 (3H, d, J 6.8, CH₃); lo spettro del ¹³C NMR corrisponde a quello in letteratura;⁸⁶ e.e. 92%; $[\alpha]_D^{25} +3.2$ (c 0.95, MeOH); $\Delta\varepsilon_{216} = -0.2$ (MeOH).

Etil (2S,4S)-(-)-*cis*-4-metil-5-oxo-tetraidro-2-furancarbossilato 16: e.e. 99%; $[\alpha]_D^{25} -3.9$ (c 0.18, MeOH); $\Delta\varepsilon_{216} = +1.35$ (MeOH).

Acido (2S,4R)-*trans*-4-metil-5-oxo-2-furancarbossilico 17a: HRGC (γ -ciclodestrine: 100°C per 10 min 3°C/min fino a 150°C per 40 min) t_R 34.25 min per (2S,4R)-17a, 43.61 min per (2R,4S)-17a esterificati con CH₂N₂; ¹H NMR (400MHz) δ 9.00 (1H, s, COOH), 4.94 (1H, dd, J_1 2.3, J_2 9.3, CHO), 2.80 (1H, m, CHCH₃), 2.62 (1H, ddd, J_1 2.3, J_2 8.7, J_3 13.0, CH₂), 2.25 (1H, ddd, J_1 9.3, J_2 10.6, J_3 13.0, CH₂), 1.29 (3H, d, J 6.9, CH₃); lo spettro del ¹³C NMR corrisponde a quello in letteratura,⁸⁶ e.e. 80%.

Etil (2R,4S)-(+)-*trans*-4-metil-5-oxo-tetraidro-2-furancarbossilato 17: e.e. 96%; $[\alpha]_D^{25} +10.7$ (c 0.14, MeOH); $\Delta\varepsilon_{205} = +0.56$ (MeOH).

3.8 IDROLISI ENZIMATICA DELL'ETIL CIS-5-OXO-2-PENTIL-TETRAIDROFURAN-3-CARBOSSILATO 24

Il lattone (\pm)-24 si sintetizza come già descritto in letteratura^{66a}.

3.8.1 Idrolisi enzimatica dell'etil (\pm)-*trans*-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossilato 23

Si aggiungono, sotto agitazione, 80 mg di PLAP (180 mg/mmol) ad una sospensione di lattone (+)-23 (100 mg, 0.43 mmol) in 5 ml di tampone KH₂PO₄/Na₂HPO₄ 0.1 M (pH 7.4). La reazione viene seguita via HRGC chirale fino alla completa scomparsa

dell'estere, poi la soluzione va acidificata a pH 2, si addiziona etere e si centrifuga (3 volte). Dopo anidificazione su Na_2SO_4 si svapora il solvente e si ottiene (+)-**25**^{66a} che viene cristallizzato da etere di petrolio-acetato di etile (9:1); p.f.: 105-6°C (30 mg, resa 35%); e.e. 99%; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +58.6$ (c 0.15, CHCl_3) [lett.,^{66a} $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -54.5$ (c 0.5, CHCl_3) per l'enantiomero (-)-**25**].

3.8.2 Idrolisi enzimatica dell'etil (\pm)-*cis*-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossilato **24**

1.1 g (4.8 mmol) di lattone (\pm)-**24** in 10 ml di tampone fosfato a pH 7.4 vengono mantenuti a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione. Si aggiungono 1.0 g di PLAP (250 mg/mmol), il valore del pH viene mantenuto tra 7.4 e 7.8 per aggiunte successive di NaOH 1M. L'andamento della reazione viene seguito via HRGC chirale. Dopo 5 h e l'aggiunzione di 0.25 eq di base, si aggiunge etere etilico, la miscela viene centrifugata per poter separare la fase eterea (4 volte). Dopo anidificazione su Na_2SO_4 si svapora il solvente e si ottiene il lattone estereo non reagito (-)-**24** (740 mg, resa 66%, ee 25%). Si riduce il volume delle acque madri sotto vuoto ed a temperatura ambiente, successivamente si porta il pH a 2 con HCl 1M e si estrae con etere per centrifugazione. La fase organica viene lavata con H_2O ed anidrificata (Na_2SO_4). Si svapora il solvente e si ottiene una miscela di lattone acido (+)-**26** e idrossiacido **29** in rapporto 1:2 (180 mg, resa totale 19%)

Acido sin-3-etossicarbonil-4-idrossinonanoico 29: i dati spettroscopici di **29** sono dati separatamente per chiarezza anche se non è possibile separarlo da (+)-**26**. IR (film): 3508 (br, OH), 1738 (CO_2Et), 1720 (CO_2H); ^1H NMR (400MHz) δ 5.85 (2H, br, CO_2H e OH), 4.19 (2H, q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.82 (1H, m, CHOH), 2.96 (1H, m, CHCO_2Et), 2.85 (1H, dd, J 6.8, 16.6, CH_2COOH), 2.70 (1H, dd, J 3.4, 16.6, CH_2COOH), 1.42 (2H, m, CH_2), 1.27 (5H, m e t, CH_2 e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 0.87 (3 H, t, CH_3); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 177.2 (s), 174.9 (s), 71.8 (d), 61.7 (t), 46.5 (d), 34.7 (t), 32.9 (t), 32.5 (t), 25.4 (t), 22.5 (t), 14.0 (q), 13.9 (q).

La miscela 1:2 di (+)-**26** e **29** a riflusso in benzene in presenza di tracce di acido p-toluensolfonico (PTSA) dà una miscela 2:1 di (+)-**24** e (+)-**26**. Per poter separare i

prodotti, la miscela viene sciolta in etere e lavata (3 volte) con una soluzione satura di NaHCO_3 . Dopo anidificazione con Na_2SO_4 si svapora il solvente e si ottiene (+)-**24** (90 mg, resa 9%); ee 87%; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +73.0$ (c 1.1, CH_3CN).

Si acidificano le acque madri a pH 2, dopo estrazione con etere si ottiene il lattone acido (+)-**26**.

Acido (+)-cis-5-oxo-2-pentil-tetraidrofuran-3-carbossilico 26: (45 mg, resa 4.5%); p.f.: 102 °C (da etere di petrolio-acetato di etile); IR (CHCl_3): 3500 (br, OH), 1782 (C=O), 1710 (CO_2H); ^1H NMR (400MHz) δ 8.55 (1H, br, COOH), 4.66 (1H, q, H-5), 3.47 (1H, dt, J 4.9 e 8.3, H-4), 2.89 (1H, dd, J 4.9 e 17.6, H-3), 2.70 (1H, dd, J 8.3 e 17.6, H-3), 1.42 (2H, m, CH_2), 1.56 (1H,m), 1.43 (1H,m), 1.30 (4H, m), 0.89 (3H, t, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ : 175.8 (s), 174.8 (s), 80.2 (d), 44.1 (d), 31.8 (t), 31.3 (t), 31.2 (t), 25.5 (t), 22.4 (t), 13.9 (q); MS, m/z : 200 (M^+ , 0.8%), 182 (14), 154 (24), 140 (16), 129 (92), 101 (100), 100 (48), 73 (39), 55 (83); 48% ee; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +35.0$ (c 0.5, CH_3CN); CD: $\Delta\epsilon_{230} = -0.03$.

Il composto (-)-**24** (740 mg, 3.24 mmol), che possiede un e.e. del 25%, isolato con la reazione sopra descritta, viene idrolizzato con PLAP (750 mg) nelle condizioni summenzionate per 50 h. Dopo il solito procedimento, l'estere non reagito (-)-**24** (102 mg, resa del 14% dopo purificazione per flash chromatography) ha un ee del 96%; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -79.8$ (c 0.5, CH_3CN); $\Delta\epsilon_{224}$: +0.13. Il rimanente prodotto è costituito da una miscela 1:1 di (+)-**26** e **29**, (255 mg, resa totale 39%). Questi vengono separati come descritto sopra per dare (+)-**24** (102 mg, resa 14%), con e.e. del 46% e (+)-**26** (85 mg, resa 14%), con un e.e. del 22%.

3.8.3 Misura degli eccessi enantiomerici

L'eccesso enantiomerico dei prodotti (+)-**24** e (-)-**24** è stato determinato via HRGC chirale. I tempi di ritenzione di (-)-**24** e (+)-**24** sono 48 min e 52 min rispettivamente (γ -ciclodestrine; 150 °C isot.). L'ee del prodotto (+)-**26** è stato determinato via HRGC chirale dell'estere etilico (+)-**24**, ottenuto per esterificazione di (+)-**26** con etil ioduro e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU).⁸⁹

3.9 SINTESI DELL'ACIDO FASEOLINICO RACEMO (±)-28

Tutte le reazioni sui composti enantiomericamente puri sono state ripetute anche sulle miscele raceme, per poter valutare l'eccesso enantiomerico via HRGC chirale.

Il lattone (±)-**24** (0.6 g, 2.6 mmol) viene messo a riflusso in 50 ml di una miscela 2:1 di diossano e HCl 6N per 30 min. Svaporando il solvente si ottiene l'acido (±)-**26** (0.52 g, resa 98% dopo cristallizzazione da etere di petrolio-acetato di etile 9:1). In 30 min si aggiunge una soluzione di (±)-**26** (0.150 g, 0.75 mmol) in 1.4 ml di THF anidro al sodio bis(trimetilsilil)amide (1.65 ml, 1.65 mmol) (soluzione 1.0M in THF) a -78 °C sotto Ar.⁹³ La miscela viene mantenuta sotto agitazione a -78 °C per 1 h, poi si aggiunge lentamente metil ioduro (0.45 ml, 7.2 mmol) e si mantiene l'agitazione per altre due ore. Poi la miscela va portata a -20 °C, si aggiunge HCl 2N (8 ml) quindi si estrae tre volte con etere, la fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaCl e anidrificata su Na₂SO₄. Dopo aver svaporato il solvente si isola l'acido faseolinico racemo (±)-**28** (0.152 g, resa 95%) in miscela con il lattone non reagito (±)-**26** (5%). I due lattoni vengono separati dopo trasformazione nei corrispondenti esteri etilici (±)-**24** e (±)-**31** con etil ioduro e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)⁸⁹ e separazione per flash chromatography (eluenti: etil acetato-etere di petrolio, gradiente da 0% al 20%). L'acido faseolinico (±)-**28** viene poi recuperato per idrolisi acida in diossano del composto (±)-**31**.

Acido (2R,3R,4R)-4-metil-5-oxo-2-pentil-tetraidro-3-furancarbossilico 28*: p.f. 150-1 °C (da etere di petrolio-etil acetato); Anal. Elem.: trovato: C, 61.80, H, 8.42; calcolato C₁₁H₁₈O₄ C, 61.66, H, 8.47%; ¹H NMR (400MHz) δ 5.8 (1 H, bs, OH), 4.64 (1 H, dt, J = 8.3, 8.3, 5.4, H-2), 3.25 (1 H, dd, J = 9.3, 8.3, H-3), 2.90 (1 H, dq, J = 9.3, 6.8, H-4), 1.54 (2 H, m, 2 H-1'), 1.44 (1 H, m, H-2'), 1.34 (1 H, m, H-2'), 1.25 (4 H, m, 2 H-3', 2 H-4'), 1.16 (3H, d, J = 6.8, Me al C-3), 0.81 (3 H, bt, Me della catena); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 178.4 (s), 172.1 (s), 78.5 (d, C-2), 52.4 (d, C-3), 37.8 (d, C-4), 32.6 (t, C-3'), 32.3 (t, C-1'), 26.7 (t, C-2'), 23.6 (t, C-4'), 15.0 (q, Me al C-4), 14.7 (q, Me della catena).

Etil (2R,3R,4R)-4-metil-5-oxo-2-pentil-tetraidro-3-furancarbossilato 31*. L'estere (±)-**31** si isola come olio. IR (film) 1782, 1736 (C=O), 1200 (O-CO); ¹H NMR

(400MHz) δ 4.66 (1 H, ddd, $J = 10.0, 8.3, 3.4$, H-2), 4.23 (2 H, q, $J = 7.3$, OCH_2CH_3), 3.17 (1 H, dd, $J = 9.8, 8.3$, H-3), 3.05 (1 H, dq, $J = 9.8, 7.3$, H-4), 1.52 (2 H, m, H-1', H-2'), 1.42 (1 H, m, H-1'), 1.40 - 1.20 (11 H, d, t, m, 2 Me, H-2', 2 H-3', 2 H-4'), 1.30 (t, $J = 7.3$, OCH_2CH_3), 1.29 (d, $J = 7.3$, Me al C-4), 0.88 (3 H, bt, Me della catena); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 177.6 (s), 169.5 (s), 77.4 (d, C-2), 61.2 (t, OCH_2CH_3), 51.6 (d, C-3), 36.2 (d, C-4), 31.2 (t, C-3'), 30.9 (t, C-1'), 25.1 (t, C-2'), 22.2 (t, C-4'), 14.3 (q, Me al C-4), 14.0 (q, OCH_2CH_3), 13.7 (q, Me della catena); MS, m/z : 243 (MH^+ , 0.8), 242 (M^+ , 0.5), 214 ($[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$, 0.8), 196 (14), 195 (13), 183 (13), 171 (77), 169 (40), 143 (100), 142 (27), 127 (18), 115 (60), 99 (34), 97 (79), 95 (20), 87 (55), 83 (23), 81 (19), 71 (23), 69 (98), 55 (70).

3.9.1 Risoluzione cinetica dell'estere etilico dell'acido faseolinico (\pm)-31

Ad una soluzione del lattone (\pm)-31 (0.460 g, 1.9 mmol), in tampone fosfato (0.1M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 5.0 ml), si aggiunge la PLE (*Pig liver esterase*, 170 unit /mg, Sigma, 0.10 ml). Il valore del pH viene mantenuto attorno a 7.5 per addizione continua di NaOH 1N. Dopo 2 h (conversione 20%), si estrae la miscela con etere etilico. Dopo la normale procedura, si ottiene il lattone (-)-31 (0.271 g, resa 59%) con un e.e. del 32%. La fase acquosa viene acidificata a pH 2 con HCl 1N ed estratta pi  volte con etere etilico. Si ottiene l'acido (+)-28 (0.061 g, resa 15%), p.f. 141-2  C (da etere di petrolio-acetato di etile); $[\alpha]_D^{25} = +111.4$ (c 0.22, CHCl_3); $\Delta\varepsilon_{220} = -2.0$, diossano; 94% ee.

La risoluzione cinetica di (\pm)-31 (0.460 g, 1.9 mmol), condotta nelle stesse condizioni per 10 h, consente di ottenere l'acido (+)-28 (0.142 g, resa 35%) con un e.e. del 47% e l'estere (-)-31 (0.161 g, resa 35%) con un e.e. del 96%; $[\alpha]_D^{25} = -90.4$ (c 0.23, CHCl_3), $\Delta\varepsilon_{219} = +2.3$, diossano, $[\alpha]_D^{25} -98.3$ (c 0.24, CH_3CN), $\Delta\varepsilon_{218} = +1.8$, CH_3CN .

L'estere (-)-31 (0.100 g, 0.40 mmol) viene idrolizzato in diossano a riflusso (4.5 ml) in presenza di HCl 6N (2.2 ml) per 30 min. Dopo aver svaporato il diossano le acque madri vengono trattate con una soluzione di NaHCO_3 ed estratte con etere. La soluzione basica viene trattata con HCl 6N fino a pH 2 ed estratta con etere. Dopo la normale procedura, svaporando il solvente si ottiene un solido (0.080 g, resa 91%) che viene cristallizzato con etere di petrolio-acetato di etile, (-)-28, p.f. 140-1  C, $[\alpha]_D^{25} = -112.3$ (c

0.26, CHCl_3), $\Delta\varepsilon_{219} = +2.2$, diossano, e.e. 99% [Lett.⁸⁸: p.f. 139-40 °C, $[\alpha]_{\text{D}} = -150$ (c 0.2, CHCl_3); lett.^{90a}: p.f. 138-40 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -142$ (c 0.22, CHCl_3); lett.^{90b}: p.f. 137-8 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -147$ (c 0.37, CHCl_3)].

3.9.2 Conversione dell'acido faseolinico (-)-28 nel butenolide (-)-30

Si aggiunge lentamente l'acido faseolinico (-)-28 (0.15 g, 0.7 mmol) in THF (1.6 ml) ad una soluzione di LDA (1.8 mmol) (soluzione in cicloesano 1.5M) in THF anidro (2 ml) a -78 °C sotto Ar. La miscela va mantenuta sotto agitazione a -78 °C per 3h, poi si aggiunge una soluzione di HMPA (1.5 ml), fenilselenil cloruro (1.60 g, 8.3 mmoli) in THF (27 ml). La miscela va mantenuta sotto agitazione per altre 2 h a -78 °C, poi la temperatura va portata a -20 °C e si aggiunge HCl 2N. La soluzione viene estratta quattro volte con etere. La fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaCl ed estratta con una soluzione satura di NaHCO_3 . La soluzione basica viene acidificata con HCl 6N ed estratta più volte con etere etilico. Si svapora il solvente e si ottiene una miscela di reazione semisolida (0.140 g) che viene sciolta in THF e mantenuta sotto agitazione a 0 °C. Si aggiungono acido acetico glaciale (4 gocce) e acqua ossigenata al 30% (2.0 ml). Dopo 1 h a 0 °C, si aggiunge HCl 2N e la miscela viene estratta tre volte con etere. La miscela di reazione viene esterificata con diazometano e si ottiene un olio (0.140 g) che risulta essere costituito dal butenolide (-)-30 (75%), dall'estere metilico del lattone non reagito (-)-35 (15%) e da una piccola quantità di lattone tutto-*cis* (-)-36 (10%). La separazione per flash chromatography (eluente: etil acetato-etere di petrolio gradiente da 0 a 10%) permette di isolare il butenolide (-)-30 (0.060 g, resa 37%), l'estere metilico del lattone (-)-35 ed il lattone tutto-*cis* (-)-36.

(2S)-(-)-Metil 2,5-diidro-4-metil-5-oxo-2-pentil-3-furancarbossilato 30: olio; IR (film) 1767, 1722, 1664, 1228; ^1H NMR (400MHz) δ 5.07 (1 H, ddq, $J = 2.2, 2.2, 7.8$, H-2), 3.86 (3 H, s, OMe), 2.16 (3 H, d, $J = 2.2$, Me al C-4), 2.05 (1 H, m, H-1'), 1.53 (1 H, m, H-1'), 1.37 (2 H, m, 2 H-2'), 1.23 (4 H, m, 2 H-3', 2 H-4'), 0.85 (3 H, bt, Me della catena); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 172.8 (s), 162.6 (s), 147.5 (s), 137.3 (s), 81.3 (d, C-2), 52.2 (q, OMe), 32.69 (t C-1'), 31.3 (t, C-3'), 24.3 (t, C-2'), 22.3 (t, C-4'), 13.8 (q, Me della catena), 10.7 (q, Me al C-4); MS, m/z : 227 (MH^+ , 0.4), 226 (M^+ , 0.5), 197 ($[\text{M}-$

$C_2H_5]^+$, 60), 156 ($[M-C_5H_{10}]^+$, 100), 128 (45), 127 (37), 124 (52), 123 (31), 99 (36), 71 (31), 67 (43), 55 (23), 43 (62); $[\alpha]_D^{25} = -47.5$ (c 0.12, CH_3CN), $\Delta\epsilon_{256} = -0.6$, $\Delta\epsilon_{225} = +2.5$, CH_3CN , e.e. 94%; HRGC (γ -ciclodestrine; 120 °C per 2 min, 3 °C/min fino a 150 °C per 40 min) t_R 33.55 min per (-)-**3**, 30.13 min per (+)-**3**

(2S,3S,4S)-(-)-Metil 4-metil-5-oxo-2-pentil-tetraidro-3-furancarbossilato 35: olio; IR (film) 1780, 1735 (C=O), 1205 (O-CO); 1H NMR (400MHz) δ 4.65 (1 H, ddd, $J = 10.5, 8.3, 3.4$, H-2), 3.68 (3H, s, OMe), 3.17 (1 H, dd, $J = 9.8, 8.3$, H-3), 3.04 (1 H, dq, $J = 9.8, 7.3$, H-4), 1.45 (2 H, m, H-1', H-2'), 1.32 (2 H, m, H-1', H-2'), 1.25 - 1.15 (7 H, m e d, Me, 2 H-3', 2 H-4'), 1.30 (d, $J = 7.3$, Me al C-4), 0.90 (3 H, bt, Me della catena); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 177.6 (s), 170.2 (s), 77.5 (d, C-2), 52.3 (q, OMe), 51.7 (d, C-3), 36.3 (d, C-4), 31.3 (t, C-3'), 31.2 (t, C-1'), 25.2 (t, C-2'), 22.4 (t, C-4'), 14.4 (q, Me al C-4), 13.9 (q, Me della catena); $[\alpha]_D^{25} = -81.7$ (c 0.30, CH_3CN).

(2S,3S,4R)-(-)-Metil 4-metil-5-oxo-2-pentil-tetraidro-3-furancarbossilato 36: l'estere (-)-**10** viene isolato come un olio; IR (film) 1780, 1730; 1H NMR (400MHz) δ 4.34 (1H, dt, $J = 5.4, 5.4, 7.8$ Hz, H-2), 3.68 (3 H, s, OMe), 3.25 (1H, dd, $J = 5.4, 7.8$, H-3), 2.83 (1 H, quintetto apparente, $J = 7.3$, H-4), 1.70 (1 H, m, H-1'), 1.50 (2 H, m, H-1', H-2'), 1.35 (1 H, m, H-2'), 1.25 (4 H, m, 2 H-3', 2 H-4'), 1.18 (3 H, d, $J = 7.3$, Me al C-4), 0.83 (3 H, bd, Me della catena); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 177.0 (s), 170.0 (s), 78.1 (d, C-2), 51.7 (q, OMe), 50.7 (d, C-3), 39.1 (d, C-4), 31.4 (t, C-3'), 30.9 (t, C-1'), 25.5 (t, C-2'), 22.4 (t, C-4'), 13.9 (q, Me della catena), 10.3 (q, Me al C-4); $[\alpha]_D^{25} = -45.3$ (c 0.23, CH_3CN); $\Delta\epsilon_{219} = -0.93$, e.e. 99%.

3.9.3 Conversione del lattone trans (-)-**25** nel butenolide (-)-**30**

Il lattone (-)-**25**^{66a} (0.100 g, 0.5 mmol) viene metilato seguendo la procedura descritta per la metilazione⁹³ del lattone *cis* **26**. La miscela di reazione grezza ottenuta (0.096 g, resa 96%) contiene il lattone non reagito (-)-**25** (8%) ed il metil lattone (-)-**37** (92%). Poichè non possono essere separati, le reazioni seguenti vengono condotte sulla miscela di (-)-**25** e (-)-**37**. Questa miscela (0.096 g) in THF anidro (1.0 ml) viene aggiunta sotto agitazione ad una soluzione di sodio bis(trimetilsilil)amide (0.8 ml, 0.8 mmol) (soluzione

in THF 1.0 M) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ sotto Ar. Dopo 1 h, si aggiunge cloruro di fenilselenio (0.70 g, 3.6 mmoli) in THF (12 ml). La miscela viene mantenuta sotto agitazione per 1.5 h a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, poi la temperatura viene portata a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e si aggiunge HCl 2N. La soluzione viene estratta quattro volte con etere. La fase organica viene lavata con una soluzione satura di NaCl e estratta più volte con una soluzione satura di NaHCO_3 . La soluzione basica viene acidificata fino a pH 2 e estratta con etere. Il grezzo di reazione (0.095 g) viene sciolto in THF (5 ml) e vi si aggiunge acido acetico glaciale (2 gocce) ed acqua ossigenata al 30% (1.0 ml). La miscela ottenuta, esterificata con diazometano, dà un olio (0.060 g) che risulta essere costituito da (-)-**30** e (-)-**38** (1:2), vengono individuate tracce del lattone (-)-**25** nello spettro ^1H NMR della miscela grezza di reazione. La separazione per flash chromatography (eluente: etil acetato-etere di petrolio gradiente da 0% a 6%) permette di ottenere il lattone saturo (-)-**38** (0.040 g, resa 35%) ed il lattone insaturo (-)-**30** (0.020 g, resa 18%)

(2S,3R,4R)-(-)-Metil 4-metil-5-oxo-2-pentil-tetraidro-3-furancarbossilato 38: olio; IR (film) 1782, 1736; ^1H NMR (400MHz) δ 4.35 (1H, ddd, $J = 3.9, 8.3, 9.3$ Hz, H-2), 3.77 (3 H, s, OMe), 2.94 (1 H, dq, $J = 6.8, 11.2$, H-4), 2.64 (1H, dd, $J = 9.3, 11.2$, H-3), 1.70 (1 H, m, H-1'), 1.61 (1 H, m, H-1'), 1.52 (1H, m, H-2'), 1.38 (1H, m, H-2'), 1.33-1.17 (7 H, m e d, 2 H-3', 2 H-4', Me al C-4), 1.31 (d, $J = 6.8$, Me al C-4), 0.88 (3 H, bd, Me della catena); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ 176.8 (s), 171.2 (s), 79.6 (d, C-2), 54.2 (d, C-3), 52.6 (q, OMe), 39.9 (d, C-4), 34.8 (t, C-1'), 31.3 (t, C-3'), 24.9 (t, C-2'), 22.4 (t, C-4'), 14.4 (q, Me al C-4), 13.9 (q, Me della catena); MS, m/z : 229 (MH^+ , 0.7), 197 (6), 157 (45), 129 (77), 102 (100), 97 (45), 69 (90); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -36.7$ (c 0.15, CH_3CN); $\Delta\varepsilon_{220} = -1.1$, CH_3CN ; e.e. 94%.

3.10 PROCEDIMENTO GENERALE PER LA SINTESI DEI CICLOBUTANI

Ad una soluzione di dietilmaleato (fumarato) (0.012mol) in acetonitrile anidro a 25°C viene aggiunta una soluzione di 1-morfolinocicloalchene **43** o **44** (0.012mol) nello stesso solvente. Dopo 3 giorni la miscela di reazione viene trattata secondo il metodo di Brannock⁹⁸ per dare i corrispondenti ciclobutani **45** e **46** (resa 70 %).

Dietil *r-1-morfolino-c-5H-biciclo.[3.2.0]eptano-c-6,t-7-dicarbossilato 45:* olio. IR (film): 1724 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.07 (4H, 2q, J 7.3, OCH₂CH₃), 3.60 (4H, t, J 4.6, CH₂OCH₂), 3.52 (1H, d, J 8.3, H-7), 2.76 (1H, dd, J₁ 8.3, J₂ 6.3, H-6), 2.67 (1H, m, H-5), 2.58 (2H, m, CH₂N), 2.37 (2H, m, CH₂N), 1.76 (2H, m, ciclopentano), 1.56 (4H, m, ciclopentano), 1.16 (6H, 2t, J 7.1, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (100.4MHz) δ: 173.7 (s), 171.3 (s), 72.6 (s), 66.9 (t), 60.5 (t), 47.0 (2t), 43.5 (2d), 36.4 (d), 31.0 (t), 29.8 (t), 24.9 (t), 14.1 (q).

Dietil *r-1-morfolino-c-6H-biciclo.[4.2.0]ottano-c-7,t-8-dicarbossilato 46:* olio. IR (film): 1724 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.07 (4H, 2q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.60 (4H, m, CH₂OCH₂), 3.08 (1H, d, J 10.0, H-8), 2.92 (1H, t, J 10.0, H-7), 2.62 (2H, m, CH₂N), 2.52 (2H, m, CH₂N), 2.40 (1H, m, H-6), 1.93 (1H, m), 1.66-1.39 (4H, m), 1.36-1.15 (3H, m), 1.18 (6H, 2t, J 7.1, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (100.4MHz) δ: 173.5 (s), 171.2 (s), 67.4 (t), 61.6 (s), 60.4 (t), 47.5 (d), 47.0 (t), 40.0 (d), 35.7 (d), 24.8 (t), 23.8 (t), 22.1 (t), 20.8 (t), 14.1 (q).

3.11 SINTESI GENERALE DEI CHETONI 47 E 48

Si mantiene sotto agitazione a temperatura ambiente una sospensione del ciclobutano (1.0g) in 5 ml di tampone (KH₂PO₄/Na₂HPO₄ 0.1M, pH 7.4); il valore di pH viene mantenuto tra 7.4 e 7.8 per addizione continua di HCl 1M. Quando il pH non aumenta più la fase acquosa viene estratta tre volte con etere etilico, la fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄; l'evaporazione del solvente da il chetone *unlike a* (resa 85÷95 %), con un eccesso diastereoisomerico del 70% nel caso del composto **47a** e del 94% nel caso del chetone **48a**.

Etere etilico dell'acido (1*S*,1'*R*')*-(2-oxociclopentil)-butandioico 47a: olio; ¹H NMR (400MHz) δ 4.14 (4H, 2q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.41 (1H, dt, J₁ 8.3, J₂ 5.6, CHCO₂Et), 2.81 (1H, dd, J₁ 8.3, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.62 (1H, dd, J₁ 6.3, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.35 (2H, m, ciclopentano), 2.23 (1H, m, CHCO), 2.09 (2H, m, ciclopentano), da 1.80 a 1.69 (2H, m, ciclopentano), 1.26 (6H, 2t, J 7.3, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 217.8 (s), 172.4 (s), 171.5 (s), 60.8 (t), 60.6 (t), 49.7 (d), 40.8 (d), 37.8 (t), 34.5 (t), 26.2 (t), 20.4 (t), 14.0 (q).

Estere etilico dell'acido (1S,1'R)*-(2-oxocicloesil)-butandioico 48a: olio; HRGC (Carbowax, 200°C isot.) t_R 26.17min; IR (film) 1735 (CO₂Et), 1711 (C=O); ¹H NMR (400MHz) δ 4.14 (4H, 2q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.16 (1H, ddd, J₁ 4.4, J₂ 6.8, J₃ 9.3, CHCO₂Et), 2.81 (1H, dd, J₁ 9.3, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.78 (1H, m, CHCO), 2.48 (1H, dd, J₁ 4.4, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.40 (1H, m, H-6eq), 2.32 (1H, m, H-6ax), 2.07 (1H, m, H-5), 2.02 (1H, m, H-3), 1.91 (1H, m, H-4), 1.66 (2H, m, H-5, H-4), 1.56 (1H, m, H-3), 1.25 (6H, 2t, J 7.1, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 210.0 (s), 173.5 (s), 172.0 (s), 60.5 (t), 60.4 (t), 51.6 (d), 41.9 (t), 41.1 (d), 33.7 (t), 31.1 (t), 27.3 (t), 24.8 (t), 14.1 (q), 14.0 (q).

Se l'idrolisi viene condotto in EtOH ed HCl 4M si ottiene una miscela, inseparabile per flash chromatography, dei chetoni *unlike a* ed *like b* in rapporto 1:1.

Gli spettri NMR sono stati condotti sulla miscela di diastereoisomeri ma i singoli segnali, quando è possibile, vengono dati separatamente.

Estere etilico dell'acido (1R,1'R)*-(2-oxociclopentil)-butandioico 47b: olio; ¹H NMR (400MHz) δ 4.14 (4H, 2q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.30 (1H, dt, J₁ 4.7, J₂ 9.3, CHCO₂Et), 2.74 (1H, dd, J₁ 9.3, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.56 (1H, m, CHCO), 2.41 (1H, dd, J₁ 4.7, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et) il resto della spettro è comune a quello del chetone *unlike*; ¹³C NMR, δ 217.7 (s), 173.8 (s), 171.9 (s), 60.8 (t), 60.6 (t), 50.1 (d), 40.1 (d), 37.8 (t), 32.7 (t), 26.2 (t), 20.4 (t), 14.0 (q).

Estere etilico dell'acido (1R,1'R)*-(2-oxocicloesil)-butandioico 48b: HRGC (Carbowax, 200°C isot.) t_R 25,27min; IR (film) 1735 (CO₂Et), 1711 (C=O); ¹H NMR (400MHz) δ 4.14 (4H, 2q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.28 (1H, dt, J₁ 4.4, J₂ 9.0, CHCO₂Et), 2.82 (1H, m, CHCO) 2.68 (1H, dd, J₁ 9.0, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.50 (1H, dd, J₁ 4.4, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et) il resto della spettro è comune a quello del chetone *unlike*; ¹³C NMR (100.4MHz) δ 209.9 (s), 174.3 (s), 172.3 (s), 60.5 (q), 60.4 (q), 51.3 (d), 41.8 (t), 40.1 (d), 32.5 (t), 29.8 (t), 27.2 (t), 25.0 (t), 14.1 (q), 14.0 (q).

3.12 SINTESI DEI γ -LATTONI BICILICI

Ad una soluzione di chetone (7.0 mmol) in etanolo (4 ml) si aggiunge NaBH₄ (3.5

mmol), in un periodo di cinque minuti. Dopo 4h si aggiunge acqua e si estrae la fase acquosa con etere etilico. La fase organica viene lavata con una soluzione di NaCl satura; si anidrifca su Na₂SO₄ e si svapora il solvente e si procede all'analisi del grezzo.

3.12.1 Riduzione del chetone 48a

La riduzione con NaBH₄ del chetone *unlike* 48a ha fornito una miscela di lattoni 53 e 54 (resa 81 %) in rapporto 85:15, la purificazione per flash chromatography (eluente: etil acetato-etere di petrolio gradiente da 0% al 20%) consente di ottenere in quantità rilevante solo il lattone 53 (resa 38%).

Etil (1R,3aS,7aS)-ottaidro-2-oxo-benzofuranacetato 53*: olio; HRGC (Carbowax, 200°C isot.) t_R 30.64min; IR (film) 1776 (O-C=O), 1734 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ: 4.46 (1H, m, CHO), 4.13 (2H, q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.15 (1H, ddd, J₁ 4.9, J₂ 5.9, J₃ 10.3, CHCO), 2.76 (1H, dd, J₁ 4.9, J₂ 17.1, CH₂CO₂Et), 2.45 (1H, m, H-7a), 2.40 (1H, dd, J₁ 10.3, J₂ 17.0, CH₂CO₂Et), 2.20 (1H, m, H-4eq), 1.70 (1H, m, H-6eq), 1.55 (3H, m, H-7eq, H-4ax, H-5eq), 1.33 (1H, m, H-5ax), 1.23 (3H, t, J 7.1, CH₃), 1.16 (1H, m, H-6ax), 0.94 (1H, m, H-7ax). ¹³C NMR (100.4MHz) δ 177.7 (s), 171.5 (s), 77.6 (d), 60.8 (t), 44.3 (d), 37.9 (d), 29.3 (t), 27.3 (t), 23.0 (t), 22.9 (t), 19.5 (t), 14.1 (q); MS m/z: 226 (M⁺, 11%), 208 (13), 181 (64), 163 (28), 152 (20), 146 (34), 136 (100), 128 (17), 118 (13), 109 (33), 108 (48), 96 (92), 94 (94), 88 (41), 81 (98), 79 (68), 70 (27), 67 (91).

Etil (1R,3aR,7aS)-ottaidro-2-oxo-benzofuranacetato 54*: olio; HRGC (Carbowax, 200 °C isot.) t_R 32.12min; IR (film) 1776 (O-C=O), 1734 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.13 (2H, q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.91 (1H, dt, J₁ 4.4, J₂ 10.8, CHO), 2.79 (2H, d, J 8.2, CH₂CO₂Et), 2.63 (1H, dt, J₁ 8.2, J₂ 10.6, CHCO), 2.15 (1H, m, anello), 1.87 (2H, m, anello), 1.72 (2H, m, H-7a+H-anello), 1.47 (1H, m, anello), 1.30 (2H, m, anello), 1.23 (3H, t, J 7.1, CH₃), 1.12 (1H, m, anello); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 173.1 (s), 169.4 (s), 81.6 (d), 60.9 (t), 43.5 (d), 41.5 (d), 32.3 (t), 32.2 (t), 29.3 (t), 24.8 (t), 23.9 (t), 14.1 (q);

3.12.2 Riduzione della miscela di chetoni like e unlike

3.12.2.1 Riduzione della miscela 47a e 47b

La riduzione con NaBH₄ di 1.0 g della miscela 1:1 di **47a** e **47b** ha portato all'ottenimento dei lattoni **59** e **62** in rapporto 1:1.

Non è stato possibile separare per flash chromatography i lattoni **59** e **62**. Gli spettri NMR sono stati condotti sulla miscela di diastereoisomeri. Non è stato possibile dare separatamente i singoli segnali.

Etil (1R,3aS,6aS)-2H-esaidro-2-oxo-ciclopenta[b]furanacetato 59 e Etil (1S,3aS,6aS)*-2H-esaidro-2-oxo-ciclopenta[b]furanacetato 62*: IR (film) 1776 (O=C=O), 1734 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.97 (0.5H, m, CHO), 4.89 (0.5H, m, CHO), 4.14 2H, q, J 7.1, OCH₂CH₃), 3.26 (0.5H, m, CHCO), da 2.94 a 2.58 (3H, anello lattonico), 2.41 (0.5H, dd, CH₂CO₂Et), da 1.98 a 1.89 (2H, m, anello), da 1.71 a 1.63 (4H, m, anello), 1.23 (3H, t, CH₂CH₃); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 178.9 (s), 177.3 (s), 171.4 (s), 171.0 (s), 84.8 (d), 84.6 (d), 60.9 (t), 60.8 (t), 44.2 (d), 43.7 (d), 43.0 (d), 40.3 (d), 35.8 (t), 33.3 (t), 32.5 (t), 31.6 (t), 25.9 (t), 24.2 (t), 23.2 (t), 14.0 (q).

3.12.2.2 Riduzione della miscela 48a e 48b

La riduzione con NaBH₄ di 1.0 g della miscela 1:1 di **48a** e **48b** ha portato, dopo 4 h, all'ottenimento dei lattoni **53**, **54**, **56** (41%, 8% e 41% rispettivamente).

Non è stato possibile separare per flash chromatography i lattoni **53** e **56**. Gli spettri NMR sono stati condotti sulla miscela di diastereoisomeri ma i singoli segnali vengono dati separatamente.

Etil (1S,3aR,7aS)-ottaidro-2-oxo-benzofuranacetato 56*: olio; HRGC (Carbowax, 200 °C isot.) t_R 28.49min; IR (film) 1776 (O=C=O), 1734 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.13 (2H, q, J 7.1, OCH₂CH₃), 2.86 (2H, dd, J₁ 4.9, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.77 (1H, m, CHCO), 2.46 (1H, dd, J₁ 7.8, J₂ 16.6, CH₂CO₂Et), 2.25 (1H, m, anello), 1.87 (2H, m, anello), 1.77 (1H, m, anello), 1.71 (1H, m, H-7a), 1.52 (1H, m, anello), 1.36 (1H, m, anello), 1.31 (2H, m, anello), 1.23 (3H, t, J 7.1, CH₃), ¹³C NMR (100.4MHz) δ 177.7 (s), 171.7 (s), 82.9 (d), 60.8 (t), 50.0 (d), 43.0 (d), 32.7 (t), 30.0 (t), 27.5 (t), 25.1 (t),

23.9 (t), 14.1 (q).

3.13 IDROLISI ENZIMATICA DELL' ETIL (1R,3aS,7aS)*- OTTAIDRO-2-OXO-BENZOFURANACETATO 53

L'idrolisi del lattone (\pm)-**53** viene condotta secondo il procedimento generale già descritto nel paragrafo 3.7.

3.13.1 Idrolisi enzimatica dell'etil (1R,3aS,7aS)*-ottaidro-2-oxo-benzofuran-acetato 53 con HLAP

Ad una sospensione di (\pm)-**53** (0.4g, 1.77mmol) in 8ml di tampone $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (pH 7.4) si aggiungono 350mg di HLAP (200mg/mmol) a temperatura ambiente e sotto vigorosa agitazione.

Dopo 30h si segue la procedura già descritta. Si ottengono: l'estere non reagito (-)-**53** (165mg, resa 41 %, e.e 85 %.); $[\alpha]_D^{25} = -49,3$ (c 0.2, MeOH); HRGC (DMePeBETACDX, 120°C per 20min, 3°C/min fino a 150°C per 50min) t_R 81.93min per (+)-**53**, 82.65min per (-)-**53** e l'acido racemo **63** (160mg, resa 45%)

Acido (1R,3aS,7aS)-ottaidro-2-oxo-benzofuran-acetico 63*: p.f. 104-5°C (da etere di petrolio-acetato di etile); Anal. Elem.; trovato C, 59.80, H, 7.06; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ calcolato: C, 60.59, H, 7.12%); IR (CHCl_3) 1761 (CO_2H), 1714 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR (400MHz) δ : 10.40 (1H, br, CO_2H), 4.51 (1H, m, CHO), 3.18 (1H, dt, J_1 5.6, J_2 9.8, CHCO), 2.88 (1H, dd, J_1 4.9, J_2 17.6, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 2.51 (1H, dd, J_1 9.3, J_2 17.6, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 2.48 (1H, m, H-7a), 2.26 (1H, m), 1.76 (1H, m), 1.61 (3H, m), 1.38 (1H, m), 1.19 (1H, m), 1.00 (1H, m); ^{13}C NMR (100.4MHz) δ : 177.8 (s), 176.9 (s), 77.9 (d), 44.2 (d), 37.9 (d), 29.2 (t), 27.3 (t), 23.0 (t), 22.9 (t), 19.5 (t); MS, m/z: 180 (M- H_2O , 7 %), 152 (9), 136 (26), 119 (8), 108 (12), 98 (7), 95 (38), 94 (100), 93 (10), 91 (9), 82 (12), 81 (62), 79 (51), 67 (53).

3.13.2 Idrolisi enzimatica dell'etil (1R,3aS,7aS)*- ottaidro-2-oxo-benzofuranacetato 53 con Lipozyme

L'idrolisi di (\pm)-**53** (0.4g, 1.77mmol) con Lipozyme viene condotta usando 318mg dell'enzima immobilizzato (180mg/mmol) nelle stesse condizioni descritte sopra per

l'idrolisi con HLAP. Dopo 6 h si sono aggiunti 0.25 eq di NaOH 1 N quindi l'idrolisi viene bloccata. La procedura già descritta fornisce il lattone non reagito (+)-**53** (200mg, resa 50%, e.e. 14%) e l'acido (-)-**63** (35mg, resa 11%, 84% e.e); $[\alpha]_D^{25} -69.6$ (*c* 0.1, MeOH); $\Delta\varepsilon_{216} = -0.63$ (MeOH); p.f. 84°C (da etere di petrolio-acetato di etile). L'idrolisi di (+)-**53** (e.e. 14%), (200mg, 0.88mmol), con 150mg di Lipozyme condotta per 72 h, fornisce (+)-**53** (60mg, resa 30 %) con e.e. del 98%; $[\alpha]_D^{25} + 41$ (*c* 0.36, MeOH); $\Delta\varepsilon_{215} = +0.46$ (MeOH) e l'acido (-)-**63** (58mg, resa 33 %) con e.e. del 55 %.

3.13.3 Idrolisi enzimatica dell'etil (1R,3aS,7aS)*-ottaidro-2-oxo-benzofuranacetato **53** con lipasi da *Candida antarctica*

L'idrolisi di (±)-**53** (0.4g, 1.77mmol) con la lipasi da *Candida antarctica* B viene condotta usando 18mg di enzima (10mg/mmol). Dopo 2 h (20% di conversione) la reazione viene bloccata per aggiunta di etere etilico. La normale procedura fornisce l'estere (+)-**53** (260mg, resa 65%) con un e.e. del 27% e l'acido (-)-**63** (38mg, resa 11%) con un e.e. del 76%.

L'estere (+)-**53** recuperato al 20% di conversione (260mg, 1.15mmol) viene rimesso ad idrolizzare con CAL-B (10mg) per altre 9 h. Si ottiene l'acido (-)-**63** (79mg, resa 35%) con un e.e. del 51% e l'estere (+)-**53** (114mg, resa 44%) con un e.e. del 92%.

3.14 SINTESI DEL (-)-(3aS,7aS)-CIS-ESAIDRO-3-METILENE-2(3H)-BENZOFURANONE **64**

3.14.1 Metodo A

L'acido (-)-**63** con un e.e. del 84% e.e. viene decarbossilato con $Pb(OAc)_4$ in accordo con la letteratura¹⁰³ per dare (-)-**64**, e.e. 84 %; HRGC (γ -Ciclodestrine, 120°C per 20min, 3°C/min fino a 150°C per 30min) t_R 37.92min per (-)-**64**, t_R 33.20min per (+)-**64**; i dati IR ed 1H NMR sono uguali a quelli riportati in letteratura⁹³; ^{13}C NMR, δ : 171.0 (s), 139.8 (s), 119.8 (t), 76.7 (d), 39.5 (d), 28.8 (t), 26.2 (t), 21.1 (t), 20.5 (t).

3.14.2 Metodo B

3.14.2.1 Riduzione con baker's yeast del composto 66

Si aggiungono 3mmol di chetoestere **66** al lievito da panettiere (30g) in 60ml d'acqua (preincubata per 30min a 50°C) e la miscela viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente sotto atmosfera di N₂. L'andamento della reazione viene seguito ogni 48h via HRGC. La riduzione porta all'ottenimento, dopo 10 giorni, con una conversione del 78%, di una miscela di alcoli **67** e **68** in rapporto 43:57 rispettivamente, accanto al chetoestere non reagito (-)-**66**.

I composti (-)-**66**, *cis*-**68**, e *trans* (+)-**67** vengono separati per flash chromatography.

Etil (-)-(R)-2-oxo-cicloesanoacetato 66: 36 % e.e. (γ -ciclodestrine); $[\alpha]_D^{25}$ -4.8 (c 0.21, MeOH); CD: $\Delta\epsilon_{286} = +0.05$ (MeOH).

Etil (1S,2S)-cis-2-idrossi-cicloesanoacetato 68. (in miscela con il 20% del corrispondente lattone **11**): IR (film) 3410 (OH), 1735 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.06 (2H, q, J 7.3, OCH₂CH₃), 3.81 (1H, m, W_H 11.4, H-1), 2.40 (1H, dd, J₁ 7.8, J₂ 15.1, H-1'), 2.18 (1H, dd, J₁ 6.8, J₂ 15.1, H-1'), 2.14 (1H, bs, OH), 1.94 (1H, m, H-2), 1.65 (1H, m, H-6eq), 1.55 (3H, m), 1.40 (3H, m), 1.21 (1H, m), 1.18 (3H, t, J 7.3, OCH₂CH₃); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 173.7 (s), 68.9 (t), 60.2 (d, C-1), 38.2 (d, C-2), 36.8 (t, C-1'), 32.4 (t, C-6), 26.8 (t, C-5), 24.4 (t, C-4), 20.4 (t, C-3), 14.1 (q); MS, *m/z*: 168 ([M-H₂O]⁺, 2), 141 ([M-OEt]⁺, 5), 112 (10), 99 (14), 98 (20), 97 (20), 96 (24), 84 (13), 83 (15), 81 (100), 79 (27), 70 (14), 69 (12), 68 (48), 67 (72), 57 (13), 55 (55), 54 (26), 53 (21); e.e. >99 % (γ -ciclodestrine).

Etil (+)-(1R,2S)-trans-2-idrossi-cicloesanoacetato 67: IR (film) 3410 (OH), 1735 (CO₂Et); ¹H NMR (400MHz) δ 4.07 (2H, q, J 7.3, OCH₂CH₃), 3.15 (1H, dt, J₁=J₂ 9.8, J₃ 4.4, H-1), 2.59 (1H, dd, J₁ 5.9, J₂ 15.1, H-1'), 2.12 (1H, dd, J₁ 6.6, J₂ 15.1, H-1'), 1.92 (1H, m, H-6eq), 1.67 (3H, m, H-2), 1.57 (1H, m), 1.19 (3H, m), 1.19 (3H, t, J 7.3, OCH₂CH₃), 1.05 (1H, m, H-5eq); ¹³C NMR (100.4MHz) δ 174.1 (s), 74.6 (d), 60.3 (t), 42.4 (d), 38.6 (t), 35.7 (t), 31.4 (t), 25.4 (t), 24.8 (t), 14.1 (q); MS, *m/z*: 186 (M⁺, 0.4), 168 ([M-H₂O]⁺, 10), 141 ([M-OEt]⁺, 19), 140 (12), 123 (25), 122 (20), 112 (27), 101 (18), 99 (39), 98 (48), 97 (32), 96 (21), 95 (27), 94 (31), 93 (12), 88 (14), 84 (17), 83

(26), 81 (64), 80 (13), 79 (36), 73 (22), 70 (25), 69 (20), 68 (37), 67 (100), 66 (12), 61 (11), 60 (11), 57 (41), 56 (11), 55 (71), 54 (20), 53 (26); e.e. >99 %; $[\alpha]_D^{25} + 29.0$ (c 0.13, MeOH); CD: $\Delta\epsilon_{214} = -0.42$ (MeOH).

3.14.2.2 Lattonizzazione del *cis* 68

La miscela alcol 68 – lattone 65, a refluxo in benzene con acido *p*-toluensolfonico (tracce) per 1 h, fornisce il corrispondente *(-)-(3aS,7aS)-cis-esaidro-2-(3H)-benzofuranone (-)-65*: i dati spettroscopici ed ottici corrispondono a quelli riportati in letteratura.^{87b}

3.14.2.3 α -Metilazione di *(-)-65*

Il lattone *(-)-65* (180mg, 1.28mmol) viene α -fenilselenilato con Ph_2Se_2 in accordo con la letteratura.⁹³ Si ottengono i composti 69 e 70^{93,106} in rapporto 3:2. La miscela di reazione viene purificata per flash chromatography (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile 9.5:0.5, resa 60 %).

(-)-(3S,3aS,7aS)-cis-esaidro-3-fenilselenil-2(3H)-benzofuranone 69: e.e. 99%; $[\alpha]_D^{25} = -40.0$ (c 0.1, MeOH); $\Delta\epsilon_{304} = -0.31$, $\Delta\epsilon_{275} = +0.31$, $\Delta\epsilon_{252} = -0.49$, $\Delta\epsilon_{218} = -3.81$ (MeOH); UV: $\epsilon_{273} +1785$, $\epsilon_{220} +9174$, $\epsilon_{204} +12847$; $^1\text{H NMR}$ (400MHz) δ 7.56 (2H, m, Ar-H), 7.24 (3H, m, Ar-H), 4.60 (1H, dt, $J_1=J_2$ 4.2, J_3 8.1 CHO), 3.57 (1H, d, J 2.2, CH-SePh), 2.22 (1H, m, H-7a), 2.00 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.54 (1H, m), 1.40 (2H, m), 1.17 (3H, m); DIFNOE: irradiando a 4.60 ppm si innalza il segnale a 2.22 ppm (6%); irradiando a 3.57 ppm si innalza il segnale a 2.22 ppm (3%).

(-)-(3R,3aS,7aS)-cis-esaidro-3-fenilselenil-2(3H)-benzofuranone 70: e.e. 99%; $[\alpha]_D^{25} = -90.9$ (c 0.1, MeOH); $\Delta\epsilon_{285} = -2.28$, $\Delta\epsilon_{230} = +5.17$ (MeOH); UV: $\epsilon_{271} +1608$, $\epsilon_{217} +10429$, $\epsilon_{204} +15978$; $^1\text{H NMR}$ (400MHz) δ 7.58 (2H, m, Ar-H), 7.18 (3H, m, Ar-H), 4.42 (1H, q, J 3.3, CHO), 4.23 (1H, d, J 6.2, CH-SePh), 2.39 (1H, sest., H-7a), 2.15 (1H, m), 1.84 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.49 (2H, m), 1.38-1.05 (3H, m); DIFNOE: irradiando il segnale a 4.42 ppm si innalza il segnale a 4.23 ppm (6%) e a 2.39 ppm.

La miscela di 69 e 70 viene α -metilata in accordo con la letteratura⁹³ e il grezzo viene ossidato con H_2O_2 in THF contenente acido acetico. La purificazione per flash-

chromatography (eluente: acetato di etile-etero di petrolio, gradiente da 0% al 3%)
fornisce (-)-**64** purificato; e.e. 99%; $[\alpha]_D^{25} = -46.4$ (c 0.07, MeOH); $\Delta\epsilon_{256} = +0.16$, $\Delta\epsilon_{214} = -$
2.09; UV: $\epsilon_{208} +921$.

CAPITOLO 4

BIBLIOGRAFIA

- 1 a) *“Asymmetric Synthesis”*, Ed. J. D. Morrison, Voll.1-3, 5, (1983-1985), Accademic, New York; b) *“Enantioselective Synthesis”*, Ed. J. A. Gladysz e J. Michl, Chem. Rev., **1992**, 92, 739; c) H. B. Kagan, J. C. Fiond, *“New Approches in Asymmetric Synthesis”*, Topics in Stereochemistry, 10, 175, **1978**; d) R. A. Sheldon, *“Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds”*, M. Dekker, New York, **1993**; e) A. Rahman e Z. Shah, *“Stereoselective Synthesis in Organic Chemistry”*, Springer, New York, 1993; f) G. Jannes e V. Dubois, (Eds), *“Chiral Reactions in Heterogeneous Catalysis”*, Plenum Press, **1995**; *“Proceedings of ChiCat, The First European Symposium on Chiral Reactions in Heterogeneous Catalysis”*, Brussel, 25-26 October **1993**; g) J. Seyden-Penne, *“Chiral Auxiliaries and Ligands in Asymmetric Synthesis”*, Wiley-Interscience, New York, **1995**; h) I. Ojima (Ed.), *“Catalytic Asymmetric Synthesis”*, VCH, New York, **1993**; i) R. Noyori, *“Asymmetric Chatalysis in Organic Synthesis”*, Wiley, New York, **1994**; l) E. L. Eliel, S. H. Wilen, L. N. Mander, *“Stereochemistry of Organic Compounds”*, Wiley-Interscience, New York, **1994**; m) M. Nogradi, *“Stereoselective Synthesis: A Practical Approach”*, 2nd edn, VCH, Weinheim, 1995; n) R. A. Aitken e S. N. Kilenvi (Eds), *“Asymmetric Synthesis”*, Blakie, Glasgow, London, **1992**; o) O. Cervinka, *“Enantioselective Reactions in Organic Chemistry”*, Ellis Horword, London, **1995**; p) G. Procter, *“Asymmetric Synthesis”*, Oxford Science Publications, Oxford, **1996**.
- 2 a) K. Faber, *“Biotransformation in Organic Chemistry”*, 3^a ediz., Springer, Berlino, **1997**; b) *“Preparative Biotransformations, Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis”*, ed. S. M. Roberts, Wiley, Chichester, **1992-1997**; c) Tetrahedron Organic Chemistry Series, vol. 12, *“Enzymes in Synthetic Organic Chemistry”*, C-H. Wong, G. M. Whitesides, Pergamon, **1994**.
- 3 *“Chirality in Industry - Developments in the Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds”*, A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby Edit., John Wiley Sons, Chichester, vol. I, pag.2 e segg., **1995**.

- 4 J. J. Blumenstein "Chiral Drugs: Regulatory Aspects" in Chirality in Industry, A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby Edit., John Wiley Sons, Chichester, vol. II, pag. 11, 1997.
- 5 G. M. Whitesides, "Applications of Biochemical System in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series", ed. J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perhnon, Wiley-Interscience, New York, vol. 2, cap. 7, 1976.
- 6 E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *Chem. Rev.*, 1992, 92, 1071.
- 7 V. Smith, K. N. Chou, D. Lashkari, D. Botstein, P. Brown, *Science*, 1996, 274, 2069.
- 8 a) E. Shoffers, A. Golebiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron*, 1996, 52, 3769; b) F. Theil, *Chem. Rev.*, 1995, 95, 2203; c) R. Csuk, B. I. Glanzer, *Chem. Rev.*, 1991, 91, 49; d) S. Servi, *Synthesis*, 1990, 1.
- 9 C. Neuberg, A. Lewite, *Biochem. Z.*, 1918, 91, 257.
- 10 V. Pelog, *Pure Appl. Chem.*, 1964, 9, 119.
- 11 B. N. Zhon, A. S. Gopalan, F. Van Middlesworth, W. R. Shieh, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 5925.
- 12 a) M. Hirama, T. Nakamine, S. Ito, *Chem. Lett.*, 1984, 1381; b) D. Seebach, M. Eberle, *Synthesis*, 1986, 37; c) C. Fuganti, P. Grasselli, P. F. Seneci, P. Casati, *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 2091; d) D. Seebach, P. Renaud, W. B. Schweizer, M. F. Züger, *Helv. Chem. Acta*, 1984, 67, 1984.
- 13 K. Mori, *Tetrahedron*, 1989, 45, 3233.
- 14 A. Kramer, H. Pfader, *Helv. Chim. Acta*, 1982, 65, 293
- 15 W-R Shieh, A. S. Gopalan, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 2993
- 16 J. Heidlas, K-H. Engel, R. Tressel, *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, 13, 817
- 17 K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajama, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1989, 62, 875.
- 18 B. S. Deol; D. D. Ridley; G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.*, 1976, 29, 2459.
- 19 S. Iriuchijima, M. Ogawa, *Synthesis*, 1982, 41

- 20 J. V. Eys, N. O. Kaplan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 2782.
- 21 H. Suemune, Y. Mizuhara, H. Akita, T. Oishi, K. Sakai, *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 3112.
- 22 D. D. Ridley, M. Stralow, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1975**, 400
- 23 E. Rona, *Biochem. Z.*, **1914**, 67, 137.
- 24 D. H. Dao, Y. K. Kawai, K. Hida, S. Hornes, K. Nakamura, A. Ohno, M. Okamura, T. Akasaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1998**, 71, 425.
- 25 G. Pedrocchi-Fantoni, S. Redaelli, S. Servi, H-E. Högberg, *Gazz. Chim. Ital.*, **1992**, 122, 499.
- 26 H. Akita, H. Matsukura, T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 2656.
- 27 H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 4384.
- 28 L. Poppe, L. Novak, P. Kolonits, A. Bata, C. Szantay, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 1477.
- 29 K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 2589.
- 30 K. Nakamura, T. Miyai, K. Inoue, S. Kawasaki, S. Oka, A. Ohno, *Biocatalysis*, **1990**, 3, 17.
- 31 K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 7075.
- 32 Y. Naoshima, T. Nishiyama, Y. Munakata, *Chem. Lett.*, **1989**, 1517.
- 33 K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**, 66, 2738.
- 34 a) G. G. Haraldsson, "The Applications of Lipases in Organic Synthesis", in The Chemistry of Functional Group, Supp. B: The Chemistry of Acid Derivates, Ed. S. Patai, John Wiley & Sons, **1992**, vol. 2, part 2, cap. 24, pag. 1395; b) C. J. Sih e S. H. Wu, "Topics in Stereochemistry", eds. E. L. Eliel e S. H. Wilen, John Wiley & Sons, New York, **1989**, p. 63; c) J. B. Jones, "Enzymes in Organic Synthesis", *Tetrahedron Report n° 203*, **1986**, 42, 3351.
- 35 A. M. Klivanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 114.

- 36 a) A. M. Klivanov, *Trends Biothechnol.*, **1997**, 15, 97; b) "Enzymatic Reactions in Organic Media", Edit. A. M. P. Kashinen e A. M. Klivanov, Blackie Academic and Professional, **1996**.
- 37 J. M. Fang, C. H. Lin, C. W. Grodshow, C. H. Wong, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1995**, 967.
- 38 a) C-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 7294; b) C-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1984**, 23, 570.
- 39 a) Y. Lu, X. Zhao, Z. Chen, *Tetrahedron Asymmetry*, **1995**, 6, 1093; b) J. A. Jongejan, J. B. A. van Tol, A. Geerlof, J. A. Duine, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1991**, 110, 247 e 255.
- 40 L-M. Zhu, M. C. Tedford, *Tetraherdon*, **1990**, 46, 6587.
- 41 M. Ohno, M. Otsuka, *Org. React.*, **1989**, 36, 1.
- 42 C. Lambrechts, P. Galzy, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1995**, 59, 1464.
- 43 M. A. Jackson, D. P. Labeda, L. A. Becker, *Enzyme Microb. Technol.*, **1995**, 17, 175.
- 44 W. J. Quax, C. P. Broekhuizen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1994**, 41, 425.
- 45 L. Provencher, H. Wyrn, J. B. Jones, A. R. Krawczyk, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 2025.
- 46 L. K. P. Lam, C. M. Brown, B. De Jeso, L. Lym, E. J. Toone, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4409.
- 47 D. Seebach, M. Eberle, *Chemia*, **1986**, 40, 315.
- 48 P. Mohr, N. Waespe-Sarcevic, C. Tamm, K. Gawronska, J. K. Gawronski, *Helv. Chim. Acta*, **1983**, 66, 2501.
- 49 J. J. Lalonde, D. E. Bergbreiter, C-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 2323.
- 50 a) C-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 695 b) W. Boland, C. Frosil, M. Lorenz, *Synthesis*, **1991**, 1049; b), K. Faber, S. Riva, *Synthesis*, **1992**, 895; c) E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, 15, 367; d) "Lipases, their Structure, Biochemistry and Applications" P. Wooley, S.B. Petrsen editors, Cambridge, **1994**.

- 51 a) U. Derewenda, A. M. Brzozowski, D. M. Lawson, Z. S. Derewenda, *Biochemistry*, **1992**, 31, 1532; b) D. Blow, *Nature*, **1991**, 351, 444.
- 52 E. Guibè-Jampel, G. Rousseau, J. Salaun, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 1080.
- 53 B. A. Marples, M. Roger-Evans, *Tetrahedron Letters*, **1989**, 30, 261.
- 54 A. J. Carnell, *Chem. Brit.*, **1997**, 26, 49.
- 55 a) “*Comprehensive Organic Chemistry*”, D. Barton, W. D. Hollis; E. Haslam Ed.; vol. 5, Pergamon Press, **1979**; b) H. C. Brown, S. V. Kulkarni, U. S. Racherla, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 365.
- 56 S. S. C. Koch, A. R. Chamberlin, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2725.
- 57 Y. Ohfuné, K. Hori, M. Sakaitani, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 6079.
- 58 A. R. Chamberlin, M. Dezube, S. H. Reich, D. J. Sall, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 6247.
- 59 G. H. Posner, T. P. Kogan, S. R. Haines, L. L. Frye, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 2627.
- 60 J. P. Vigernon, R. Mèric, M. Larchevâque, A. Debal, J. Y. Lallernand, G. Kunesch, P. Zagatti, M. Gallois, *Tetrahedron*, **1984**, 40, 3521.
- 61 K. Mori, *Tetrahedron*, **1983**, 39, 3107.
- 62 J. M. Tumlinson, M. G. Klein, R. E. Dolittle, T. L. Ladd, A. T. Proveaux, *Science*, **1977**, 197, 789.
- 63 Y. S. Rao, *Chem. Rev.*, **1964**, 62, 353.
- 64 a) H. M. R. Hoffmann, J. Rabe, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1985**, 24, 94; b) V. J. Bryan, T-H. Chan, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 5341; c) A. D. Rodriguez, I. C. Piña, C. L. Barnes, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 8096.
- 65 a) T. F. Murray, E. G. Samsel, V. Varna, J. R. Norton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 103, 7520; b) P. A. Grieco, *Synthesis*, **1975**, 65.
- 66 a) S. Drioli, F. Felluga, C. Forzato, P. Nitti e G. Pitacco, *Chem. Commun.*, **1996**, 1289; b) B. K. Park, M. Nakagawa, A. Hirota, M. Nakayama, *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, 51, 3443; c) B. K. Park, M. Nakagawa, A. Hirota, M. Nakayama, *J.*

- Antibiot.*, **1988**, 41, 751; d) M. B. de Azevedo, M. M. Murta, A. E. Greene, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 4567; e) G. Zhu, X. Lu, *Tetrahedron Asymmetry*, **1995**, 6, 885; f) S. D. Mawson, R. T. Weavers, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 11257.
- 67 a) H. Takahata, Y. Uchida, T. Momose, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 5628; b) T. Honda, N. Kimura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 77; c) A. Vaupel, P. Knochel, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 231; c) M. P. Sibi, P. K. Deshpande, A. J. La Loggia, *Synlett*, **1996**, 343.
- 68 a) "Circular Dichroism - Principles and Applications", K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody, Eds.; VCH Publishers Inc., New York, **1994**; b) "Circular Dichroic Spectroscopy - Exciton Coupling in Organic Stereochemistry", N. Harada, K. Nakanishi, University Science Books, Oxford University Press, **1983**; c) "ORD and CD in Chemistry and Biochemistry", P. Crabbé, Academic Press, New York and London, **1972**; d) G. Sneath, *Angew. Chem. Int. Eng. Edit.*, **1968**, 7, 14; e) "Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry", P. Crabbé, Holed-Day, San Francisco, London, Amsterdam, **1965**.
- 69 A. Moscowitz, *Tetrahedron*, **1961**, 13, 48.
- 70 a) M. Keller, G. Sneath, *Tetrahedron*, **1973**, 29, 4013; b) A. F. Beecham, *Tetrahedron Lett.*, **1968**, 32, 3591; c) A. F. Beecham, *Tetrahedron Lett.*, **1968**, 19, 2355; d) J. P. Jennings, W. Klyne, P. M. Scopes, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 7211; e) T. Okuda, S. Harigaya, A. Kiyomoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **1964**, 12, 504.
- 71 a) S. Hanessian, A. Ugolini, M. Therien, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 4427; b) D. Wasmuth, D. Seebach, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta*, **1982**, 65, 344.
- 72 a) E. Hungerbuhler, R. Naef, D. Wasmuth, D. Seebach, H. R. Loosli, A. Wherli, *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 1960; b) K. Mori, T. Takigawa, T. Matsuo, *Tetrahedron*, **1979**, 35, 933.
- 73 V. K. Tandon, A. M. Van Leusen, H. Wynberg, *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2767.
- 74 K. Nakamura, S. Kondo, N. Nakajima, A. Ohno, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 687.
- 75 K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima, A. Ohno, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 4778.
- 76 M. North, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1699.

- 77 a) K. Ushio, K. Ebara, T. Yamashita, *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, 3, 834; b) K. Ushio, J. Hada, Y. Tanaka e K. Ebara, *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, 15, 222.
- 78 E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, F. Aragozzini, E. Maconi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1991**, 601.
- 79 “*Rodd’s Chemistry of Carbon Compounds*”, Second edition - Edited by S. Coffey, Vol. 1, Part D
- 80 D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley&Sons, II Ed., **1995**.
- 81 Tesi Sperimentale in Chimica Organica “*Sintesi di butanolidi otticamente attivi da dialchil α -chetoglutarati*”- Dott. L. Tossut, Relatore Prof. E. Valentin
- 82 P. Dowd, S-C. Choi, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 77.
- 83 E. E. Blaise, H. Gault, *Bull. Soc. Chim.*, **1911**, 458.7
- 84 F. Echalièr, O. Constant, J. Bolte, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2747.
- 85 R. Ozegowski, A. Kunath, H. Schick, *Liebigs Ann.*, **1995**, 1699.
- 86 Y. Nishida, H. Ohruì, H. Meguro, *Agric. Biol. Chem.*, **1984**, 48, 1211.
- 87 a) C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 4101; b) C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco e E. Valentin, *Gazz. Chim. Ital.*, **1996**, 126, 37
- 88 S.B. Mahato, K.A.I. Siddiqui, G. Bhattacharya, T. Ghosal, K. Miyahara, M. Sholichin e T. Kawasaki, *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 245.
- 89 N. Ono, T. Yamada, T. Saito, K. Tanaka e A. Kaji, *Bull. Chem Soc. Japan*, **1978**, 51, 2401.
- 90 a) Z. Zhang, X. Lu, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 1923; b) P. A. Jacobi, P. Herradura, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 8297
- 91 T. M. Jr. Patrick, *J. Org. Chem.* **1952**, 17, 1009.
- 92 J. Martin, P. C. Watts, F. Johnson, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 1676.
- 93 P. A. Grieco, M. Miyashita, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 120.
- 94 S. Drioli, F. Felluga, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *J. Mol Cat. Part B: Enzymatic*, **1997**, 3, 203.
- 95 a) S. Huneck, T. Tønsberg, F. Bohlmann, *Phytochemistry*, **1986**, 25, 453. b) S.

- Shimada, Y. Hashimoto, K. Saigo, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5226.
- 96 a) I. Uchida, K. Kuriyama, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 3761. b) J. K. Gawronski, A. van Oeveren, H. van der Deen, C. W. Leung, B. L. Feringa, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1513. c) R. B. Cain, S. M. Kelly, G. W. Kirby, H. J. S. McLenaghan, A. J. Marshall, N. C. Price, G. V. Rao, S. Schmidt, *J. Chem. Research (S)*, **1996**, 526.
- 97 a) F. Felluga, P. Nitti, G. Pitacco and E. Valentin, *Gazz. Chim. Ital.*, **1993**, 123, 443. b) C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *Gazz. Chim. Ital.*, **1995**, 125, 223.
- 98 C. Brannock, R. D. Burpitt, V. W. Goodlett and J. G. Thweatt, *J. Org. Chem.*, **1964**, 29, 813.
- 99 A. Risaliti, E. Valentin e M. Forchiassin, *Chem. Commun.*, **1969**, 233.
- 100 M. Calligaris, G. Pitacco, E. Valentin and E. Zotti, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 2721.
- 101 D. Seebach, e J. Golinski, *Helv. Chim. Acta*, **1981**, 64, 1413.
- 102 L. M. Jackman, S. Sternbell, "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", Pergamon Press, Oxford, **1969**, p.291.
- 103 T-L. Ho, C. M. Wong, *Syn. Commun.*, **1974**, 4(2), 133.
- 104 K. F. Podraza, *J. Heterocyclic Chem.*, **1987**, 24, 293.
- 105 W. H. Pirkle, P. E. Adams, *J. Org. Chem.*, **1990**, 45, 4111;
- 106 C.C. Silveira, M.A. Araujo, E.J. Lenardao, A.L. Braga, M.J. Dabdoub, *Synthesis*, **1995**, 1305.
- 107 W. Sucrow, K-P- Grosz, *Synthetic Commun.*, **1979**, 9(7), 603.