



Universitatea Babeş-Bolyai  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică  
Catedra de Biochimie și Inginerie Biochimică

## **Căi biocatalitice pentru sinteza heteroaryl-1,2-etandiolilor de înaltă enantiopuritate**

Rezumatul tezei de doctorat

**Conducător științific**

Prof. Dr. Florin Dan Irimie

**Doctorand**

Bencze László-Csaba

-Cluj Napoca-  
2011

Universitatea Babeş-Bolyai  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică  
Catedra de Biochimie și Inginerie Biochimică

**Bencze László-Csaba**

**Căi biocatalitice pentru sinteza heteroaril-1,2-etandiolilor de înaltă enantiopuritate**

Rezumatul tezei de doctorat

**Comisia de doctorat:**

**Președinte:**

Conf. Dr. Majdik Cornelia – Decanul Facultății de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

**Conducător științific:**

Prof. Dr. Florin Dan Irimie – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

**Reviewers:**

Prof. Dr. Poppe László – Facultatea de Chimie Technologică și Biotehnologică,  
Universitatea Tehnică și Economică din Budapesta, Budapesta

Prof. Dr. Mircea Dărăbanțu – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Prof. Dr. Dan Cașcaval – Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică Gheorghe Asachi, Iași

Data susținerii publice: 24 March 2011

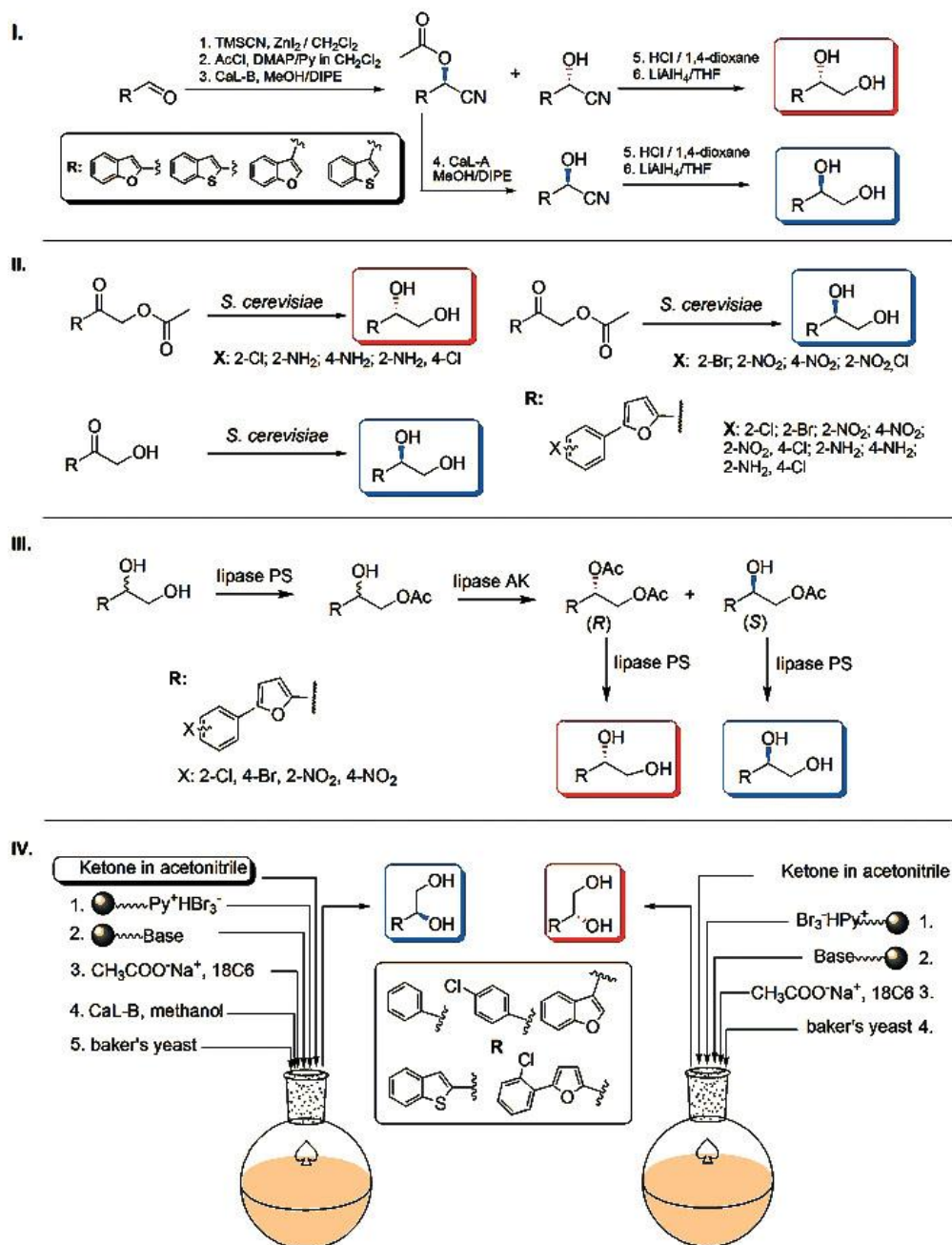
## Cuprins

Cuprins	2
Abreviări	5
<b>1. Introducere</b>	7
<b>2. Partea teoretică</b>	9
2.1. Introducere în biocataliză	9
2.2. 1,2-etandiolii optici puri ca și precursori, intermediari chirali	10
2.3. Metode biocatalitice pentru sinteza 1,2-etandiolilor	13
2.3.1. Rezoluția cinetică a 1,2-etandiolilor racemice prin oxidare selectivă	13
2.3.2. Sinteza stereoselectivă mediată de epoxid hidrolaze	14
2.3.3. Rezoluția cinetică a 1,2-etandiolilor mediată de lipaze	15
2.3.3.1. Structura și mecanismul lipazelor	15
2.3.3.2. Caracterizarea lipazelor utilizate	19
2.3.3.3. Rezoluția cinetică a aril-1,2-diolilor și derivaților acestora mediată de lipaze	21
2.3.4. Biotransformări mediate de drojdie a $\alpha$ -hidroxi-cetonelor	25
2.3.5. Metodologii pentru controlul stereochemic al biotransformărilor mediate de drojdie	29
2.3.5.1. Modificarea biocatalizatorilor prin metode genetice	29
2.3.5.2. Imobilizarea drojdiei	31
2.3.5.3. Modificarea substratului	31
2.3.5.4. Modificarea condițiilor de reacție	32
<b>3. Scopul tezei</b>	37
<b>4. Rezultate și discuții</b>	41
4.1. Sinteza ( <i>R</i> )- și ( <i>S</i> )-benzofuranil- și benzo[ <i>b</i> ]tiofenil-1,2-etandiolilor <b>3a-d</b> prin intermediul cianohidrinelor enantiopure <b>2a-d</b>	41
4.1.1. Sinteza cianohidrinelor racemice <b>2a-d</b> și a derivaților săi acilați <b>11a-d</b>	41
4.1.2. Transformările enzimatică la scară analitică	41
4.1.3. Sinteza preparativă a ( <i>R</i> )- și ( <i>S</i> )-heteroaryl-1,2-etandiolilor <b>3a-d</b>	45
4.1.4. Determinarea configurației absolute prin măsurători VCD	47
4.2. Biotransformări mediate de drojdie a $\alpha$ -hidroxi- și $\alpha$ -acetoximetil-5-fenilfuran-2-il-etanonele <b>5,6e-i,l,m,n</b>	49
2.2.1. Sinteza substraturilor <b>5,6e-i,l,m,n</b>	49
2.2.2. Biotransformările celulare mediate de drojdie	50
2.2.3. Configurația absolută a diolilor sintetizați	54
4.3. Rezoluția cinetică a 5-fenilfuran-2-il-1,2-etandiolilor mediată de lipaze	54
4.3.1. Prepararea substraturilor racemice <i>rac</i> - <b>3,7,8,9e-h</b>	55
4.3.2. Acilarea enzimatică a diolilor racemici <i>rac</i> - <b>3e-h</b>	56
4.3.3. Acilarea, alcooliza și hidroliza enzimatică a monoacetaților primari și secundari <i>rac</i> - <b>7,8e-h</b>	57
4.3.4. Rezoluția cinetică a derivaților diacetiilați <i>rac</i> - <b>9e-h</b>	61
4.3.5. Sinteza preparativă a ( <i>R</i> )- și ( <i>S</i> )-diolilor optici puri <b>3e-h</b>	62
4.4. Sinteza one-pot a ( <i>R</i> )- și ( <i>S</i> )-aryl-1,2-etandiolilor <b>3b,c,e,j,k</b>	64
<b>5. Concluzii</b>	68

<b>6. Partea experimentală</b>	69
6.1 Metode analitice	69
6.2. Reactivi și solvenți	71
6.3. Sinteza compușilor racemici	71
6.3.1. Sinteza cianohidrinelor racemice <i>rac-2a-d</i>	71
6.3.2. Acilarea chimică a cianohidrinelor racemice <i>rac-2a-d</i>	73
6.3.3. Sinteza chemoenzimatică a cetonei prochirale <b>5,6e-i</b>	74
6.3.3.1. Sinteza 5-fenilfuran-2-etanonilor <b>4e-i</b>	74
6.3.3.2. Sinteza heteroaril-2-bromoetanonilor <b>10e-i</b>	75
6.3.3.3. Sinteza a2-(heteroaril)-2-oxoacetaților de etil <b>5e-i,l,m,n</b>	76
6.3.3.4. Sinteza 1-(heteroaril)-2-hidroxiolanolilor <b>5e-i,l,m,n</b>	78
6.3.3.5. Sinteza 1-(heteroaril)-etan-1,2-diolilor racemici <i>rac-3e-i,l,m,n</i>	80
6.3.4. Sinteza monoacetatilor alcoolilor primari <i>rac-7e-h</i>	82
6.3.5. Sinteza 1,2-diacetoxi-derivativilor <i>rac-9e-h</i>	83
6.3.6. Sinteza monoacetatilor alcoolilor secundari <i>rac-8e-h</i>	84
6.4. Reacțiile enzimaticice la scară analitică	85
6.5. Procedurile de scară preparativă	87
6.5.1. Alcooliza enzimatică preparativă a acetaților cianohidrinelor racemice <i>rac-11a-d</i>	87
6.5.2. Alcooliza enzimatică preparativă a acetaților cianohidrinelor optic pure ( <i>S</i> )- <b>11a,b</b> , ( <i>R</i> )- <b>11c,d</b>	87
6.5.3. Hidroliza chimică preparativă, urmată de reducere a cianohidrinelor optic pure	87
6.5.4. Sinteza preparativă a ( <i>R</i> )- și ( <i>S</i> )-heteroaril-etandiolilor <b>5e-i,l,m,n</b>	88
6.5.5. Acilarea enzimatică preparativă a monoacetaților alcoolilor primari racemici <i>rac-7e-h</i>	89
6.5.6. Alcooliza-hidroliza enzimatică preparativă a monoacetaților și diacetaților optic puri ( <i>S</i> )- <b>7e-h</b> și ( <i>R</i> )- <b>9e-h</b>	89
6.5.7. Procedura generală pentru procesul one-pot cuprinzând biotransformarea $\alpha$ -acetoximetil cetonei <b>5b,c,e,j,k</b>	90
6.5.8. Procedura generală pentru procesul one-pot cuprinzând biotransformarea $\alpha$ -hidroximetil cetonei <b>6b,c,e,j,k</b>	90
6.6. Determinarea configurației absolute a noilor 1,2-etandiolilor optic puri <b>3e-h</b>	91
<b>Mulțumiri</b>	93
<b>Bibliografie</b>	95
<b>Anexă: publicații științifice originale</b>	100

**Cuvinte-cheie:** biocataliză, biotransformare, drojdie, lipaze, efect de substituent, (hetero)aril-1,2-etandiol, one-pot, rezoluție cinetică, sinteză stereoselectivă

## Abstract graphic:



## 1. Introducere

Progresul civilizație umane este legat direct de progresul chimiei. Necesitățile pentru menținerea și refacerea confortului și sănătății sunt obiective imposibil de atinse în absența chimiei.

Materialele noi obținute prin procese chimice au aplicații importante în domeniul medicinei, alimentației, cosmeticii, al industriei de construcții și industriei petroliere. Industria farmaceutică este unul dintre cele mai puternice indusirii din lume, având scopul de a produce medicamente folosite pentru prevenirea, trataterea și vindecarea bolilor umane.

Complexitatea structurală a noilor medicamente validate este în continuă creștere și nesurprinzător, având în vedere faptul că în funcționarea corpul uman sunt utilizați catalizatori chirali, tendința utilizării compușilor farmaceutici chirali a crescut semnificativ în ultimele decenii. În zilele noastre acești compuși chirali sunt în general sintetizați în formă enantiopură.

Această teză aparține domeniului biocatalizei și biotransformării, aducând procese noi, „verzi”, de înaltă selectivitate, și totodată potențiali sintoni chirali noi pentru industria farmaceutică și industria chimică fină.

Biocataliza, sinteza chimică mediată de un biocatalizator (enzimă izolată, sistem celular întreg) a devenit o componentă cheie în sectorul farmaceutic. Proprietățile excelente de chemo-, regio- și stereoselectivitate a biocatalizatorilor au permis înlocuirea unor sinteze dificile, mai ales în domeniul sintezei produsilor enantiopuri.

Industria chimică face față presiunii pentru dezvoltarea tehnologiilor noi, procese integrate și nepoluante, cu scopul limitării impactului asupra mediului. Biocataliza are potențialul de a fi utilizat ca tehnologie curată, integrată, datorită condițiilor de reacție (pH, temperatură, presiune) blânde, a biocatalizatorilor compatibili și prietenoase cu mediul.

Dezvoltările recente ale biocatalizei asigură competiția proceselor biocatalitice cu cele chimice convenționale, aplicațiile industriale ale biocatalizei fiind în creștere semnificativă. Noile progrese în ingineria proteinelor, în ingineria reacțiilor și alte discipline conectate cu biocataliza a condus la îmbunătățiri ale proceselor enzimatiche existente și dezvoltarea unor procese noi și alternative. Astfel se poate preconiza o creștere a raportului biotehnologiei în sinteza organică fină și înlocuirea procedurilor sintetice tradiționale.

Teza se limitează la discutarea sintezei stereoselective a (hetero)aril-1,2-etandiolilor enantiopuri, precursori și intermediari chirali importanți în sinteza farmaceutică. Pe lângă

obținerea unui număr mare de compuși noi, cu aplicabilitate farmaceutică potențială au fost dezvoltate cu succes și noi metode chemoenzimatice.

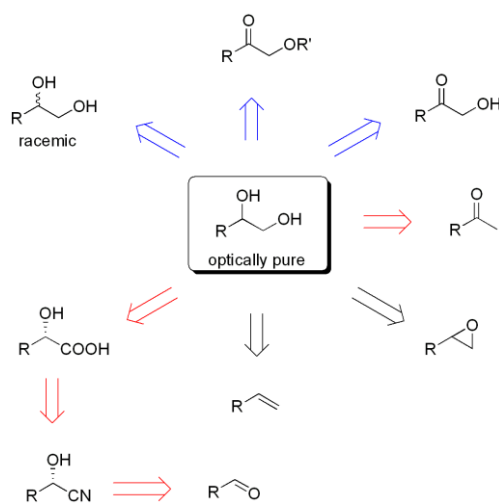
## 2. Partea teoretică (date din literatură)

### 3. Scopul tezei de doctorat

Teza de doctorat, dedicată sintezei stereoselective a 1,2-etandiolilor heterociclici, optic puri, cu aplicabilitate potențială în industria farmaceutică, a avut următoarele obiective:

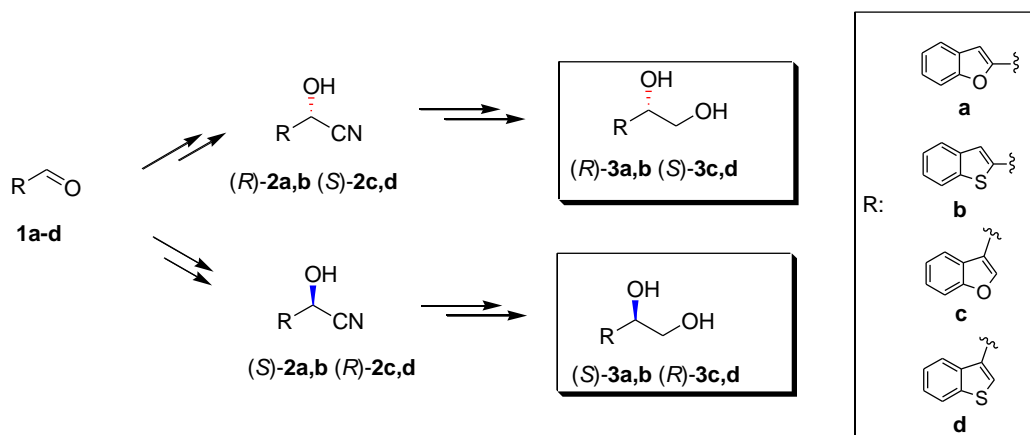
1. Creșterea enantiopurității a benzofuran și benzo[*b*]tiofen 1,2-etandiolilor preparați anterior, prin dezvoltarea unei noi metode de sinteză chemoenzimatică.

În cazul (*R*)- și (*S*)-1,2-etandiolilor **3a-d** preparați anterior randamentul global și enantiopuritatea produșilor nu a fost în toate cazurile satisfăcătoare<sup>63</sup>. Pentru înlăturarea acestor dezavantaje, prin analiza retrosintetică (Schema 1, linia roșie, partea stângă) am propus o cale sintetică nouă, alternativă, bazată pe cianohidrinele optic pure **2a-d** noi, sintoni chirali versatili<sup>87</sup>, care pot fi obținuți ușor din aldehidele corespunzătoare **1a-d**, mult mai ușor accesibile.



**Schema 1.** Căile retrosintetice pentru 1,2-etandiolii optic puri. Linii roșii: căile noi de retrosinteză propuse, linii albastre – căi retrosintetice descrise anterior, aplicate în teză pentru sinteza noilor heteroaryl-1,2-etandiolii, linii negre – căi de retrosinteză cunoscute, neaplicate în teză

Rezoluția cinetică<sup>88</sup> sau rezoluția cinetică dinamică<sup>89</sup> mediate de lipaze<sup>90</sup> a cianohidrinelor racemice sau esterilor lor este una dintre cele mai utilizate metode pentru sinteza cianohidrinelor enantiopure. Hidroliza chimică<sup>91</sup> și enzimatică<sup>92</sup> a grupării nitril a cianohidrinelor optic pure în hidroxiacizii sau amidele corespunzătoare este de asemenea cunoscută, astfel pot fi obținute prin reducerea consecutivă ambii enantiomeri ai (*R*)- și (*S*)-**3a-d**. Secvența de reacție investigată este prezentată în Schema 2.



**Schema 2.** Sinteza (*R*) și (*S*)-benzofuranil- și benzo[*b*]tiofenil-1,2-etandiolililor **3a-d** prin intermediul cianohidrinelor optice pure **2a-d**

**2.** Sinteza unor fenilfuran-2-il-etandiolililor optice puri noi **3e-i**, prin utilizarea a două metode biocatalitice diferite: biotransformările mediate de drojdie a  $\alpha$ -hidroximetilcetonelor **6e-i** și  $\alpha$ -acetoximetilcetonelor **5e-i** (Schema 3, linii albastre) și rezoluția cinetică mediată de lipaze a 1,2-etandiolililor racemici *rac*-**3e-i** și a derivaților lor acilați *rac*-**7,8,9e-i** (Schema 3, linii roșii). În ambele cazuri sinteza utilizează ca și materii prime pe heteroariletanonele **4e-i**.

Procedura chemoenzimatică mediată de drojdie s-a dovedit a fi o metodă eficientă și ecologică pentru sinteza ambilor enantiomeri a numeroși heteroaril-1,2-dioli (Capitol 2.3.4.), astfel aplicarea sa este justificată.

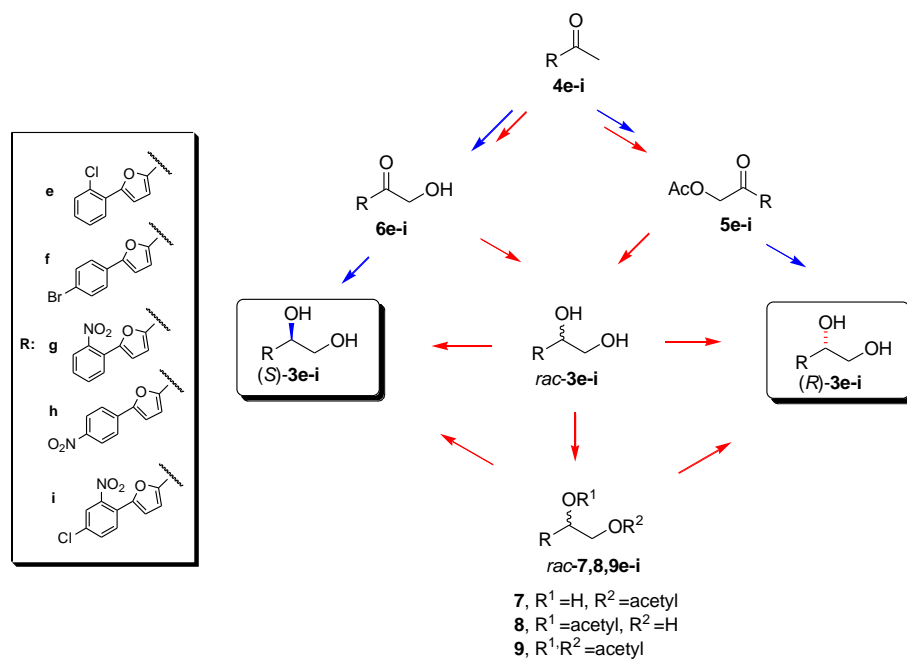
Biotransformările aril-1,2-etandiolililor prin intermediul lipazelor este de asemenea utilizată cu succes pentru sinteza unui număr mare de 1,2-etandiolililor optice puri (Capitol 2.3.3.3.). În acest scop am testat toate posibilitățile de rezoluție cinetică a fenilfuran-2-il-etan-1,2-dioliilor racemici *rac*-**3e-i** și a derivaților lor monoacilați primari **7e-i** sau monoacilați secundari **8e-i**, sau diacilați **9e-i**, cu scopul de a dezvolta o metodă chemoenzimatică, eficientă, bazată pe cel mai avantajos proces de rezoluție.

**3.** Dezvoltarea unei metode one-pot, generală și eficientă pentru sinteza aril-1,2-etandiolililor enantiopuri folosind ca și materii prime compuși achirali, ieftini.

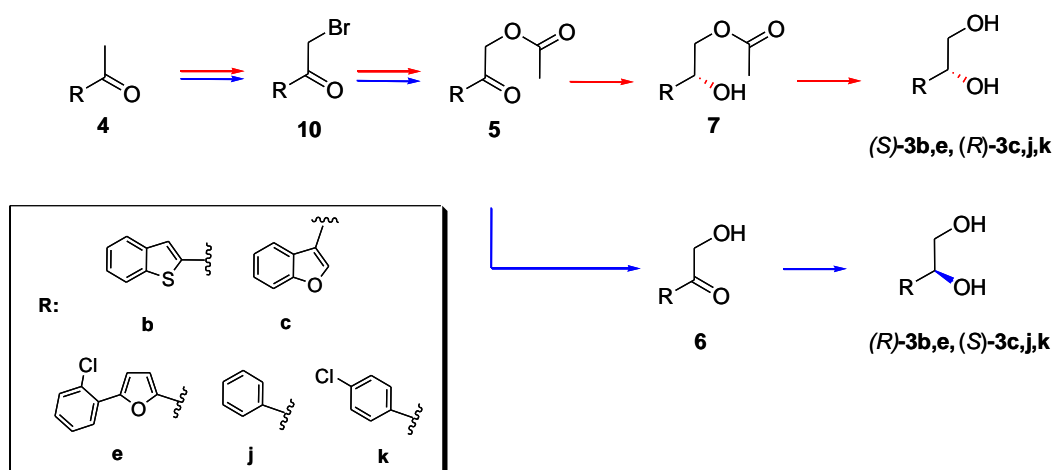
O sinteză enzimatică, enantioselectivă printr-o metodă one-pot simplă și eficientă pentru obținerea 1,2-etandiolililor aromatici, pornind din etanonele corespunzătoare achirale și ieftine este un obiectiv de perspectivă. Metoda chemoenzimatică dezvoltată anterior<sup>63</sup> pentru sinteza ambilor enantiomeri ai (*R*)- și (*S*)-1-aril-1,2-etandiolililor este o procedură în mai multe etape, bazată pe reducerea enantiotop selectivă mediată de drojdie. Acest procedeu se poate



transforma prin optimizarea procesului într-o metodă one-pot, care utilizează ca materie primă cetonile corespunzătoare **4** (Schema 4).



**Schema 3.** Sinteza ambilor enantiomeri ai unor fenilfuran-1,2-etandioli optic puri noi **3e-i** prin biotransformări mediate de drojdie (linii albastre) sau prin rezoluție cinetică mediată de lipaze (linii roșii)



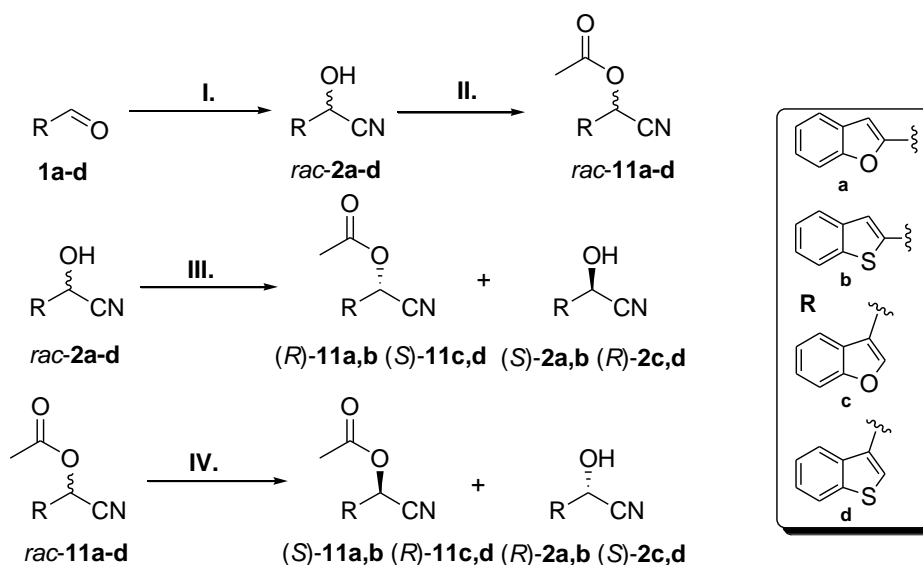
**Schema 4.** Linii albastre- procesul one-pot cuprinzând biotransformarea  $\alpha$ -hidroxicetonelor **6**; linii roșii – procesul one-pot cuprinzând biotransformarea  $\alpha$ -acetoximetri cetonelor **5**

## 4. Rezultate și discuții

### 4.1. Sinteza (*R*)- și (*S*)-benzofuranil- și benzo[*b*]tiofenil-1,2-etandiolilor **3a-d** prin intermediul cianohidrinelor enantiopure **2a-d**

#### 4.1.1. Sinteza cianohidrinelor racemice **2a-d** și a derivațiilor lor acilați **11a-d**

Sinteza cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* din aldehidele corespunzătoare **1a-d** a fost realizată cu cianură de trimetil silil în prezența unei cantități catalitice de ZnI<sub>2</sub> anhidru, în diclorometan. Prin acilarea chimică a cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* cu clorură de acetil în prezență de Py/DMAP au fost obținuți acetatii racemici ai cianohidrinelor *rac-11a-d* (Schema 5).



**Schema 5.** Sinteza și biotransformările enantioselective ale cianohidrinelor și acetatilor cianohidrinelor racemice

#### 4.1.2. Transformările enzimaticе la scară analitică

Pentru a investiga stereoselectivitatea reacțiilor enzimaticе și activitatea enzimelor a fost realizată mai întâi separarea cromatografică a enantiomerilor compușilor racemici *rac-2,11a-d*. Pentru obținerea (*R*)- și (*S*)-heteroarilcianohidrinelor de înaltă enantiopuritate au fost testate mai multe lipaze în diferite solvenți organici în reacția de acilare enantioselectivă a cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* cu acetat de vinil (5 eq.) și în cea de alcooliză (metanol, etanol, propanol and butanol, 8 eq.) a acetatilor cianohidrinelor racemice *rac-11a-d* (Schema 5).

Comportarea lipazelor a fost diferită în cele două tipuri de reacții enzimatică. În cazul acilării enzimatică a *rac-2a-d* majoritatea lipazelor, inclusiv lipaza PS, unul dintre cei mai utilizați catalizatori în rezoluția cianohidrinelor<sup>87</sup>, au fost inactive. Lipaza A din *Candida antarctica*, imobilizată pe Celite (CaL-A), reticulată cu glutaraldehidă, (CaL-A-CLEA), sau imobilizată covalent (IMMCal-A T2-150), a catalizat cu viteză redusă și selectivitate mică acilarea *rac-2a-d* în toți solvenții testați. Surprinzător și lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B) a fost inefficientă. Deși după 7 zile conversia a fost de doar circa 5%, enantiopuritatea produșilor acilați a fost ridicată (ee > 98 %). Astfel pentru acilarea enantioselectivă a cianohidrinelor racemice *rac-2a-d*, numai lipaza AK din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK) a avut activitate și selectivitate mare. Acest rezultat este în concordanță cu observațiile anterioare, când L-AK s-a dovedit a fi catalizatorul optim pentru acilarea enantiomer selectivă a benzofuranil- and benzo[b]tiofenil-etanolilor.<sup>93</sup>

Conform așteptărilor, stereoselectivitatea reacțiilor a fost influențată de natura solventului. În timp ce acilarea enzimatică cu acetat de vinil (5 eq.) a *rac-2a-c*, mediată de lipaza AK a fost decurs cu selectivitate maximă în diclorometan, pentru biotransformarea *rac-2d* DIPE s-a dovedit a fi solventul optim la utilizarea aceleași enzime (Tabel 1, nr. 4-8, datele prezentate numai pentru acilarea enzimatică a *rac-2a*).

**Tabelul 1.** Influența naturii solventului și donorului grupării acil la acilarea enzimatică a *rac-2a* mediată de lipaza AK

Nr.	Solvent	Agent de acilare	Timp (h)	c (%)	ee <sub>P</sub>	ee <sub>S</sub>	E
1	Toluen	Acetat de vinil (5 eq.)	36	41	97	68	134
2	DIPE	Acetat de vinil (5 eq.)	21	40	96	64	95
3	<i>t</i> -BME	Acetat de vinil (5 eq.)	21	48	97	90	~200
4		Acetat de vinil (5 eq.)	21	51	97	> 99.5	»200
5		Butanoat de vinil (5 eq.)	27	48	98	96	»200
6	Dicloro- metan	Acetat de vinil (8 eq.)	16	50	97	96	>200
7		Acetat de vinil (4 eq.)	16	50	98	98	»200
8		Acetat de vinil (2 eq.)	16	50	96	98	>200
9	<i>n</i> -hexan	Acetat de vinil (8 eq.)	21	45	91	75	48

În continuare, pentru a atinge excesul enantiomeric maxim al produşilor de rezoluţie, a fost testată influenţa naturii şi cantităţii acil donorului. În timp ce utilizarea butanoatului de vinil ca şi donor de acil (Tabel 1, nr. 5) n-a condus la îmbunătăţirea enantioselectivităţii reacţiei în diclorometan, la testarea unor cantităţi diferite de acetat de vinil (Tabel 1, nr. 4,6-8) s-a arătat că 4 eq. de acetat de vinil reprezintă valoarea optimă (Table 2, nr. 7).

Rezultatele acilării enzimaticice la scară analitică a *rac-2a-d* cu 4 eq. de acetat de vinil, catalizată de LAK sunt prezentate în Tabelul 3, nr. 1-4. Este important de menţionat că stereoselectivitatea şi viteza acilării enzimaticice este influenţată de structura cianohidrinelor heteroaromate. În timp ce rezoluţia cinetică a benzofuran-2-il- şi benzo[*b*]tiofen-2-il-cianohidrinelor (*rac-2a,b*) decurge cu enantioselectivitate mare (Table 3, nr. 1-2), când benzofuran-3-il- şi benzo[*b*]tiofen-3-il-cianohidrinele (*rac-2c,d*) sunt utilizaţi ca şi substrat transformarea decurge lent (46 % conversie după 18 h şi 41% conversie după 23 h respectiv) şi se obţin produşi cu enantiopuritate nesatisfăcătoare (Table 3, nr. 3 şi 4).

**Tabelul 2.** Influenţa naturii solventului şi nucleofilului asupra selectivităţii alcoolizei enzimaticice a *rac-11a* mediată de CaL-B

Nr	Solvent	Reactant	Timp(h)	c (%)	ee <sub>p</sub>	ee <sub>s</sub>	E
1	Acetonitril	metanol (8 eq.)	3	26	> 99.5	35	»200
2	<i>n</i> -hexan	metanol (8 eq.)	3	49	97	92	~200
3		metanol (8 eq.)	1.5	48	98	90	>200
4		etanol (8 eq.)	1.5	39	99	64	>200
5		1-propanol (8 eq.)	1.5	43	99	76	»200
6	DIPE	1-butanol (8 eq.)	1.5	41	99	68	»200
7		metanol (6 eq.)	2	48	99	93	»200
8		metanol (4 eq.)	2	49	99	95	»200
9		metanol (2 eq.)	2	49	99	97	»200
10	Diclorometan	metanol (8 eq.)	3	15	> 99.5	17	»200
11	Toluen	metanol (8 eq.)	3	39	> 99.5	64	»200
12	<i>t</i> -BME	metanol (8 eq.)	3	49	96	91	156

În continuare a fost investigată alcooliza enantiomer selectivă a acetaţilor cianohidrinelor racemice *rac-11a-d* la scară analitică. Folosind o procedură de optimizare pentru selectarea enzimei, solventului şi a cantităţii de nucleofil au fost selectaţi eterul diizopropilic (DIPE) ca şi solvent, metanolul (2 eq.) ca şi nucleofil, respectiv CaL-B ca şi biocatalizator pentru alcooliza *rac-11a-d*. CaL-A, CaL-A(CLEA) şi IMMCaL-A T2-150 au catalizat rapid dar cu selectivitate mică alcooliza acetaţilor cianohidrinelor racemice *rac-11a-*

**d.** În Tabelul 2 sunt prezentate selectiv datele obținute la alcooliza enantioselectivă în diferite condiții a *rac-11a*. Astfel atât cianohidrinele cât și acetajii acestora au fost obținuți după 2 h cu o conversie apropiată de 50%, cu enantiopurități mari (Tabel 2, nr. 9). Viteza de reacție a scăzut la utilizarea unor cantități mai mari de metanol, fără a altera semnificativ stereoselectivitatea procesului de alcooliză a *rac-11a-d* (Tabel, nr. 7,8).

**Tabelul 3.** Rezultatele și condițiile optime pentru rezoluția enantioselectivă a cianohidrinelor racemice *rac-2a-d* și a acetajilor cianohidrinelor *rac-11a-d*

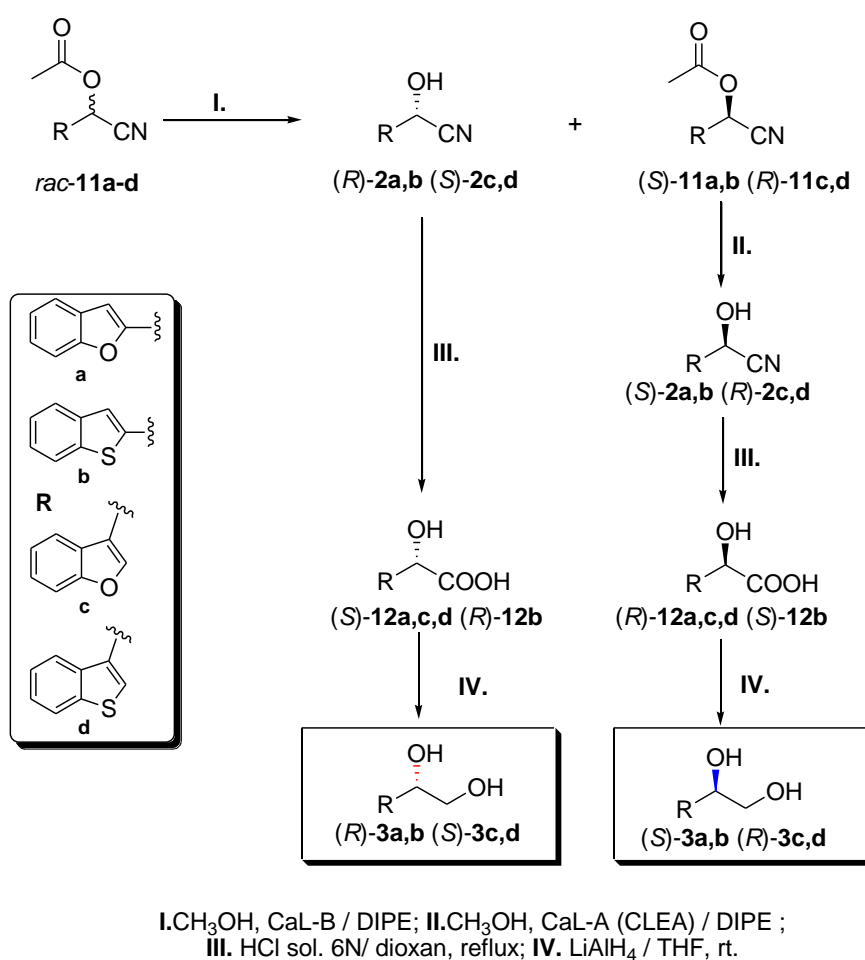
Nr.	Substrat	Enzimă	Solvent	Timp (h)	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	ee <sub>s</sub> (%)
1	<i>rac-2a</i>	Lipaza AK	diclorometan	15	50	98	98
2	<i>rac-2b</i>	Lipaza AK	diclorometan	13	50	97	97
3	<i>rac-2c</i>	Lipaza AK	diclorometan	18	46	92	79
4	<i>rac-2d</i>	Lipaza AK	DIPE	23	41	82	57
5	<i>rac-11a</i>	CaL-B	DIPE	2	50	> 99.5	>99.5
6	<i>rac-11b</i>	CaL-B	DIPE	1	50	> 99.5	> 99.5
7	<i>rac-11c</i>	CaL-B	DIPE	13	50	98	98
8	<i>rac-11d</i>	CaL-B	DIPE	21	49	97	93

Rezultatele optime ale metanolizei mediate de CaL-B a *rac-11a-d* sunt prezentate în Tabelul 3, nr. 5-8. A fost observată aceeași dependență a vitezei și stereoselectivității reacției de structura acetajilor cianohidrinelor *rac-11a-d* ca și în cazul acilării enzimatică a cianohidrinelor *rac-2a-d*. Astfel, în timp ce rezoluția cinetică a acetajilor de benzofuran-2-il- și benzo-[*b*]tiofen-2-il-cianohidrinelor (*rac-11a,b*) decurge cu enantioselectivitate ridicată (Tabel 3, nr. 5,6), viteza de reacție și enantiopuritățile produșilor sunt mai mici la utilizarea acetajilor benzofuran-3-il- și benzo[*b*]tiofen-3-il-cianohidrinelor (*rac-11c,d*) ca și substrat (Tabel 3, nr. 7, 8).

#### 4.1.3. Sinteza preparativă a (*R*)- și (*S*)- heteroaril-1,2-etandiolilor 3a-d

Folosind procedura prezentată în Schema 6 a fost realizată sinteza preparativă a (*R*)- și (*S*)- heteroaril-1,2-etandiolilor, pornind de la acetajii cianohidrinelor racemice. Pentru că metanoliza *rac-11a-d* catalizată de CaL-B decurge cu stereoselectivitate mai mare decât acilarea enzimatică a *rac-2a-d*, în continuare a fost realizată rezoluția preparativă a *rac-11a-d* folosind aceeași reactivi, enzimă și solvent ca în cazul reacțiilor la scară analitică (Tabel 4A). Toate diluțiile, raportul substrat-biocatalizator și condițiile de reacție au fost identice cu cele ale reacțiilor la scară analitică. Reacțiile au fost monitorizate prin HPLC sau TLC, fiind oprite la o conversie de aproximativ 50% prin îndepărtarea enzimei prin filtrare.

Acetații cianohidrinelor de înaltă enantiopuritate astfel obținuți ((*S*)-**11a,b** și (*R*)-**11c,d**) au fost transformați cantitativ în cianohidrinele corespunzătoare ((*S*)-**2a,b** și (*R*)-**2c,d**) prin metanoliza mediată de CaL-A-CLEA în DIPE (Schema 6, Tabel 4B). Datele referitoare la randamente, excese enantiomerice și rotațiile optice ale compușilor formați în aceste reacții sunt prezentate în Tabelul 5. În continuare, ambii enantiomeri ai cianohidrinelor heteroaromatice (*R*)- și (*S*)-**2a-d** au fost hidrolizați chimic în  $\alpha$ -hidroxiacizii corespunzători (*R*)- și (*S*)-**12a-d**. După izolare, compușii din urmă au fost reduși cu LiAlH<sub>4</sub> cu obținerea cu randamente bune și grad de puritate optică ridicată (Tabel 5) a ambilor enantiomeri ai heteroaril-1,2-etandiolilor, (*R*)- și (*S*)-**3a-d**.



**Schema 6.** Sinteza preparativă a (*R*)- și (*S*)-heteroari cianohidrinelor **2a-d** și transformarea lor în heteroaril-1,2-etandiolii **3a-d**.

Configurația absolută a noilor benzofuranil- și benzo[*b*]tiofenil-cianohidrine, respectiv a acetaților acestora fiind necunoscută, prin compararea sensului rotației optice și a timpului de retenție de la separarea cromatografică a enantiomerilor diolilor **3a-d** cu cele descrise în

literatură<sup>63</sup> s-a determinat configurația absolută a noilor compuși enantiopuri și selectivitatea reacțiilor enzimatic studiate.

**Tabelul 4.** Date despre produșii obținuți din rezoluția cinetică mediată de CaL-B (A) și pentru produșii obținuți din metanoliza acetatilor cianohidrinelor enantiopure mediată de CaL-A (CLEA) (B)

	A			B				B			
	Rand.*	ee	$[\alpha]_D^{25}$	Rand.*	ee	$[\alpha]_D^{25}$		Rand.**	ee	$[\alpha]_D^{25}$	
( <i>R</i> )- <b>2a</b>	48	98	-53.9	( <i>S</i> )- <b>11a</b>	48	98	-54.9	( <i>S</i> )- <b>2a</b>	96	99	+55.7
( <i>R</i> )- <b>2b</b>	48	98	-26.3	( <i>S</i> )- <b>11b</b>	48	98	-30.8	( <i>S</i> )- <b>2b</b>	93	>99.5	+27.9
( <i>S</i> )- <b>2c</b>	49	96	-37.4	( <i>R</i> )- <b>11c</b>	46	98	+11.9	( <i>R</i> )- <b>2c</b>	95	99	+40.5
( <i>S</i> )- <b>2d</b>	48	96	-47.8	( <i>R</i> )- <b>11d</b>	46	97	+24.8	( <i>R</i> )- <b>2d</b>	96	>99.5	+51.5

raportat la *rac*-**11a-d**; \*\* raportat la (*S*)-**11a,b** și (*R*)-**11c,d**

**Tabelul 5.** Sinteza preparativă a ambilor enantiomeri ai heteroaryl-1,2-etandiolilor **3a-d**

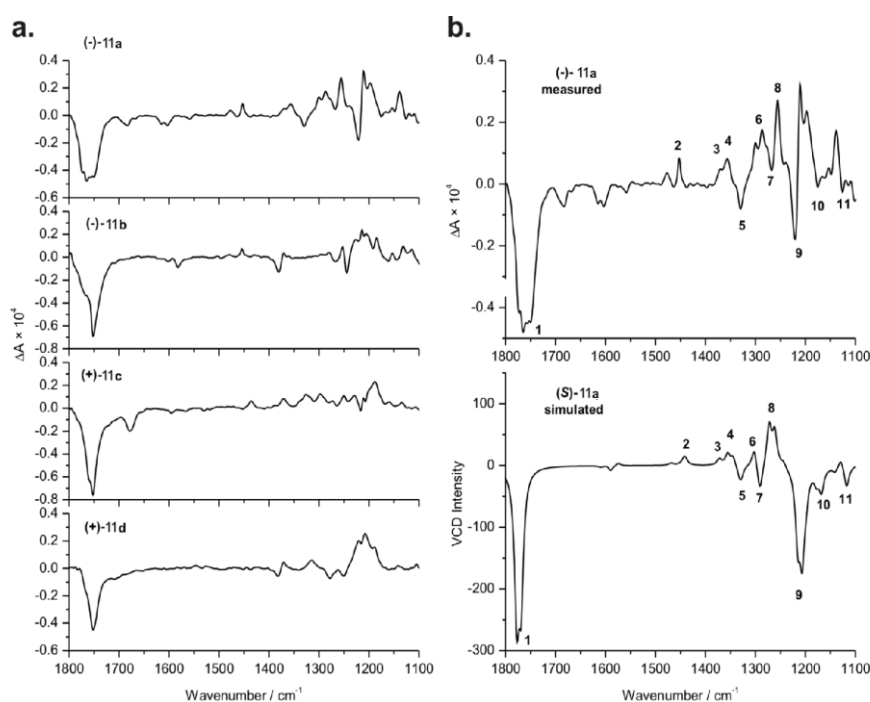
<b>3</b>	<i>(S)</i> - <b>3a-d</b>			<i>(R)</i> - <b>3a-d</b>		
	Rand.	ee	$[\alpha]_D^{20}$	Rand.	ee	$[\alpha]_D^{20}$
<b>a</b>	46	97	-28.2	46	97	+28.2
<b>b</b>	46	96	-13.1	47	96	+13.1
<b>c</b>	42	91	-24.6	48	95	+25.7
<b>d</b>	31	94	-44.8	47	93	+44.3

#### 4.1.4. Determinarea configurației absolute prin măsurători VCD

Configurația absolută a acetatilor cianohidrinelor optic active obținute din metanoliza *rac*-**11a-d** a fost determinată și prin intermediul măsurătorilor de dicroism circular vibrațional (VCD), combinat cu calcule de chimie cuantică. Spectrul VCD în CDCl<sub>3</sub> a (-)-**11a**, (-)-**11b**, (+)-**11c** și (+)-**11d** cu configurație necunoscută, obținute din metanoliza mediată de CaL-B, este prezentat în Figura 1a. Toate cele patru spectre sunt dominate de o bandă negativă  $\nu_{C=O}$  a carbonilului esteric la  $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ , și au mai multe sau mai puține motive similare în regiunea amprentei digitale ( $1600\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ ). Aceasta indică faptul că natura heteroatomului (O sau S) și poziția ramificației heterociclului nu influențează poziția și semnul bandei VCD a esterului  $\nu_{C=O}$  și are o influență moderată asupra spectrului VCD global. Aceasta se poate explica prin faptul că moleculele cu structuri similare au regiuni similare în spectrul VCD, particular acelea care derivă din vibrațiile unor părți structurale identice ale moleculei, care nu sunt cuplate cu vibrațiile părților structurale diferite.<sup>94</sup>

Determinarea configurației absolute s-a bazat pe compararea spectrului măsurat cu cel modelat pentru compusul (-)-**11a** (Figura 1b).

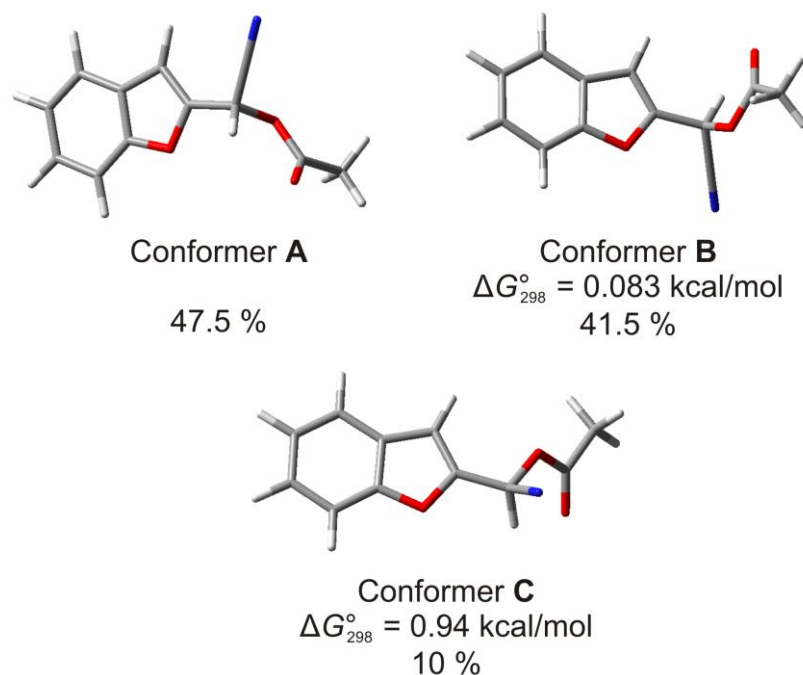
Calcululele au fost realizate pentru enantiomerul (*S*)-**11a**, fiind utilizați în simularea spectrului VCD teoretice doar trei conformeri, cei cu energia minimă (Figura 2), cu un total de populație de 99%. Similaritatea spectrului VCD măsurat cu cel calculat fiind bună, atât în termenul valorii lungimilor de undă cât și în semnul benzilor VCD (perechile similare fiind marcate cu un număr corespunzător pe Figura 1b), permite atribuirea certă a configurației absolute, respectiv a configurației *S*.



**Figura 1.**

*a.* Spectrul VCD al compușilor (-)-**11a**, (-)-**11b**, (+)-**11c** și (+)-**11d** măsurat în  $\text{CDCl}_3$ ; *b.* Spectrul VCD al (-)-**11a** măsurat în  $\text{CDCl}_3$  (sus) în comparație cu spectrul VCD simulat al (*S*)-**11a** (jos), obținut ca suma spectrelor calculate a conformerilor, în funcție de populațiile lor. Benzile similare sunt marcate cu numere.





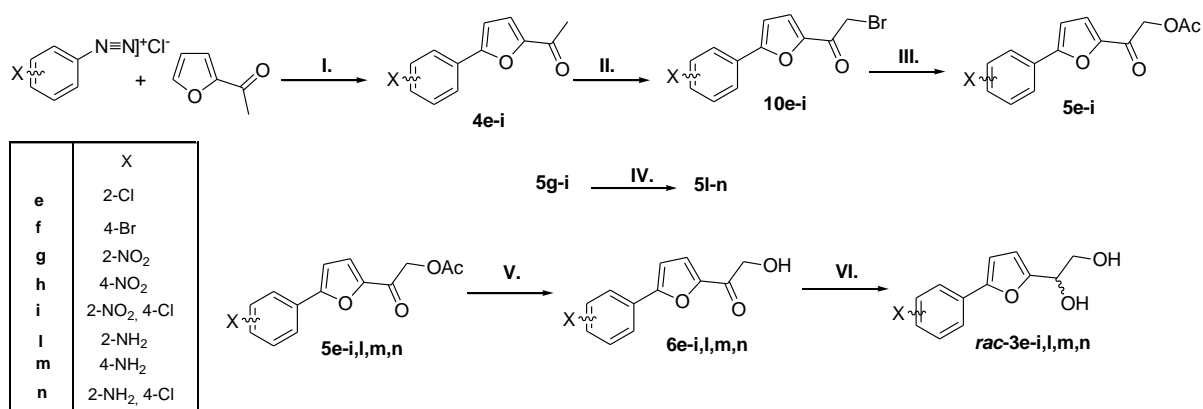
**Figura 2.**

*Structurile modelate ale celor trei conformeri cu abundență maximă ai (S)-IIa și valorile energiei libere relative Gibbs și a populațiilor estimate*

## 4.2 Biotransformarea mediata de drojdie a $\alpha$ -hidroxi- și $\alpha$ -acetoximetil- 5-fenlfuran-2-il-etanonele 5,6e-i,l,m,n

### 4.2.1 Sinteza substraturilor 5,6e-i,l,m,n

Sinteza substraturilor a fost realizată în conformitate cu metodele chemoenzimatice descrise anterior.<sup>63</sup> Heteroaril-etanonele **4e-i** utilizate ca și materii prime au fost obținute prin metoda Meerwein<sup>95</sup> din sărurile de diazoniu ale anilinelor corespunzătoare și 2-acetilfuran. Prin  $\alpha$ -bromurarea cetonelor **4e-i** astfel obținute și transformarea lor ulterioară cu acetat de sodiu ca reactant în dioxan ca solvent și eter corona 18C6 ca și catalizator de transfer interfazic au fost obținute  $\alpha$ -acetoxi-metilcetonele **5e-i**.  $\alpha$ -acetoximetilcetonele **5l-n** au fost preparate din  $\alpha$ -acetoximetilcetonele **5g-i** prin reducerea selectivă a grupării nitro cu  $\text{SnCl}_2$  în etanol. În continuare, prin etanoliza enzimatică a **5e-i,l,m,n**, au fost sintetizate cu randamente excelente  $\alpha$ -hidroximetilcetonele **6e-i,l,m,n**. În final, acești derivați au permis sinteza heteroaril-1,2-etandiolilor racemici *rac*-**3e-i,l,m,n** prin reducere cu borohidrua de sodiu (Scheme 7).

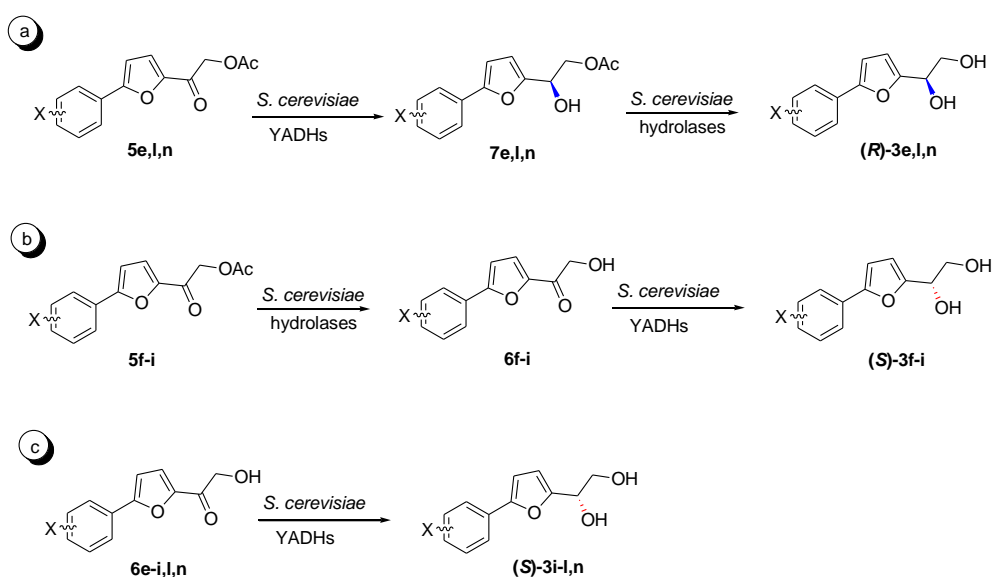


**Schema 7.** Sinteza cetonelor prochirale **5,6e-i,l,m,n** și a 1,2-heteroaril-etandiolilor racemici **3e-i,l,m,n**. I.  $\text{CuCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ , acetonă; II. tribromura de piridiniu/ $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $80^\circ\text{C}$ ; III.  $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ , 18C6/1,4-dioxan, reflux; IV.  $\text{SnCl}_2/\text{EtOH}$ , ultrasunete; V. Novozyme 435/ $\text{EtOH}$ ; VI.  $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$

În continuare a fost elaborată metoda de separare cromatografică a enantiomerilor compușilor racemici **rac-3e-i,l,m,n** în vederea determinării stereoselectivității biotransformărilor mediate de drojdie (Scheme 8).

#### 4.2.2. Transformări celulare mediate de drojdie

În prima etapă a fost realizată transformarea mediată de drojdie a compușilor **5,6e-i** în condiții fermentative și nefermentative (Tabelul 6). Apoi, în scopul creșterii enantiopurității produșilor, au fost alese cele mai bune condiții și a fost studiat efectul anumitor aditivi (Tabelul 7) care pot influența stereoselectivitatea transformărilor celulare, așa cum s-a prezentat deja în capitolul 2.3.5.4. și în studii anterioare.<sup>96,97</sup>



**Schema 8.** Biotransformarea stereoselectivă a cetonelor **5,6e-i,l,n** mediată de drojdie

În cazul fiecărui substrat s-a observat o influență diferită asupra selectivității reacției. De exemplu, la bioreducerea derivatului **5e** cea mai mare selectivitate s-a obținut în prezența alcoolului alilic și a bromoacetatului de etil (Tabelul 7, nr. 3 și 6), în timp ce în cazul derivatului **6i** acești aditivi au determinat scăderea selectivității reacției de bioreducere (Tabelul 7, nr. 3 și 6), cea mai înaltă selectivitate fiind înregistrată în prezența ionilor  $Mg^{2+}$  (Tabelul 7, nr.7). La biotransformarea compușilor **5g,h** cele mai bune rezultate (Tabelul 8, nr. 4 și 5) s-au obținut la utilizarea  $MgCl_2$  și a dimetil-sulfoxidului (DMSO) ca aditivi. În cazul derivaților **5f,i** și **6e** nu s-a constatat nici o îmbunătățire, indiferent de aditivul utilizat, iar pentru **6e** sistemul nefermentativ a decurs mai selectiv (Tabelul 6, nr. 6), în timp ce la **5f,i** sistemul fermentativ (Tabelul 6, nr. 2 și 5) a fost optim.

**Tabelul 6.** Biotransformarea cetonelor **5,6e-i** în condiții fermentative și nefermentative

Nr.	Substrat	Produs	ee (%)		Rdt <sup>c</sup> (%)	
			a	b	a	b
1	<b>5e</b>	( <i>R</i> )- <b>3e</b>	67	60	81	85
2	<b>5f</b>	( <i>S</i> )- <b>3f</b>	58	46	58	49
3	<b>5g</b>	( <i>S</i> )- <b>3g</b>	80	73	85	79
4	<b>5h</b>	( <i>S</i> )- <b>3h</b>	87	69	90	60
5	<b>5i</b>	( <i>S</i> )- <b>3i</b>	39	37	80	75
6	<b>6e</b>	( <i>S</i> )- <b>3e</b>	90	97	89	90
7	<b>6f</b>	( <i>S</i> )- <b>3f</b>	41	36	65	61
8	<b>6g</b>	( <i>S</i> )- <b>3g</b>	83	79	70	59
9	<b>6h</b>	( <i>S</i> )- <b>3h</b>	60	52	75	72
10	<b>6i</b>	( <i>S</i> )- <b>3i</b>	75	52	61	60

a. Sistem fermentativ; b. Siste nefermentativ; <sup>c</sup>. După 3 zile

**Tabelul 7.** Influența aditivilor asupra stereoselectivității bioreducerii cetonelor **5e** și **6i**

Nr	Aditiv	ee (%)		Rdt (%)		Timp (h)
		( <i>S</i> )- <b>3i</b>	( <i>R</i> )- <b>3e</b>	( <i>S</i> )- <b>3i</b>	( <i>R</i> )- <b>3e</b>	
1	A <sup>a</sup>	75	67	58	85	48
2	B <sup>a</sup>	52	60	52	81	48
3	Alcool alilic <sup>b</sup>	40	89	91	93	48
4	<i>n</i> -hexan <sup>b</sup>	71	51	49	87	48
5	L-Cisteina <sup>b</sup>	77	66.7	58	85	48
6	Bromoacetat de etil <sup>b</sup>	20	93	47	91	48
7	$MgCl_2$ <sup>b</sup>	87	71.9	55	89	48

A. Sistem fermentativ; B. Sistem nefermentativ;

<sup>a</sup> fără aditiv; <sup>b</sup> în sistem fermentativ

În general, transformarea celulară a  $\alpha$ -acetoximetilcetonelor presupune două procese concurente: reducerea grupării carbonilice catalizată de alcooldehidrogenazele din drojdie (yeast alcohol dehydrogenases- YADHs) și respectiv hidroliza enzimatică a grupării  $\alpha$ -acetoxi (Schema 8a). În lucrările anterioare s-a demonstrat că reducerea este mai rapidă decât hidroliza.<sup>63</sup>

Așa cum era de așteptat, biotransformarea  $\alpha$ -acetoximetilcetonelor **5e** și a  $\alpha$ -hidroxi-etanonelor **6e** decurge cu enantiopreferință diferită și cu selectivități înalte (Tabelul 6, nr. 1 și 6). Totuși, în contrast cu majoritatea rezultatelor raportate anterior<sup>63,75c,98</sup>, la biotransformarea  $\alpha$ -acetoximetilcetonelor **5g-i** (Schema 8b, Tabelul 6, nr. 2-5) și a  $\alpha$ -hidroxi-etanonelor **6g-i** (Schema 8c, Tabelul 6, nr. 7-10) s-a observat același control stereochemic și selectivități mai reduse ale procesului decât în cazul transformării celulare a compușilor **5,6e**.

În cazul derivaților **5f** și **6f** (Tabelul 6, nr. 2 și 7) o explicație posibilă ar fi prezența în drojdie a câtorva alcooldehidrogenaze, atât (*R*)- cât și (*S*)- specifice, cu activități apropiate pentru acest tip de substrat, sau faptul că impedimentele sterice semnificative datorate atomului de brom prezent favorizează acțiunea unei singure enzime, dar stereoselectivitatea acesteia este redusă. E important de menționat aici că prezența lui **6f** nu a putut fi detectată în timpul biotransformării compusului **5f**, ceea ce demonstrează că viteza reacției de reducere este considerabil mai mare decât cea a hidrolizei grupării esterice.

La biotransformarea  $\alpha$ -acetoximetilcetonelor **5g-i** (Tabelul 6, nr. 3-5) și a  $\alpha$ -hidroximetilcetonelor **6g-i** (Tabelul 6, nr. 8-10) s-a obținut de asemenea aceeași preferință stereochemică, ceea ce ar putea fi explicat prin activitatea mai mare a hidrolazelor comparativ cu cea a alcooldehidrogenazelor din drojdie față de  $\alpha$ -acetoximetilcetonele **5g-i**. Monitorizând biotransformarea **5g-i** în timp a fost observată formarea hidroxietanonelor **6g-i**, ceea ce demonstrează că în acest caz hidroliza este mai rapidă decât reducerea (Schema 8b).

S-a presupus că efectul electronoatrăgător puternic al grupării nitro reduce densitatea electronică a atomului de C esteric, astfel reactivitatea sa este mărită și hidroliza enzimatică este favorizată.

În scopul demonstrării acestei ipoteze gruparea nitro a cetonelor prochirale **5g-i** a fost transformată prin reducere selectivă în grupare aminică în cetonile **5l-n** (Schema 7, etapa IV) și apoi acestea au fost transformate prin alcooliză enzimatică în **6l-n**. Așa cum ne așteptam, biotransformarea mediată de drojdie a  $\alpha$ -acetoxicetonelor **5l,n** și a  $\alpha$ -hidroxi-cetonelor **6l,n**, toate având ca substituent o grupare aminică, are loc cu enantiopreferință opusă și în timpul transformării cetonelor **5l,n** nu a fost detectată prezența  $\alpha$ -hidroxietanonelor **6l,n** nici măcar în urme.

**Tabelul 8.** Biotransformarea la scară preparativă a heteroarilcetonelor **5e-i,l,n** și **6e-i,l,n** mediată de drojdie

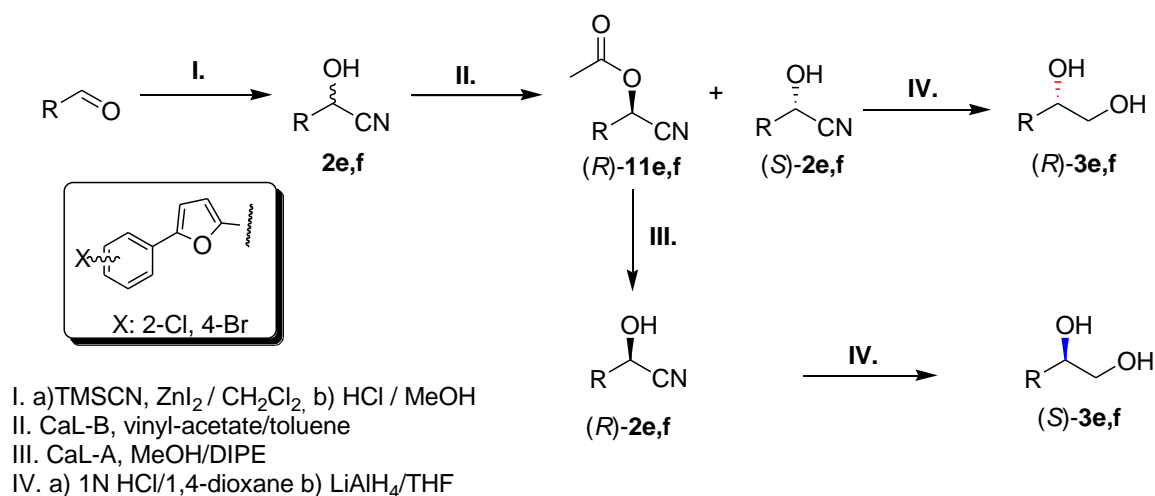
Nr.	Substrat	Produs	ee (%)	Timp de reacție (zile)	Rdt. (%)	$\alpha_D^{25}$
1	<b>5e</b>	( <i>R</i> )- <b>3e</b> <sup>a</sup>	94	2	88	+ 45
2	<b>6e</b>	( <i>S</i> )- <b>3e</b> <sup>d</sup>	97	2	90	-48.1
3	<b>5f</b>	( <i>S</i> )- <b>3f</b> <sup>c</sup>	50	2	60	- 17.1
4	<b>6g</b>	( <i>S</i> )- <b>3g</b> <sup>d</sup>	91	2	75	- 61
5	<b>5h</b>	( <i>S</i> )- <b>3h</b> <sup>e</sup>	88	3	79	- 41.7
6	<b>6i</b>	( <i>S</i> )- <b>3i</b> <sup>a</sup>	87	3	82	- 49
7	<b>5l</b>	( <i>R</i> )- <b>3l</b> <sup>c</sup>	9	2	65	+ 4.1
8	<b>6l</b>	( <i>S</i> )- <b>3l</b> <sup>c</sup>	80	2	72	- 28.1
9	<b>5n</b>	( <i>R</i> )- <b>3n</b> <sup>c</sup>	29	2	56	+ 9.8
10	<b>6n</b>	( <i>S</i> )- <b>3n</b> <sup>c</sup>	41	2	78	- 16.1

<sup>a</sup> Sistem fermentativ cu bromoacetat de etil ca aditiv; <sup>b</sup> Sistem nefermentativ (fără zaharoză); <sup>c</sup> Sistem fermentativ; <sup>d</sup> Sistem fermentativ cu Mg<sup>2+</sup> ca aditiv; <sup>e</sup> Sistem fermentativ cu DMSO ca aditiv

Cu toate acestea, atât în sistem fermentativ cât și nefermentativ produșii obținuți au avut purități optice reduse (Tabelul 8, nr. 7-10) și utilizarea aditivilor nu a permis îmbunătățirea acestora. Mai mult chiar, (*R*)- și (*S*)-1-(5-aminofenil-furan-2-il)etan-1,2-diolii obținuți **3l-n** sunt compusi sensibili, instabili. Practic, diolul **3m** s-a descompus complet *in situ* în timpul reacției.

#### 4.2.3. Configurația absolută a diolilor sintetizați

Deoarece configurația absolută a (+)- și (-)-diolilor obținuți a fost necunoscută, ambii enantiomeri ai diolilor **3e,f** au fost sintetizați din (*R*)- și (*S*)-cianhidrinelele<sup>90a</sup> **2e,f** conform Schemei 9.



**Schema 9.** Schema de retrosinteză utilizată la determinarea configurației absolute

Configurația absolută a produșilor a fost stabilită prin compararea timpilor de retenție cromatografică și a sensul rotației optice a diolilor obținuți prin cele două metode distincte. Același semn al rotației optice a (*R*)-**3e,l,n** și a altor (*R*)- 1-(5-fenilfuran-2-il)etan-1,2-dioli<sup>99,100</sup> a permis atribuirea configurației absolute a enantiomerilor dextrogiri prezentați aici.

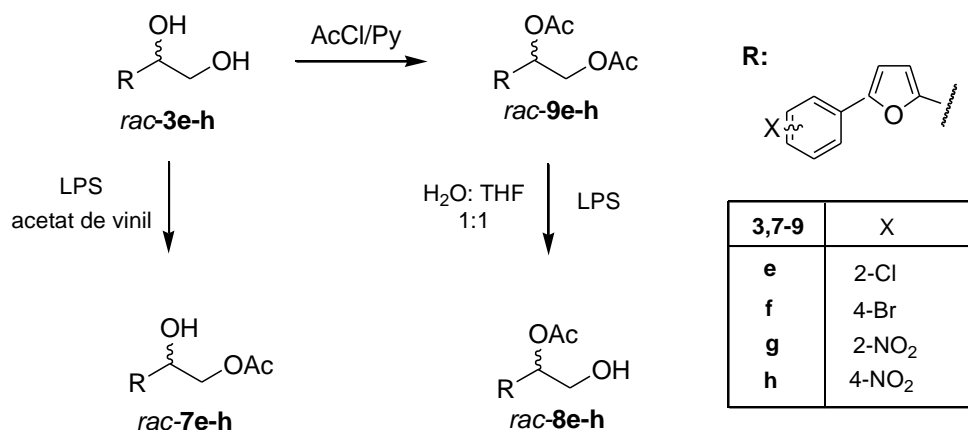
#### 4.3. Rezoluția cinetică mediată de lipaze a 5-fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor

La sinteza diolilor prin biotransformarea mediată de drojdie a  $\alpha$ -acetoximetil-5-fenilfuran-2-il-etanonelelor **5e-i** și a  $\alpha$ -hidroximetil-5-fenilfuran-2-il-etanonelelor **5e-i** prezentată anterior nu s-au obținut rezultate satisfacatoare, respectiv s-au format unii produși cu purități optice scăzute, astfel metoda nu poate fi considerată corespunzătoare pentru obținerea ambilor enantiomeri ai 1,2-etanediolilor urmăriți **3e-i**.

Din acest motiv, interesul nostru s-a îndreptat în continuare spre utilizarea rezoluției cinetice cu lipaze în scopul obținerii ambilor enantiomeri ai fenilfuran-2-il-etan-1,2-dioli cu puritate optică ridicată.

##### 4.3.1. Prepararea substraturilor racemice *rac*-**3,7,8,9e-h**

1-(5-fenilfuran-2-il)etan-1,2-dioli racemici *rac*-**3e-h** au fost obținuți printr-o metodă chemoenzimatică descrisă anterior (Schema 7). Aceștia au fost acilați chimic la diacetații racemici *rac*-**9e-h** (Schema 10). În scopul evitării necesității utilizării unor grupări protectoare pentru acilarea regioselectivă a *rac*-**3e-h** și deoarece sinteza chimică a acetaților de 2-hidroxi-1-(5-fenilfuran-2-il)etil racemici *rac*-**7e-h** și a acetaților de 2-hidroxi-2-(5-fenilfuran-2-il)etil racemici *rac*-**8a-d** prin metodele descrise anterior<sup>56</sup> a eșuat, am încercat dezvoltarea unor metode enzimatiche regioselective, lipsite complet de stereoselectivitate. În conformitate cu studiile anterioare<sup>47-50,52,54</sup>, LPS s-a dovedit a fi o enzimă înalt regioselectivă pentru acilarea enzimatică a 1,2-etanediolilor racemici *rac*-**3e-h**, conducând la obținerea exclusivă a *rac*-**7e-h** (Schema 10). Chiar și după timp îndelungat de reacție nu a fost posibilă identificarea *rac*-**9e-h** și/sau *rac*-**8e-h** în amestecul de reacție. Aceste rezultate sunt totuși în contrast cu cele deja prezentate în literatură<sup>47-50,52,54</sup>, când s-a semnalat și o reacție de acilare selectivă suplimentară, cu obținerea finală a enantiomerilor diferiți ai derivaților diacetilați și monoacetilați ai 1,2-diolilor.



**Schema 10.** Sinteza chemoenzimatică a *rac-7,8,9e-h*

Catalizatorul optim pentru sinteza acetatilor de 2-hidroxi-2-(5-fenilfuran-2-il)etil racemici s-a dovedit a fi LPS. Astfel, prin hidroliza mediată de LPS a diacetatului racemic *rac-9e-h* în amestec THF-apă (1:1, v/v), se formează cantitativ *rac-8e-h* (Schema 10). Nici în acest caz nu au fost semnalati nici măcar în urme produși secundari în amestecul de reacție.

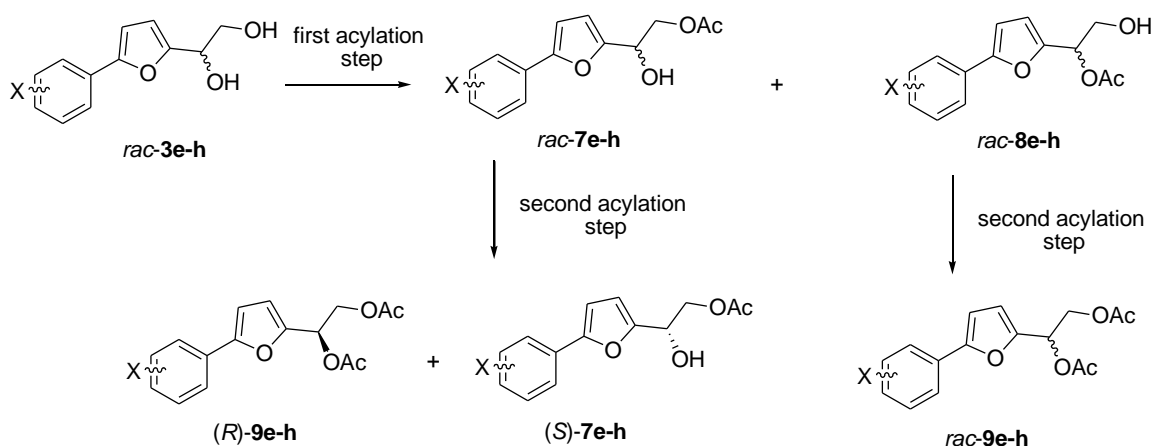
Trebuie amintit aici că procesele decurg similar și la scară preparativă, etapele de izolare și purificare ale produșilor urmăriți fiind simplu de realizat, ceea ce permite obținerea ambilor derivați monoacetați ai fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor *rac-7,8e-h* printr-o metodă accesibilă. Astfel a fost posibilă evitarea metodelor chimice de sinteză<sup>51,53</sup>, care necesită reactivi și condiții de reacție speciale.

În scopul sintezei fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor optic puri a fost investigată apoi rezoluția enzimatică cinetică a compușilor racemici *rac-3,7,8,9e-h*.

#### 4.3.2. Acilarea enzimatică a diolilor racemici *rac-3e-h*

În prima etapă a fost studiată acilarea enzimatică a 1,2-etandiolilor racemici *rac-3e-h*. Astfel, dacă s-a utilizat acetat de vinil și mai mulți solvenți, majoritatea lipazelor testate cum ar fi CaL-B (Novozyme 435, lipaza B din *Candida antarctica*), LAK, CrL (lipaza din *Candida rugosa*) sau lipaza din *Mucor javanicus* au prezentat activitate redusă sau chiar lipsa acesteia. Numai LPS și PPL (lipaza din pancreasul porcine) au avut o activitate moderată, catalizând acilarea regioselectivă a *rac-3e-h*, cu formarea acetatilor de 2-hidroxi-2-(5-fenilfuran-2-il)etil racemici *rac-7e-h*. CaL-A (lipaza A din *Candida antarctica*) catalizează în prima etapă acilarea *rac-3e-h* cu regioselectivitate redusă, formând atât *rac-7e-h* cât și *rac-8e-h* într-un raport aproximativ de 4:1. În etapa a doua, derivații monoacetați formați au fost

apoi acilați selectiv de CaL-A. Așa cum a fost prezentat în paragraful următor, în timp ce acilarea *rac-7e-h* a decurs stereoselectiv, *rac-8e-h* au fost transformați nestereoselectiv în diacetații racemici *rac-9e-h* cu purități optice diminuate (ee mici pentru (*R*)-*9e-h*), așa cum se observă în Schema 11. Astfel, în continuare s-a trecut la rezoluția cinetică enzimatică a heteroaril-etan-1,2-diolilor racemici *rac-3e-h*.



**Schema 11.** Acilarea fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor racemici *rac-3e-h* mediată de CaL-A

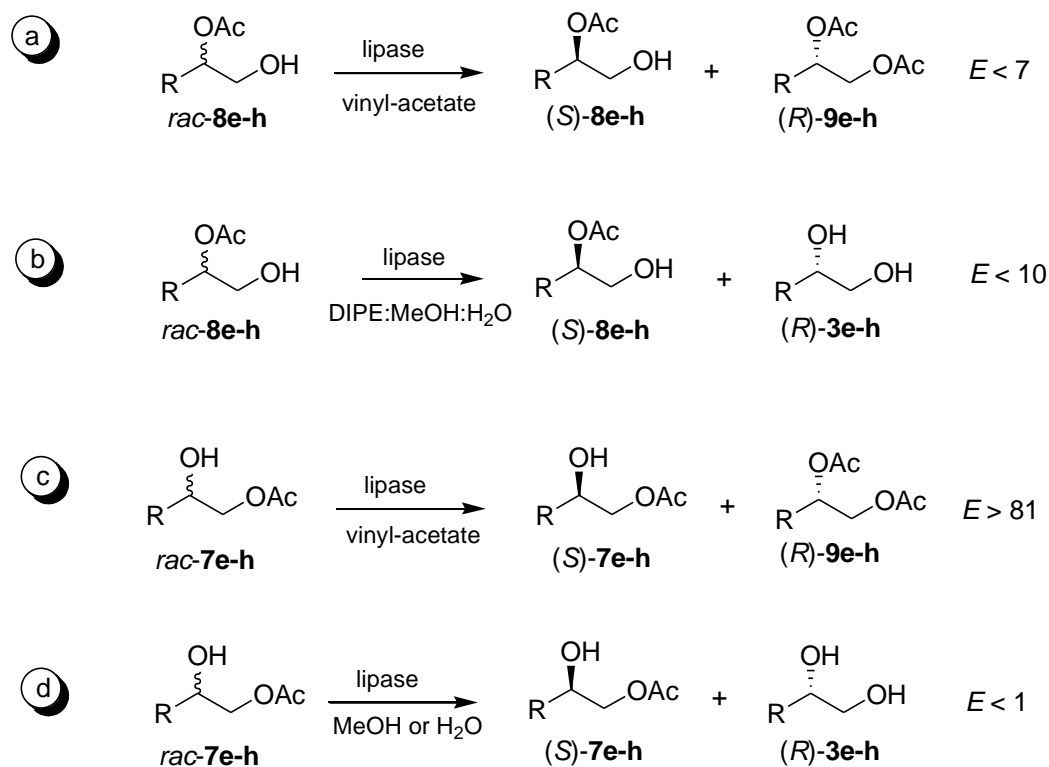
#### 4.3.3. Acilarea, alcooliza și hidroliza enzimatică a monoacetaților secundari și primari *rac-7,8e-h*

Se știe că în mediul lor natural lipazele catalizează hidroliza 1,3-regioselectivă a triacilgliceridelor la interfața apă-lipidă. În consecință, în continuare a fost studiată rezoluția enzimatică cinetică cu lipaze a acetaților racemici de 2-hidroxi-2-(5-fenilfuran-2-il)etil *rac-8e-h*.

Au fost testate mai întâi lipazele potențial utile în reacția de acilare cu acetat de vinil (8 eq.) în diferiți solvenți organici a acetatului racemic de 1-(5-(4-bromofenil)furan-2-il)2-hidroxi-2-*rac-8f*, utilizat ca și compus model. Majoritatea lipazelor au arătat o activitate mare în toți solvenții testați, cu excepția lipazei din *Mucor javanicus* și a PPL care au fost inactivă. Stereoselectivitatea reacțiilor enzimatică a fost influențată de natura solventului, rezultate optime fiind obținute în eter dizopropilic (DIPE); totuși, selectivitatea a ramas scăzută ( $E < 7$ , Schema 12a), așa cum se observă în Tabelul 9. Mai mult chiar s-a observat în toate încercările că LAK a prezentat o activitate mare, dar acțiunea ei a fost total neselectivă. O explicație posibilă ar fi faptul că gruparea alcoolică este îndepărtat de centrul chiral, astfel recunoașterea



sterică de către centrul catalitic al enzimei a celor doi enantiomeri ai substratului este dificilă. Interesant, CaL-B a prezentat o enantiopreferință opusă față de toate comparativ cu celelalte lipaze, catalizând formarea (*S*)-diacetaților și a monoacetaților secundari (*R*), ambii cu excese enantiomerice moderate (Tabelul 9, nr. 3).



**Schema 12.** Rezoluția cinetică enzimatică a monoacetaților racemici ai diolilor

**Tabelul 9.** Acilarea enzimatică cu acetat de vinil a *rac-8f* în DIPE

Nr.	Enzima	Timp	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	ee <sub>s</sub> (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	2h	30	31	13	2
2	LPS	2h	61	52	81	7
3	CaL-B*	2h	61	46	72	6
4	CrL	16 h	54	49	58	5

<sup>a</sup> tip anti-Kazlauskas

Și în cazul alcoolizei sau hidrolizei enzimatică a monoacetaților secundari racemici *rac-8f* au fost obținute rezultate nesatisfăcătoare. Atât majoritatea lipazelor, cât și alte hidrolaze cum ar fi PLE, Acilaza I și esteraza din *Rhizopus oryzae* au fost inactivi catalitic în alcool pur (metanol, etanol, propanol și butanol) sau cu 8 eq. de nucleofil în solvenții organici prezentați anterior. Rezultate similare s-au obținut și în amestec THF-apă (1:1, v/v). S-a observat însă un fenomen interesant, și anume un proces enzimatic mixt de alcooliză-hidroliză

cu enantioselectivități moderate ( $E < 10$ ), conducând la (*R*)-**3f** (ee: 65%) și (*S*)-**8f** (ee: 35%), dacă reacția a fost realizată în amestec DIPE: MeOH : apă (1:1:2, v/v) în prezența LPS (Schema 12b). Rezultate similare s-au obținut și în cazul celorlalte substraturi *rac*-**8e,g,h**.

În continuare a fost realizată rezoluția enzimatică prin acilare a monoacetaților primari *rac*-**7e-h** (Schema 12c). Ca și compus model pentru testarea lipazelor disponibile a fost selectat acetatul racemic de 2-hidroxi-2-(5-(2-nitrofenil)furan-2-il)etil *rac*-**7g**. Toate experimentele au fost realizate în DIPE cu acetat de vinil (8 eq.) ca și reactiv de acilare. Dintre toate enzimele testate, doar CaL-A (Tabelul 10, nr. 1-3) și LAK (Tabelul 10, nr. 4) au fost eficienți, în timp ce lipaza din *Mucor javanicus* și LAK au fost complet lipsite de activitate. CaL-A a fost mai activă decât LAK, dar aceasta din urmă s-a dovedit mai selectivă. În afară de CaL-A au fost testate și enzima imobilizată pe celită (Tabelul 10, nr. 1), CLEA (lipaza A din *Candida antarctica* reticulată cu glutaraldehidă, Tabelul 10, nr. 2) sau IMMCaA T2-150 (lipaza imobilizată covalent, Tabelul 10, nr. 3), însă acestea s-au dovedit ineficiente din punct de vedere al stereoselectivității lor.

**Tabelul 10.** Reacția de acilare a monoacetaților primari *rac*-**7g** racemici catalizată de lipaze

Nr.	Enzimă	Timp (h)	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	ee <sub>s</sub> (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	6	47	91	76	49
2	CaL-A (CLEA)	4	40	85	56	22
3	IMMCaA T2-150	4	34	73	37	9
4	LAK	24	43	94	71	69
5	CaL-B	16	3	50	2	3
6	CrL	16	21	53	14	4

Acest comportament al CaL-A este în concordanță cu preferința *sn*-2 a acestei enzime în reacția cu triacilglicerolii. Cu toate acestea CaL-A a fost doar rar utilizată în reacții enantioselective, ea fiind considerată în general o enzimă foarte activă, dar neselectivă<sup>101</sup>, valori ridicate ale *E* obținându-se doar pentru substraturi cu grupări voluminoase vicinale centrului stereogenic<sup>90b,c,102,103</sup>.

Mai surprinzător este comportamentul diferit al LAK comparativ cu observațiile raportate anterior, ea fiind considerată o lipază foarte selectivă pentru acilarea monoacetaților secundari, însă cu activitate și selectivitate scăzută la acilarea acetaților primari<sup>51</sup>.

În continuare a fost studiat efectul solventului utilizat la acilare, în prezența celei mai active lipaze (CaL-A, LAK). S-a evidențiat un efect puternic atât asupra vitezei de reacție, cât și a selectivității. Alături de diferiți solvenți organici au fost testate și lichidele ionice,

prezentate deja anterior ca solvenți eficienți în reacțiile de acilare catalizate de LPS a unor fenil-1,2-etandoli substituiți,<sup>54</sup> (Tabelul 11, nr. 7, 14) dar rezultatele obținute au fost în cazul nostru nesatisfăcătoare (Tabelul 11, nr. 7, 14). În cazul reacțiilor mediate de LAK rezultate optime s-au obținut în DIPE (Tabelul 11, nr. 9).

**Tabelul 11.** Influența naturii solventului asupra reacției de acilare a *rac-7g* mediată de CaL-A și lipaza AK

Nr.	Enzima	Solvent	Timp (h)	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	ee <sub>s</sub> (%)	<i>E</i>
1	CaL-A	DIPE	6	50	89	91	54
2	CaL-A	<i>t</i> BME	6	41	81	56	16
3	CaL-A	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4	6	85	5	13
4	CaL-A	Acetonitril	4	16	70	13	6
5	CaL-A	Toluen	4	34	88	45	24
6	CaL-A	Acetat de vinil	6	50	89	92	56
7	CaL-A	[bmim]PF <sub>6</sub>	6	30	88	37	22
8	LAK	DIPE	24	43	95	71	83
9	LAK	<i>t</i> BME	24	35	90	48	31
10	LAK	Toluen	24	34	93	47	44
11	LAK	Acetat de vinil	24	16	89	17	20
12	LAK	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	24	17	93	19	33
13	LAK	Acetonitril	24	12	91	13	24
14	LAK	[bmim]PF <sub>6</sub>	24	20	91	23	27

Au fost efectuate experimente similare și pentru celelalte substraturi, rezultatele optime fiind obținute în aceleași condiții ca în cazul *rac-7g* (Tabelul 12, nr. 2,4,6,8). Trebuie subliniat că transformarea catalizată de CaL-A a *rac-7e-h* a fost în general corespunzătoare și la utilizarea acetatului de vinil pur (Tabelul 12, nr. 1,3,5). Cu excepția *rac-7h* (*E*= 5, Tabelul 12, nr. 7), reacțiile de acilare catalizate de CaL-A au decurs cu enantioselectivități bune (*E*= 56-133).

**Tabelul 12.** Reacțiile de acilare enzimatică a *rac-7e-h* mediate de CaL-A și LAK

Nr.	Substrat	Enzima	Solvent	Timp (h)	c (%)	ee <sub>p</sub> (%)	ee <sub>s</sub> (%)	<i>E</i>
1	<i>rac-7e</i>	CaL-A	Acetat de vinil	6	48	95	83	133
2	<i>rac-7e</i>	LAK	DIPE	13	50	97	97	>200
3	<i>rac-7f</i>	CaL-A	Acetat de vinil	9	50	92	91	76
4	<i>rac-7f</i>	LAK	DIPE	9	50	97	96	>200
5	<i>rac-7g</i>	CaL-A	Acetat de vinil	6	50	89	92	56
6	<i>rac-7g</i>	LAK	DIPE	30	50	93	95	102
7	<i>rac-7h</i>	CaL-A	Acetat de vinil	12	55	46	56	5
8	<i>rac-7h</i>	LAK	DIPE	22	50	92	93	81

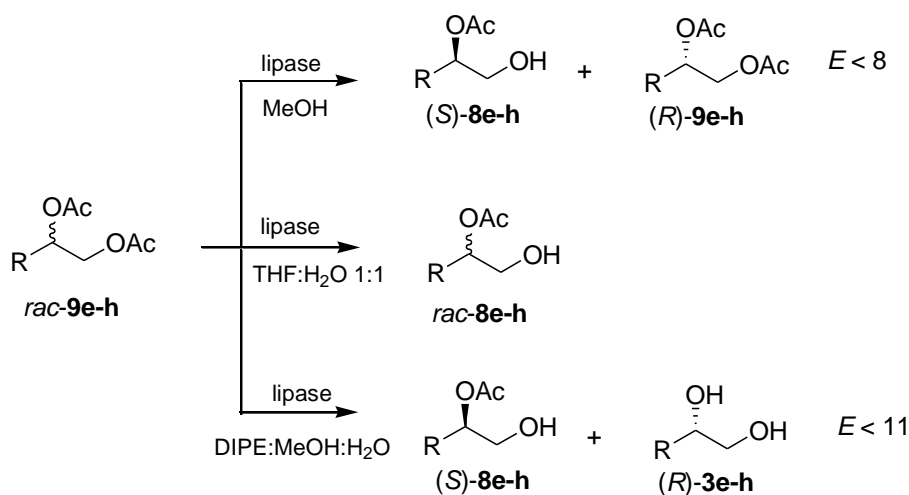
A fost testată apoi reacția de hidroliză sau alcooliză a *rac-7e-h* (Schema 12d). Utilizând metodologia descrisă deja pentru *rac-8e-h*, s-a arătat că majoritatea lipazelor testate (CaL-A, LAK, LPS, PLE, CrL, lipaza din *Mucor javanicus*) sunt ineficiente. Numai LPS și

CaL-B pot să transforme în amestec de eter-metanol-apă (1:1:2, v/v) toate substraturile în diolii racemici corespunzători *rac-3e-h*, într-un mod complet neselectiv.

#### 4.3.4. Rezoluția cinetică a derivaților diacetilați racemici *rac-9e-h*

În final a fost studiată metanoliza derivaților diacetilați racemici *rac-9e-h* cu aceleași hidrolaze. Reacțiile au fost realizate în diferiți solvenți care conțin 8 eq. de nucleofil sau în metanol pur. În timp ce majoritatea lipazelor au fost catalitic inactive, așa cum ne așteptam<sup>53</sup>, CaL-B a transformat *rac-9e-h* în (*R*)-diacetații și (*S*)-monoacetații alcoolilor secundari, dar surprinzător în manieră *anti*-Kazlauskas<sup>36a</sup>. Totuși s-au obținut excese enantiomerice moderate ale produșilor (ex. ee 82% pentru (*R*)-**9h** și ee 51% pentru (*S*)-**8h**) la valori mari ale conversiilor și s-a evidențiat prezența diolilor în cantități reduse dar nu nesemnificative (5-10%).

Dacă reacțiile au fost realizate în amestec THF:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), atât CaL-B cât și LPS au hidrolizat regioselectiv transformarea *rac-9e-h* în *rac-8e-h*. Într-un amestec de DIPE: MeOH: H<sub>2</sub>O ca și amestec de solvenți, LPS a catalizat transformarea rapidă a *rac-9e-h* în *rac-8e-h*, urmată de liza stereoselectivă a racematului din urmă cu formarea (*R*)-**3e-h** și a (*S*)-**8e-h** cu enantioselectivități moderate (ee 65-71% pentru (*R*)-**3e-h** și 59-67 % pentru (*S*)-**8e-h**). Toate posibilitățile de transformare sunt prezentate în Schema 13.



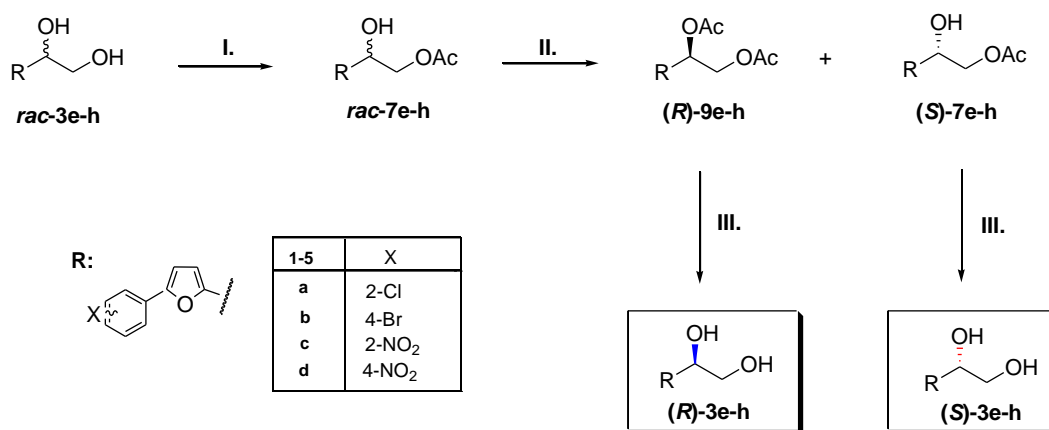
**Schema 13.** Reacțiile catalizate de lipaze a diolilor diacetilați racemici

#### 4.3.5. Sinteza la scară preparativă a (*R*)- și (*S*)-**3e-h** optic puri

Sinteza la scară preparativă a ambilor enantiomeri ai fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor a avut la bază reacțiile enzimatică la scară analitică prezentate în paragraful anterior (Schema 14).

Utilizând 1,2-diolii racemici *rac*-**3e-h** ca și substraturi, a fost efectuată în prima etapă acilarea regioselectivă mediată de LPS cu formarea cantitativă a *rac*-**7e-h**. În continuare s-a realizat acilarea enzimatică enantioselectivă mediată de LAK a *rac*-**7e-h**, obținându-se (*S*)-**7e-h** și (*R*)-**9e-h** cu excese enantiomerice ridicate prin oprirea reacției la o conversie de aproximativ 50% (monitorizare prin HPLC) prin îndepărtarea enzimei prin filtrare. Toate diluțiile, raportul substrat-biocatalizator și condițiile de reacție au fost aceleași ca și reacțiile la scară analitică. În Tabelul 13 sunt prezentate date excesele enantiomerice și rotațiile optice specifice ale enantiomerilor obținuți. Compușii (*S*)-**7e-h** și (*R*)-**9e-h** formați au fost apoi transformați cantitativ în diolii corespunzători (*S*)- și (*R*)-**3e-h**, fără afectarea purității optice a enantiomerilor, prin reacția de alcooliză-hidroliză catalizată de LPS. A fost încercată și hidroliza chimică<sup>104</sup> și alcooliza<sup>53,54</sup> compușilor (*S*)-**7e-h** și (*R*)-**9e-h**, dar datorită instabilității structurale a diolilor în mediu acid sau bazic, s-a observat în majoritatea cazurilor formarea unor produși secundari și racemizarea parțială a diolilor.

Configurația absolută a 1,2-diolilor optic puri obținuți a fost determinată prin compararea timpilor de retenție cromatografică a enantiomerilor și a semnelui rotației optice specifice cu a celor obținuți anterior sau descriși în literatură<sup>105</sup>.



I. lipaza PS / acetat de vinil; II. lipaza AK, acetat de vinil / DIPE; III. lipaza PS / MeOH:DIPE:H<sub>2</sub>O 1:1:2

**Schema 14.** Sinteza la scară preparativă a (*R*)- și (*S*)- **3e-h** catalizată de lipaze

**Tabelul 13.** Randamentele, excesele enantiomerice și rotația optică specifică a produsilor obținuți prin sinteza la scară preparativă

Nr.	Produs	Rdt <sup>a</sup> (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25\ b}$	Produs	Rdt <sup>a</sup> (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25\ b}$
1	(S)- <b>7e</b>	49	97	-6.7	(R)- <b>9e</b>	49	97	+ 33.1
2	(S)- <b>7f</b>	48	96	-10.4	(R)- <b>9f</b>	49	97	+ 42.7
3	(S)- <b>7g</b>	49	95	-23.8	(R)- <b>9g</b>	47	93	+82.3
4	(S)- <b>7h</b>	48	93	- 18.7	(R)- <b>9h</b>	47	92	+65.5
5	(S)- <b>3e</b>	47	97	- 24.5	(R)- <b>3e</b>	47	97	+ 24.3
6	(S)- <b>3f</b>	46 <sup>b</sup>	96	- 21.2	(R)- <b>3f</b>	48	96	+ 21.9
7	(S)- <b>3g</b>	48	95	- 33.9	(R)- <b>3g</b>	46	93	+ 31.4
8	(S)- <b>3h</b>	46	93	- 25.8	(R)- <b>3h</b>	46	92	+25.1

<sup>a</sup> calculat față de *rac*-**3e-h**

<sup>b</sup> c 0.5

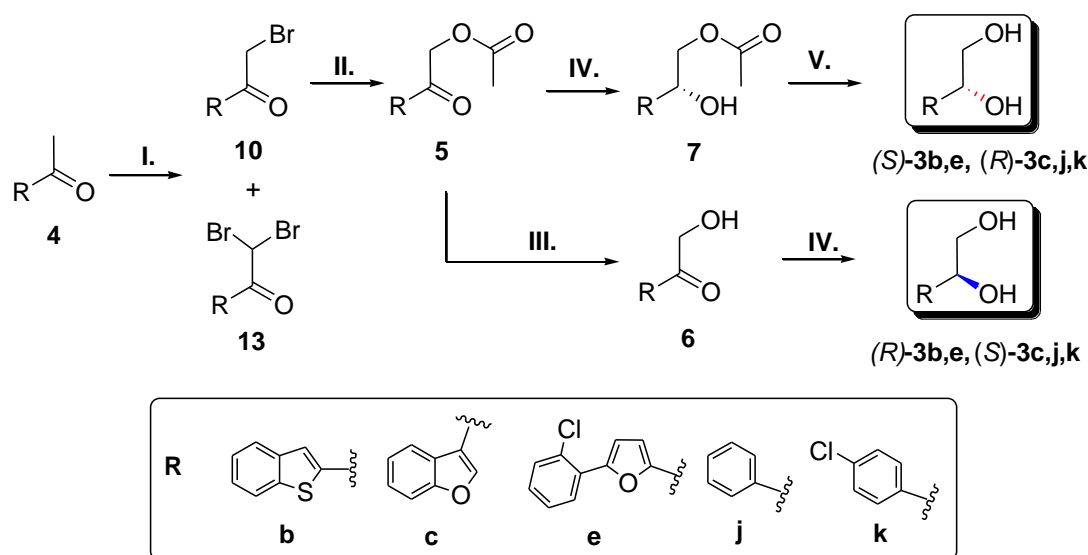
#### 4.4. Sinteza chemoenzimatică “One-Pot” a ambilor enantiomeri (R)- și (S)- ai aril-1,2-etandiolilor **3b,c,e,j,k**

Sinteza chemoenzimatică elaborată anterior a (R)- și (S)-1-aryl-1,2-etandiolilor pornind de la arilcetone este un procedeu în mai multe etape.<sup>62,63</sup> În scopul eliminării produselor secundare și a reactivilor care ar putea ridica probleme în etapele ulterioare se impune de obicei purificarea intermediarilor de reacție. Evitarea acestor probleme este posibilă prin realizarea unor transformări cantitative și utilizarea unor reactivi și solvenți care să nu deranjeze etapele ulterioare. În aceste condiții ar fi posibilă efectuarea tuturor etapelor într-un singur vas de reacție, fără purificarea intermediarilor, așa cum este prezentat în Schema 15. Astfel, utilizând tribromura de piridiniu legată de un suport polimeric în piridină este posibilă  $\alpha$ -bromurarea cantitativă a arilcetonelor **4**. Transformarea succesivă a  $\alpha$ -bromo-arilcetonelor **10** în  $\alpha$ -acetoximetil-arilcetonele **5** se poate realiza cu acetat de sodiu în prezența eterului coroaă 18C6 ca și catalizator intefazic. În continuare, adăugarea lipazei B din *Candida antarctica* imobilizată pe Celite (Novozyme 435) și a metanolului determină formarea cantitativă a  $\alpha$ -hidroxi-arilcetonelor **6**. Dacă în amestecul de reacție astfel format se adaugă o suspensie de celule de drojdie, este posibilă obținerea ambilor enantiomeri ai (R)- sau (S)-1-aryl-1,2-etandiolilor **3**, în stare de puritate optică avansată, în funcție de substratul prezent în amestec:  $\alpha$ -hidroxi- sau  $\alpha$ -acetoximetil-arilcetonă.

Pornind de la diferite arilcetone **4b,c,e,j,k** s-a demonstrat că acest procedeu este o metodă fiabilă de sinteză one-pot a ambilor enantiomeri ((R)- și (S)-) ai 1-aryl-1,2-etandiolilor cu randamente și valori mari ale exceselor enantiomerice.

Secvența de reacții este prezentată în Schema 15. Determinarea condițiilor transformărilor cantitative este posibilă prin monitorizarea fiecărei etape prin HPLC și/sau

prin TLC. După terminarea fiecărei etape, condițiile de reacție (diluție, temperatură, pH, etc.) au fost reglate la valorile optime pentru următoarea etapă.



I. tribromura de piridiniu legata pe polimer / acetonitril, reflux; 4-(*N*-benzil-*N*-meilamino)piridina legata de polimer, rt.  
 II.  $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ , 18C6 / acetonitril, reflux. III. Novozyme 435, metanol / acetonitril, rt.  
 IV. Oxidoreductaze din drojdie. V. Hidrolaze din drojdie in cazul **b,c,e** si PLE pentru **j,k**.

### Schema 15. Sinteza one-pot a (*R*)- și (*S*)-1-aryl-1,2-etandiolilor

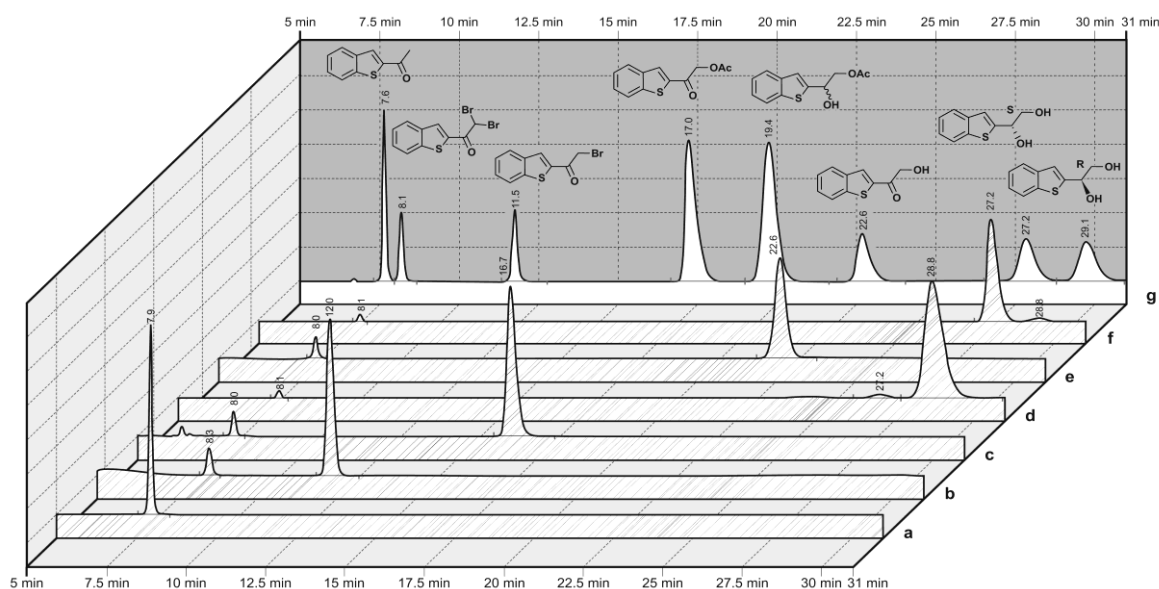
În Figura 3 sunt prezentate pentru exemplificare cromatogramele obținute pentru toate etapele la transformarea on pot a 1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)etanonei **4b** în produșii doriți.

În condițiile utilizate au fost determinați următorii timpi de retenție pentru 1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)etanona **4b**, 1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-bromoetanona **10b**, 1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2,2-dibromoetanona **13b**, acetat de 2-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-oxoetil **5b**, acetat de 2-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-hidroxi-etil **7b**, 1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-hidroxi-etanona **6b**, (*S*)- și (*R*)-1-(benzo[*b*]tiofen-2-il)etan-1,2-diolul **3b** autentici au fost aproximativ: 7.9, 11.5, 8.1, 17.0, 19.4, 22.6, 27.2 și respectiv 29.1 minute (Figura 3, linia g).

Cetona de pornire **4b** a fost transformată în prima etapă complet (Figura 3, linia a) în compușii bromurați (Figure 7, linia b). În continuare, HBr acumulat, care ar putea compromite reacțiile următoare, a fost eliminat din amestecul de reacție cu 4-(*N*-benzil- *N*-metilamino)-piridină legată pe suport polimeric. Utilizarea acestui agent de neutralizare în prima etapă este crucială. Bromohidratul piridinei și al 4-(*N,N*-dimetilamino)piridinei ar scădea activitatea și selectivitatea reacțiilor enzimace ulterioare și ar determina de asemenea apariția câtorva produși secundari nedorți. Este important de subliniat formarea a 5-8% cetona dibromurată

**13b** (Figura 3, linia b, la 8.2 min.), acest compus însă este inert în etapele următoare și prezența sa a fost detectată în fiecare etapă a procedurii one-pot (Figura 3, liniile c-g). Catalizatorul de transfer interfazic 18C6 mediază acetoxilarea  $\alpha$ -bromo-arilcetonei **10b** (Figura 3, linia c), iar transformarea catalizată de Novozyme 435 a  $\alpha$ -acetoximetil-arilcetonei **5b** duce la formarea  $\alpha$ -hidroximetil-arilcetonei **6b** (Figura 3, linia e) cu conversie maximă, fără formarea unor produse secundare. În final, prin biotransformare mediată de drojdie a  $\alpha$ -acetoximetil- și a  $\alpha$ -hidroximetil-arilcetonei se obțin formele enantiomerice opuse (Figura 3, linia d respectiv f) a 1-aril-1,2-etandiolilor **3b** urmăriți, care pot fi ușor izolați prin extracție în acetat de etil. Subliniem aici faptul că la biotransformarea acetatului de 2-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-oxoetil **5b** nu a fost detectată prezența acetatului de 2-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-hidroxi-etil **7b** nici măcar în urme, ceea ce arată că produsul de reducere este un substrat bun pentru hidrolazele prezente de asemenea în celulele de drojdie.

**Figura 3.** Diagramele de eluție pe o colană cromatografică chirală după fiecare etapă din procedura one-pot de obținere a (*S*)- și (*R*)-**3b**



Procesul a fost similar și pentru ceilalți 1-aril-1,2-etandiooli **3c,e,j,k** și a permis obținerea și izolarea produsilor corespunzători conform Tabelului 15. În cazul biotransformării **5j,k**, în afară de (*S*)-**3j,k** doriți, au fost identificați și (*S*)-**7j,k**. În aceste cazuri, după terminarea procesului de bioreducere, prin adăugare de PLE s-a perfectat transformarea rapidă a (*S*)-**7j,k** în diolii (*S*)-**3j,k**.



**Tabelul 14.** Randamentele, timpii și condițiile de reacție pentru sinteza one-pot a (*R*)- și (*S*)-1-iril-1,2-etan-diolilor

Nr.	Produs	Rdt (%)	ee (%)	Condiții	Timp (h)
1	( <i>S</i> )- <b>3b</b> <sup>b)</sup>	79	96	fermentative <sup>c)</sup>	110
2	( <i>R</i> )- <b>3b</b> <sup>a)</sup>	82	95	fermentative	126
3	( <i>S</i> )- <b>3c</b> <sup>a)</sup>	80	95	fermentative	38
4	( <i>R</i> )- <b>3c</b> <sup>b)</sup>	82	98	fermentative	48
5	( <i>S</i> )- <b>3e</b> <sup>b)</sup>	81	97	fermentative <sup>d)</sup>	48
6	( <i>R</i> )- <b>3e</b> <sup>a)</sup>	79	94	nefermentative	72
7	( <i>S</i> )- <b>3j</b> <sup>a)</sup>	75	77	fermentative	36
8	( <i>R</i> )- <b>3j</b> <sup>b)</sup>	73	95	fermentative	48
9	( <i>S</i> )- <b>3k</b> <sup>a)</sup>	68	82	fermentative	34
10	( <i>R</i> )- <b>3k</b> <sup>b)</sup>	75	95	fermentative	48

<sup>a)</sup> produșii de reacție obținuți prin transformarea celulară a **5b,c,e,j,k**. <sup>b)</sup> produșii de reacție obținuți prin transformarea celulară a **6b,c,e,j,k**. <sup>c)</sup> în prezența L-cisteinei ca aditiv. <sup>d)</sup> în prezența bromoacetatului de etil ca aditiv.

## 5. Concluzii

Sinteza anterior cunoscută a (*R*)- și (*S*)-benzofuranil- and benzo[*b*]tiofenil-1,2-etandiolilor a decurs cu randamente uneori nesatisfăcătoare, cu obținerea unor produși cu enantiopurități nu întotdeauna mulțumitoare. De aceea a fost dezvoltată o metodologie chemoenzimatică nouă de sinteză a ambilor enantiomeri, (*R*)- și (*S*)- ai benzofuranil- și benzo[*b*]tiofenil-1,2-etandiolilor bazată pe sinteza catalizată de lipaze a cianohidrinelor optice active, deja cunoscută, urmată de hidroliza chimică a acestora în  $\alpha$ -hidroxiacizi și reducerea acestora cu  $\text{LiAlH}_4$  la compușii doriți.

Pentru sinteza ambilor enantiomeri ai unor 5-fenilfuran-2-il-etan-1,2-dioli noi, cu diverși substituenți a fost utilizată o metodă deja cunoscută, biotransformarea mediată de celule de drojdie a  $\alpha$ -acetoxi și a  $\alpha$ -hidroximetilcetonelor. Au fost preparați astfel cu excese enantiomerice și randamente mari câțiva 5-fenilfuran-2-il-etan-1,2-dioli. Deoarece s-a observat însă în câteva cazuri un efect puternic al substituenților, în anumite cazuri biotransformările fie nu au avut loc, fie excesele enantiomerice ale produșilor au fost scăzute.

Prin utilizarea rezoluției cinetice mediată de lipaze a 1,2-etandiolilor racemici a fost posibilă însă obținerea unor 5-fenilfuran-2-il-etan-1,2-dioli divers substituiți cu excese enantiomerice superioare comparativ cu cele obținute prin biotransformarea mediată de celule de drojdie a  $\alpha$ -acetoximetil și  $\alpha$ -hidroxicetonelor corespunzătoare. Astfel a fost elaborată o metodologie nouă de sinteză a ambilor enantiomeri ai 5-fenilfuran-2-il-etan-1,2-diolilor divers substituiți prin utilizarea regioselectivității lipazei LPS și a enantioselectivității lipazei AK.

Pe lângă metodele prezentate anterior, deja cunoscute, a fost elaborată o metodă nouă, simplă și eficientă, one-pot, pentru sinteza enantiomerilor (*R*)- și (*S*)- ai aril-1,2-etandiolilor. Au fost utilizați grupări aril cu diverse structuri: fenil, 4-clorofenil, benzo[*b*]tiofen-3-il, benzofuran-2-il, 2-clorofenilfuran-2-il și multe alte ariletanone pentru a demonstra specificitatea largă de substrat a drojdiei și faptul că metoda propusă este convenabilă pentru sinteza (*R*)- și (*S*)-1,2-etandiolilor.

## Literatură:

1. Bommarius, S. A., Riebel, B. R. *Biocatalysis*, **2004**, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co., Weinheim
2. a) <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory/Information/b>  
<http://www.emea.europa.eu/>
3. a) Fleming, P. R., Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2869; b) Nicolau, K. C., Papahatjis, D. P., Clameron, D. A., Magolda, R. L., Dolle, R. E. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1440; c) Konopelski, J. P., Bohler, M. A., Tarasow, T. M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4966; d) Kolb, H. C., Sharpless, K. B. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10515; e) Newman, M. S., Chen, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 278; e) Newman, M. S., Olson, D. R. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 4203; f) Watson, K. G., Fung, Y. M., Gredley, M., Bird, G. J., Jackson, W. R., Gountzos, H., Matthews, B. R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1018
4. Bandini, M., Cozzi, P. G., Gazzano, M., Umami-Ronchi, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1937-1942
5. Ager, D. A., Prakash, I., Scaad, D. R. *Aldrichimica Acta* **1997**, *90*, 3212.
6. Pfaltz, A. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 339-345.
7. a) Bellucci, C. M., Bergamini, A., Cozzi, P. G., Papa, A., Tagliavini, E., Umami-Ronchi, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 895-902. b) Ager, D. A., Prakash, I., Scaad, D. R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-875.
8. Reddy, K. L., Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1207-1217.
9. Liljeblad, A., Kanerva, L. T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854
10. Cho, B. T., Kang, S. K., Shin, S. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1693-1694
11. a) Crispino, G. A., Makita, A., Wang, Z.-M., Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 543; b) Okamoto, S., Tani, K., Sato, F., Sharpless, K. B., Zargarian, D. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2509; c) Soderquist, J. A., Rane, A. M., Lopez, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1893
12. a) Oi, R., Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2095; b) Henderson, I., Sharpless, K. B., Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 558
13. Byun, H.-S., Kumar, E. R., Bittman, R. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2630
14. Wang, Z.-M., Zhang, X.-L., Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2267
15. Pye, P. J., Rossen, K., Weissman, S. A., Maliakal, A., Reamer, R. A., Ball, R., Tsou, N. N., Volante, R. P., Reider, P. J. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1372-1376
16. Guillaume, M., Lang, Y., *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 579-582
17. Kallinen, A., Tois, J., Sjolholm, R., Franzen, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2367-2371
18. Brown, J. M., Murrer, B.A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. (2)* **1983**, 489-497.
19. Leborgne, A., Spassky, N., Sigwalt, P. *Polym. Bull.* **1979**, *1*, 825-832.
20. Olenik, B., Boese, R., Sustmann, R. *Crystal Growth & Design*, **2003**, *3*, 175-181
21. Vargas-Diaz, M. E., Velazquez, L. C., Tamariz, J., Zepeda, L.G., *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3225-3232
22. Satoshi, O., 2004, United States Patent Application, 20040014777
23. Bottari, F., Nannipieri, E., Saettone, M. F., Serafini, M. F. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 39-42
24. Rohrle, A. N., Schmidhammer, H. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *81*, 1070-1076
25. Agh-Atabay, N. M., Dulger, B., Guzin, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 875-881
26. Liese, A., Karutz, M., Kamphuls, J., Wandrey, C., Kragl, U. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *51*, 554-550
27. Degenring, D., Schroder, I., Wandrey, C., Liese, A., Greiner, L. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 213-218
28. a) Genzel, Y., Archelas, A., Spelberg, L. J. H., Janssen, D. B., Furstoss, R. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2775-2779; b) Genzel, Y., Archelas, A., Broxterman, Q. B., Schulze, B., Furstoss, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *16*, 217-222; c) Genzel, Y., Archelas, A., Broxterman, Q. B., Schulze, B., Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 538-543
29. Manoj, K. M., Archelas, A., Baratti, J., Furstoss, R. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 695-701
30. Mateo, C., Archelas, A., Furstoss, R. *Anal. Biochem.*, **2003**, *314*, 135-141
31. Botes, A. L., Mitra, K. *Innovations in Pharmaceutical Technology* **2006**, *21*, 86-89
32. Pollard, D. J., Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2006**, *25*, 66-73
33. Borncheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organism Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations. 2<sup>nd</sup> edition*, **2006**, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co., KGaA, Weinheim

34. Dodson, G., Wlodaver, A. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 347-352
35. Segel, I. H. *Enzyme Kinetics*, **1975**, John-Wiley and Sons, NY, USA
36. a) Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2656-2665; b) Ahmed, S. N., Kazlauskas, R. J., Morinvile, A. H., Grochulski, P., Schrag, J. D., Cygler, M. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 209-225; c) Franssen, M. C. R., Jongejan, H., Kooijman, H., Spek, A. L., Mondril, N. L. F. L. C., de Santos, P. M. A. C. B., de Groot, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 497-510; d) Guanti, G., Banfi, L., Narisano, E. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1540-1554
37. de Maria, P. D., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., van der Meer, A., van Gemert, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46
38. a) Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., Jones, T. A. *Structure* **1994**, *2*, 293-308; b) Uppenberg, J., Öhrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838-16851
39. Anderson, E. M., Larsson, K. M., Kirk, O. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 181-204
40. Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A. G., Bakwall, J.-E., Mowbray, S. L. *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109-119
41. Pfeffer, J., Richter, S., Nieveler, J., Hansen, C.-E., Bel Rhlid, R., Schmid, R. D., Rusnak, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 931-938
42. a) Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W. *Structure* **1997**, *5*, 173-185; b) Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.-J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T. J., Oliver, J. D., Strickland, I. C., Dunaway, C. M., Larson, S. B., Day, J., McPherson, A. *Structure* **1997**, *5*, 187-202
43. Xie, X. F. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 733-750
44. Toumi, W. V., Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2638-2647
45. Ha, H.-J., Yoon, K.-N., Lee, S.-Y., Park, Y.-S., Lim, M.-S., Yim, Y.-G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8062-8066
46. Kojima, Y., Yokoe, M., Mase, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1564
47. Bosetti, A., Bianchi, D., Cesti, P., Golini, P., Spezia, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 2395-2398
48. Theil, F.; Weidner, J.; Ballschuh, S.; Kunath, A.; Schick, H. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 305-306
49. Theil, F., Weidner, J., Ballschuh, S., Kunath, A., Schick, H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 388-393
50. Lemke, K., Theil, F., Kunath, A., Schick, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 971-974
51. Egri, G., Baitz-Gacs, E., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1437-1448
52. Kaminska, J. E., Smigielski, K., Lobodzinska, D., Gora, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1211-1215
53. Virsu, P., Liljebad, A., Kanerva, A., Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2447-2455
54. Kamal, A., Chouhan, G. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8801-8805
55. Cohen, T., Dughi, M., Notaro, V. A., Pinkus, G. J. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 814
56. Santry, L. J., Azer, S., McClelland, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2909
57. McClelland, R. A., Seaman, N. E., Cramm, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4511
58. Matsuda, T., Yamanaka, R., Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513-557
59. V. Prelog *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130
60. a) Ushio, K., Hada, J., Tanaka, Y., Ebara, K. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 222-228; b) Cui, J. N., Ema, T., Sakai, T., Utaka, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2681-2692
61. a) Levene, P. A., Walti, A. *Org. Synth. Coll. Vol. II*, **1943**, 545; b) Guette, J. P., Spassky, N. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1972**, 4217; c) Ridley, D. D., Stralow, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 400; d) Barry, J., Kagan, H. B. *Synthesis* **1981**, 453; (e) Aragozzini, F., Maconi, E., Scolastico, C., Potenza, D. *Synthesis* **1989**, 225
62. a) Manzocchi, A., Fiecchi, A., Santaniello, E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4405; b) Ferraboschi, P., Grisenti, P., Manzocchi, A., Santaniello, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 2469-2474; c) Ferraboschi, P., Grisenti, P., Manzocchi, A., Santaniello, E. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10539-10548
63. a) Toşa, M. I., Podea, P. V., Paizs, C., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2068-2071; b) Paizs, C., Toşa, M. I., Majdik, C., Moldovan, P. V., Novák, L., Kolonits, P., Marcovici, A., Irimie, F. D., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1491-1501
64. Sato, T., Fujisawa, T. *Biocatalysis* **1990**, *3*, 1
65. Imuta, M., Kawai, K., Ziffer, H. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3352

66. Itoh, T., Yonekawa, Y., Sato, T., Fujisawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5405
67. Kaluzna, I., Andrew, A. A., Bonilla, M., Martzen, M. R., Stewart, J. D. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 17, 101
68. Kaluzna, I. A., Matsuda, T., Sewell, A. K., Stewart, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12827
69. Ema, T., Yagasaki, H., Okita, N., Takeda, M., Sakai, T. *Tetrahedron* **2006**, 62, 6143-6149
70. Nakamura, K., Higaki, M., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 26, 4213-4216
71. a) Zhou, B.-N., Gopalan, A. S., VanMiddlesworth, F., Shieh, W.-R., Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5925; b) Chen, C.-S., Zhou, B.-N., Girdaukas, G., Shieh, W.-R., VanMiddlesworth, F., Gopalan, A. S., Sih, C. J. *Bioorg. Chem.*, **1984**, 12, 98; c) Shieh, W.-R., Gopalan, A.S.; Sih, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 2993.
72. Fujisawa, T., Itoh, T., Sato, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5083.
73. Nakamura, K., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A., Yasui, S. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3979
74. Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 2659-2681
75. a) Nakamura, K., Kawai, Y., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 267; b) Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. *Chem. Lett.* **1987**, 17, 679; c) Nakamura, K., Kawai, Y., Oka, S., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2245 .
76. Ushio, K., Hada, J., Tanaka, Y., Ebara, K. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, 15, 222-228
77. Li, F., Cui, J., Qian, X., Ren, W., Wang, X. *Chem. Commun.* **2006**, 865.
78. a) MacLeod, R., Prosser, H., Fikentscher, L., Lanyi, J., Mosher, H. S. *Biochemistry* **1964**, 3, 838; b) Deardorff, D. R., Myles, D. C., MacFerrin, K. D. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5615; c) Nakamura, K., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A., Yasui, S. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3979.
79. Medson, C., Smallridge, A. J., Trehwella, M. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 1049
80. Shi, Y.-g., Fang, Y., Ren, Y.-p., Guan, H.-l., Zhang, J.-Y. *J. Chem. Technol. Biotechnol* **2009**, 84, 681-689
81. Kometani, T., Toide, H., Daikaiji, Y., Goto, M. *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 9, 525
82. Howarth, J., James, P. and Dai, J. F. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7517
83. a) Knoll, J. *CNS Drug Rev.* **2001**, 7, 317-345; b) Krajewski, K., Zhang, Y., Parrish, D., Deschamps, J., Roller, P. P., Pathak, V. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3034-3038
84. a) Slawinski, J., Brzozowski, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, 41(10), 1180-1189; b) Yoshida, M., Hayakawa, I., Hayashi, N., Agatsuma, T., Oda, Y., Tanzawa, F., Iwasaki, S., Koyama, K., Furukawa, H., Kurakata, S., Sugano, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3328-3332
85. Nishio, K., Fukuhara, A., Omata, Y., Saito, Y., Yamaguchi, S., Kato, H., Yoshida, Y., Niki, E. *Bioorgan. Med. Chem.* **2008**, 16, 10332-10337
86. Huang, Q-Q., Huang, M., Nan, F-J., Ye, Q-Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 5386-5391
87. North, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 147-176
88. a) Kanerva, L. T., Kiljunen, E., Huuhtanen, T. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 2355-2361; b) Hanefeld, U., Li, Y., Sheldon, R. A., Maschmeyer, T. *Synlett.* **2000**, 1775-1776; c) Effenberger, F., Gutterer, B., Ziegler, T., Eckhardt, E., Aichholz, R. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 47-54; d) Xu, Q., Geng, X., Chen, P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 6440-6441
89. a) Veum, L., Kanerva, L. T., Halling, P. J., Maschmeyer, T., Hanefeld, U. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1015-1021; b) Inagaki, M., Hiratake, J., Nishioka, T., Oda, J. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5643-5649; c) Veum, L., Hanefeld, U. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 3707-3709
90. a) Paizs, C.; Tähtinen, P.; Lundell, K.; Poppe, L.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1895-1904; b) Paizs, C., Tosa, M. I., Majdik, C., Tähtinen, P., Irimie, F. D., Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 619-627; c) Paizs, C., Tähtinen, P., Tosa, M. I., Majdik, C., Irimie, F. D., Kanerva, L. T. *Tetrahedron* **2004**, 60, 10533-10540
91. Effenberger, F., Horsch, B., Forster, S., Ziegler, T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1249-1252
92. Reisinger, C., Osprian, I., Glieder, A., Schoemaker, H. E., Griengl, H., Schwab, H. *Biotechnol. Lett.* **2004**, 26, 1675-1680
93. Tosa, M. I., Pilbak, S., Moldovan, P., Paizs, C., Szatzker, G., Szakacs, Gy., Novak, L., Irimie, F.D., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1844-1852
94. Gaussian 03, Revision D.01, Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Montgomery, Jr., J. A., Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M.,

- Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas, O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M.; Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W. Wong, M. W., Gonzalez, C., and Pople, J. A., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**
95. Meerwein, H., Buchner, E., Emster, K. *J. Prakt. Chem.* **1939**, *152*, 237
96. Meth-Cohn, O., Horak, R. M., Fouche, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1994**, 1517-1527
97. Simon, H., Bader, J., Guenther, H., Neumann, S., Thanos, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, 539
98. a) Shi, Y., Fang, Y., Ren, Y., Guan, H., Zhang J-Y. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2009**, *84*, 681-688; b) Nakamura, K., Kawai, Y., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3631-3632; c) Bálint, J.; Egri, G., Kolbert, A., Dianóczy, Cs., Fogassy, E., Novák, L., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4017-4028; d) Egri, G., Kolbert, A., Bálint, J., Fogassy, E., Novák, L., Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 271-283
99. Boto, A., Hernandez, D., Hernandez, R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1721-1724
100. Balachari, D., O'Doherty, G. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 863-866
101. Kirk, O., Christensen, M. W. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*, 446-451
102. Bencze, L. C., Paizs, C., Toşa, M. I., Trif, M., Irimie, F. D. *Tetrahedron:Asymmetry* **2010**, *21*, 1999-2004
103. de Gonzalo, G., Lavandera, I., Brieva, R., Gotor, V. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10525-10532
104. a) Hirose, K., Aksharamandana, P., Suzuki, M., Wada, K., Nameura, K., Tobe, Y. *Heterocycles* **2005**, *66*, 405-431; b) Singh, S., Duffy, C. D., Shal, S. T. A., Guiry, P.J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (16), 6429-6432
105. Bencze, L. C., Paizs, C., Tosa, M. I., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 356-364
106. a) Zaidlewicz, M., Chechlowska, A., Prewysz-Kwinto, A., Wojtczak, A. *Heterocycles* **2001**, *55*, 569-577; b) King, W. J., Nord, F. F. *J. Org. Chem* **1948**, *13*, 635-637; c) Podea, P. V., Tosa, M. I., Paizs, C., Irimie, F. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 500-511
107. a) Gassman, P. G., Talley, J. J. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3773-3779; b) Steinreiber, A., Faber, K. *Curr. Opin. Biotech.* **2001**, *12*, 552-558
108. Irimie, F. D., Paizs, Cs., Joó, Fr., Silaghi-Dumitrescu, R., Toşa, M. I., Majdik, C. *Roumanian Biotechnol. Lett.* **1999**, *4*, 71-74