

# Stereoselektivna redukcija karbonilnih spojeva pomoću enzimskih sustava iz biljnog materijala

---

Jurić, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2013

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:904862>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Andrea Jurić

Stereoselektivna redukcija karbonilnih spojeva pomoću enzimskih sustava iz  
biljnog materijala

Završni rad

Mentor:

doc.dr.sc. Nela Malatesti

Osijek, 2013

## Sažetak

Kiralni alkoholi su važne građevne jedinice za sintezu farmaceutskih pripravaka, pesticida, feromona, aroma, mirisa i materijala poput tekućih kristala. U ovome je radu opisana redukcija jednostavnih ketona, aromatskih ketona s halogenom i  $\beta$ -ketoestera u kiralne alkohole korištenjem enzima iz biljnih materijala. Acetofenon je reduciran u 1-feniletanol korištenjem različitih biljnih kultura. Kao biokatalizatori korišteni su mrkva (*Daucus carota*), komorač (*Foeniculum vulgare*) i tikvice (*Cucurbita pepo*). Uz pomoć kulture *Daucus carota* dobiven je čisti (*S*)-feniletanol uz enantiomerni višak od 100 %. Z. H. Yang i suradnici su proveli redukciju 4'-kloracetofenona u (*R*)- ili (*S*)-1-(4-klorfenil)etanol i etil-4-kloracetoacetata u etil-(*S*)-(-)-4-klor-3-hidroksibutanoat korištenjem različitih biljnih kultura. Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem kulture *Daucus carota*.

## Ključne riječi

Kiralni alkoholi, acetofenon, (*S*)-feniletanol, *Daucus carota*, biokatalizatori, stereoselektivna redukcija, kulture biljnih stanica

## Abstract

Chiral alcohols are important building blocks for the synthesis of pharmaceuticals, pesticides, pheromones, flavors, fragrances and advanced materials such as liquid crystals. This work describes reduction of simple ketones, halogen-containing aromatic ketones and  $\beta$ -ketoesters to chiral alcohols by enzymes from plant systems. Acetophenone is reduced to 1-phenylethanol by various plant tissues. As biocatalysts were used carrot (*Daucus carota*), fennel (*Foeniculum vulgare*) and marrow (*Cucurbita pepo*). Reduction of acetophenone by cultures *Daucus carota* afforded pure (*S*)-phenylethanol with 100% enantiomeric excess. Z. H. Yang and co-workers performed reduction of 4'-chloroacetophenone to (*R*)- or (*S*)-1-(4-chloro-phenyl)ethanol and ethyl-4-chloroacetoacetate to ethyl-(*S*)-(-)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by various plant tissues. The best results were obtained using cultures *Daucus carota*.

## Key words

Chiral alcohols, acetophenone, (*S*)-phenylethanol, *Daucus carota*, biocatalysts, stereoselective reduction, plant cell culture

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Glavni dio</b> .....	<b>7</b>
2.1. Biokatalizatori .....	7
2.2. Biokatalizatori u industriji.....	7
2.3. Biokatalizatori dobiveni iz mikrobioloških izvora.....	8
2.3.1. Redukcija supstituiranih 2-halogen-1-(4-fenil)-etanona korištenjem gljive <i>Geotrichum candidum</i> CCT 1205 i kvasca <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 2182.....	10
2.4. Uporaba biljnih sustava za biokatalizu.....	11
2.4.1. Stanične kulture .....	12
2.4.1.1. Biotransformacije steroida.....	12
2.4.1.2. Biotransformacije terpena .....	14
2.4.1.3. Biotransformacije aromatskih ketona.....	15
2.4.2. Enzimi.....	16
2.4.3. Neobrađivani biljni materijali .....	16
2.5. Stereoselektivna redukcija ketona i enona korištenjem biljnih stanica.....	17
2.5.1. Biotransformacija 2-pentilciklopentanona stanicama biljke jetrenke ( <i>Marchantia polymorpha</i> ).....	18
2.5.2. Biotransformacija 2-pentilciklopent-2-enona (25) stanicama biljke madagaskarski zimzelen ( <i>Catharanthus roseus</i> ) .....	19
2.6. Asimetrična redukcija prokiralnih ketona u kiralne alkohole katalizirana biljnim kulturama.....	20
2.6.1. Redukcija prokiralnih ketona pomoću mrkve ( <i>Daucus carota</i> ) .....	21
2.7. Redukcija acetofenona korištenjem različitih biljnih vrsta.....	23
2.7.1. Redukcija acetofenona pomoću mrkve ( <i>Daucus carota</i> ) .....	24
2.7.2. Redukcija acetofenona pomoću mrkve ( <i>Daucus carota</i> ), komorača ( <i>Foeniculum vulgare</i> ) i tikvica ( <i>Cucurbita pepo</i> ) .....	25
2.8. Hidroliza 1-acetoksi-2-metilcikloheksena.....	26
2.9. Redukcija aromatskih ketona s halogenom i $\beta$ -ketoestera .....	27
2.9.1. Redukcija 4'-kloracetofenona .....	27
2.9.2. Redukcija etil-4-kloracetoacetata .....	29
2.10. Sinteza 1-(benzofuran-2-il)-etanola .....	30
2.10.1. Sinteza 1-(benzofuran-2-il)-etanola iz salicilaldehida aldolnom kondenzacijom .....	30
2.10.2. Redukcija 1-(benzofuran-2-il)-etanona korištenjem enzima mrkve.....	31

<b>3. Zaključak.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Literatura .....</b>	<b>34</b>

## Uvod

Zadatak ovog rada bio je ispitati metode zelene kemije u redukciji spojeva s karbonilnom skupinom. Zelena kemija je usmjerena na smanjenje količine toksičnih tvari koje se koriste u kemijskim reakcijama, energije uložene u eksperiment te eksperiment čini sigurnijim za okoliš. Mnogi aspekti ovog područja kemije nisu još uvijek u potpunosti istraženi. Velika prepreka u primjeni zelene kemije je pronaći prikladne prirodne izvore koji neće uzrokovati probleme kao što je npr. nastanak štetnih plinova tijekom eksperimenta. Stoga je zadatak zelene kemije pronaći prirodne i obnovljive izvore koji će se koristiti u kemijskom eksperimentu. Cilj provedenih eksperimenata bio je pronaći reducense koji neće biti štetni za okoliš i koji će dati dobro iskorištenje reakcije.

Za provođenje eksperimenata zelene kemije potrebno je najprije pronaći odgovarajuće „zeleno otapalo“ koje je alternativa izvorno korištenom otapalu, ali je manje štetno za okoliš. Djelotvorna „zeleno otapala“ trebaju omogućiti nastanak količine produkata koja će se moći usporediti sa količinom produkata koji nastaju prilikom korištenja izvornog otapala. Budući da je zelena kemija novije područje kemije mnogi prirodni izvori nisu još dovoljno istraženi. Drugi problem u primjeni zelene kemije je to što su utjecaji većine prirodnih izvora koji su korišteni u eksperimentima nepoznati i korišteni prirodni izvori često ne daju željeni produkt. Mnogi eksperimenti zelene kemije uključuju uporabu prirodnih, organskih izvora kao što su voće ili povrće koji se koriste kao biokatalizatori u sintezi željenog produkta. Biokatalizatori su vrsta katalizatora koji su manje štetni za okoliš i slijede pravila zelene kemije. Eksperiment koji je obrađen u ovome radu i uključuje primjenu zelene kemije je redukcija ketona u alkohol korištenjem prirodnih izvora kao katalizatora. U ovoj vrsti reakcije često je korišten pekarski kvasac kao katalizator, ali su u različitim eksperimentima pronađeni drugi ekološki prihvatljivi prirodni izvori. Kao biokatalizator u provedenim eksperimentima korišteno je različito povrće te je pronađeno povrće čija je uporaba dala najveće iskorištenje reakcije.

## **2.1. Biokatalizatori**

Biokatalizatori ili enzimi su organske tvari koje svojim prisustvom u najmanjim količinama utječu na brzinu kemijske reakcije. Osnovne osobine enzima su velika katalitička moć, specifičnost, regulacija aktivnosti i transformacija različitih oblika energije. Mnogi enzimi za svoju aktivnost trebaju kofaktor, a to mogu biti metali ili male organske molekule. Kofaktori koji su male organske molekule nazivaju se koenzimi. Na enzim se mogu vezati čvrsto ili slabo. Kofaktori koji su čvrsto vezani na enzim zovu se prostetičke skupine. Slabo vezani koenzimi su vrlo vjerojatno kosupstrati svoga enzima jer se vežu i otpuštaju sa enzima istovremeno kada i supstrati i produkti.

Kemijske reakcije odvijaju se uz prijelazno stanje, koje ima višu energiju i od supstrata i od produkta. Napredovanje reakcije ovisi o temperaturi i o Gibbsovoj slobodnoj energiji aktivacije koja je razlika energije prijelaznog stanja i supstrata. Enzimi smanjuju aktivacijsku barijeru i tako ubrzavaju kemijsku reakciju tj. enzimi kataliziraju postizanje ravnoteže, ali ne pomiču njen položaj. Kombiniranjem supstrata i enzima nastaje novi reakcijski put s energetski nižim prijelaznim stanjem. Odnosno, prvi korak u enzimskoj katalizi je stvaranje kompleksa enzim-supstrat, a dio enzima koji veže supstrat zove se aktivno mjesto koje zaprema relativno mali dio ukupnog volumena enzima. Aktivno mjesto je trodimenzijska tvorevina, a čine ga ostaci aminokiselina iz raznih dijelova molekule. [1]

## **2.2. Biokatalizatori u industriji**

Biokatalitički procesi su u posljednje vrijeme našli široku primjenu posebno u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji gdje postoji velika potreba za optički čistim spojevima. Posljednjih godina kemijska industrija se bavila istraživanjem uporabe biokatalitičkih procesa u sintezi različitih produkata. Takva istraživanja provedena su u farmaceutskoj industriji radi potrebe indukcije kiralnih centara u lijekovima. Biokataliza je prvotno primjenjivana u reakcijama hidrolize i esterifikacije. Rezultat provedenih istraživanja je porast broja skupina enzima, uključujući hidrolaze, oksidoreduktaze, transferaze, liaze, ligaze i izomeraze koji kataliziraju određene organske reakcije. [2]



### 2.3. Biokatalizatori dobiveni iz mikrobioloških izvora

Sposobnost induciranja kiralnih centara u molekulama proučavana je za različite reakcijske procese. Značaj nastajanja kiralnih epoksida proučavan je korištenjem halohidrin dehalogenaze dobivene iz bakterija *Arthrobacter* sp. AD2, *Mycobacterium* sp. GP1 i *Agrobacterium radiobacter* AD1. U prisutnosti cijanida ova reakcija daje odgovarajući cijanhidrin s umjerenim iskorištenjem i enantiomernim viškom. Enantiočisti cijanhidri mogu se dobiti uz (*R*)- ili (*S*)-hidroksinitril liazu (HNL). Razvojne metode za nastajanje kiralnih cijanhidrina naročito su proučavali H. Griengl i suradnici [3] zajedno s F. Effenbergerom. [4] Jedno od područja razmatranja bila je stabilnost ovih sustava s obzirom da u djelomično pročišćenim enzimskim sustavima se mogu također odvijati i druge reakcije. Pronađeno je da flavonoidi kao rutin i hiperozid u količinama od 5 mg/ml mogu poboljšati enzimsku stabilnost i do 50 %.

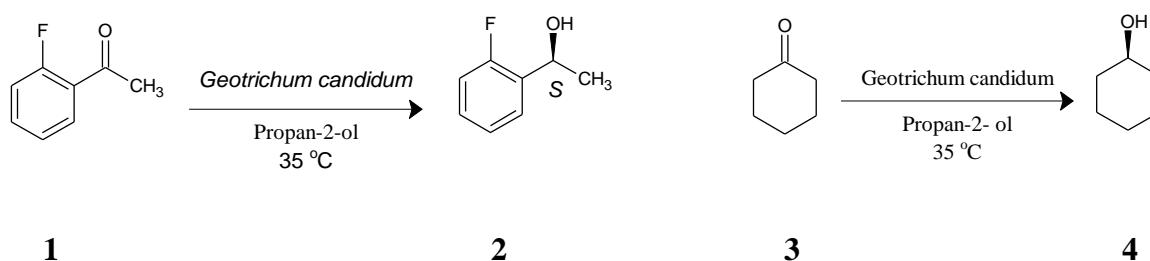
Provedeno je istraživanje u kojemu je uspoređena HNL dobivena iz kaučukovca (*Hevea brasiliensis*) sa HNL dobivenom iz badema (*Prunus amygdaloides*) i iz manioke (*Manihot esculenta*). (*S*)-HNL iz kaučukovca ispitivana je zbog djelotvornosti i selektivnosti na  $\alpha$ - i  $\beta$ -supstituirane alkile i alkoksi aldehide. HNL iz kaučukovca u usporedbi s (*R*)-HNL iz badema je dala veći dijastereomerni višak, ali je prisutnost oksidiranih supstituenata na  $\alpha$ - i  $\beta$ -položajima negativno utjecala na nju. HNL iz manioke korištena je za enantioselektivnu adiciju HCN-a u sintezi (*S*)-ketona cijanhidrina s iskorištenjem od 85-97 % i enantiomernim viškom (ee) od 69-98 %. [5]

Jedna od značajnijih reakcija je redukcija ketona u kiralne sekundarne alkohole. Prilikom ovakvih transformacija mogu se koristiti ketoreduktaze, ali one kao i alkohol dehidrogenaze zahtijevaju nikotinamid-adenin dinukleotid (NADH) ili NAD fosfat (NADPH) kao izvor vodika. Razvijane su strategije za obnavljanje ovih kofaktora *in situ*.

2004. godine skupina znanstvenika na sveučilištu u Grazu [6] proučava regioselektivnu i stereoselektivnu redukciju  $\alpha,\beta$ -nezasićenih ketona uz pomoć liofiliziranih stanice iz bakterija *Rhodococcus ruber* DSM 44541 kako bi dobili odgovarajuće alilne alkohole.

Uz ovakav sustav dobiveni su nakon 20-22 sata (*S*)-produkti u rasponu od 50-92 % s ee > 99 % . Ovaj biokatalizator, koji obnavlja kofaktor NADH u prisutnosti propan-2-ola koji je korišten kao otapalo i kao kosupstrat, je prethodno korišten za redukciju alifatskih, aromatskih i heteroaromatskih ketona.

U ovom procesu korištene su imobilizirane stanice gljive *Geotrichum candidum* i superkritični ugljikov dioksid za redukciju ketona u prisutnosti propan-2-ola. Sustav se pokazao uspješnim za redukciju cikloheksanona i 2-fluoracetofenona u (*S*)-alkohol s enantiomernim viškom > 99 %. (Slika 1)



Slika 1. Redukcije 2-fluoracetofenona (1) u (*S*)-2-fluorfeniletanol (2) i cikloheksanona (3) u cikloheksanol (4)

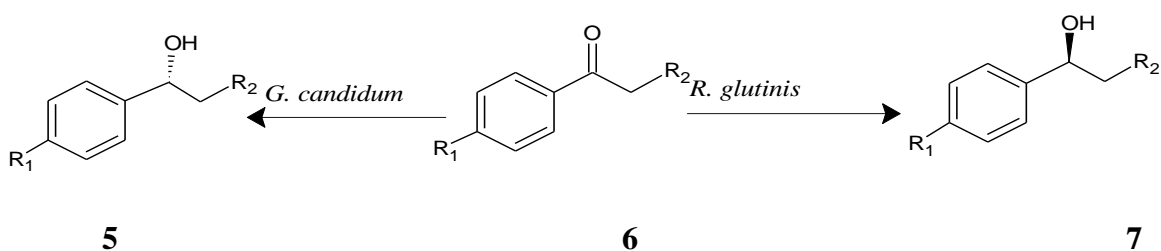
Slijedeći primjer biokatalizatora je kvasac. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 013 je korišten za redukciju aldehida i ketona uz iskorištenje reakcije 27-87 %. Za redukciju racemičnog 2-hidroksi-2,6,6-trimetilcikloheksanona korišten je pekarski kvasac, ali je iskorištenje bilo vrlo nisko i enantiomerni višak oko 90 %. Mehanizam obnavljanja kofaktora koji služe kao izvor vodika u kvascu nije u potpunosti razjašnjen. Kvasac je također korišten i u reakcijama koje uključuju transformacije ostalih funkcionalnih skupina. Primjerice, pekarski kvasac je korišten za redukciju aril-azida u odgovarajući amin za sintezu antibiotika pirol(2,1-*c*)(1,4)benzodiazepina, a kvasci su također korišteni za redukciju alkena. [7]

Upotrebu mahovine u reakcijama redukcije proučavali su Speicher i suradnici. [8] Ispitivane su kulture jetrenke (*Marchantia polymorpha*, *M. plicata* i *Asterella blumeana*) i ploveće mahovine (*Riccia fluitans*) koje su korištene za redukciju različitih alifatskih i aromatskih ketona te benzaldehida. Za acetofenon reakcija redukcije bila je umjereno uspješna, dobiven je (*S*)-1-feniletanol uz enantiomerni višak 34-74 %, a nakon 10 dana maksimalno iskorištenje reakcije je bilo 74 %.

### 2.3.1. Redukcija supstituiranih 2-halogen-1-(4-fenil)-etanona korištenjem gljive *Geotrichum candidum* CCT 1205 i kvasca *Rhodotorula glutinis* CCT 2182

Kiralni halohidrini su važni i vrijedni intermedijeri u sintezi brojnih kemikalija i lijekova kao što su optički aktivni 1,2-aminoalkoholi. L.C.Fardelone i suradnici [9] su u svome radu opisali redukciju  $\alpha$ -brom i  $\alpha$ -kloracetofenona sa supstuentima u *p*-položaju uz dvije vrste mikroorganizama: gljive *Geotrichum candidum* CCT 1205 i kvasce *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 kako bi dobili oba enantiomera halohidrina koji se mogu koristiti kao kiralni građevni elementi u pripremi odgovarajućih 1,2-aminoalkohola. U radu su korištene ove dvije vrste mikroorganizama zbog njihove djelotvornosti i potpune enantioselektivnosti dajući odgovarajući (*R*)- ili (*S*)-halohidrin uz vrlo visok enantiomerni višak.

L.C. Fardelone i suradnici [10] su izveli redukciju supstituiranih etanona uz pomoć dvije navedene vrste mikroorganizama (**Slika 2**). Kao supstituenti korištene su elektron akceptorske: -NO<sub>2</sub>, -Br, -Cl i elektron donorske skupine: -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub> smještene na *p*-položaju benzenskog prstena (**Tablica 1**).



**Slika 2.** Shematski prikaz redukcije supstituiranih etanona

**Tablica 1. Supstituirani etanoni korišteni u redukciji**

Oznaka etanona	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1a	Br	Br
1b	Cl	Br
1c	CH <sub>3</sub>	Br
1d	OCH <sub>3</sub>	Br
1e	NO <sub>2</sub>	Br
1f	Br	Cl
1g	Cl	Cl
1h	CH <sub>3</sub>	Cl
1i	OCH <sub>3</sub>	Cl
1j	NO <sub>2</sub>	Cl

Redukcija *p*-supstituiranih 2-brom-1-feniletanona (1a-1e) i *p*-supstituiranih 2-klor-1-feniletanona (1f-1j) korištenjem kvasca *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 dala je odgovarajuće halohidrine (*R*)-konfiguracije. Kada je u redukciji etanona 1a-1j korištena gljiva *Geotrichum candidum* CCT 1205 dobiveni su halohidrini (*S*)-konfiguracije. *Rhodotorula glutinis* CCT 2182 dala je produkte čija je konfiguracija u skladu s Prelogovim pravilom [11], dok je obrnut rezultat dobiven korištenjem *Geotrichum candidum* CCT 1205.

#### 2.4. Uporaba biljnih sustava za biokatalizu

Prethodno opisani sustavi dobiveni su iz mikrobioloških izvora (gljive, bakterije i kvasac). Manja pozornost dana je uporabi biljaka kao potencijalnih izvora enzima koji mogu provesti pojedine organske reakcije. Reinhard i Alfermann [12] iznose pregled biotransformacija provedenih dodavanjem supstrata kulturama biljnih stanica s posebnim naglaskom na aromatske spojeve, kumarine, alkaloidne, terpene i steroide. Broj sustava koji su bili u mogućnosti provesti određene biotransformacije nije bio povezan s poznatim supstratima i izolatima cijele biljke.

Razvijanje uporabe biljaka za ovakve transformacije rezultiralo je korištenjem tri sustava za modifikacije supstrata: stanične kulture, enzima koji potječu iz biljaka te netaknutih biljnih materijala.

### 2.4.1. Stanične kulture

Prva uporaba kultura biljnih stanica za transformaciju egzogenih metabolita zabilježena je u radu Stohsa i Stabe [13] koji su koristili digitoksin i digitoksigenin i suspenziju kulture *Digitalis*. Slijedeći je bio rad Gravesa i Smitha [14] koji su pokazali da progesteron i pregnenolon mogu, korištenjem nekoliko biljnih vrsta, sudjelovati u kemijskim pretvorbama i dati produkte. Prema tome pregnenolon (**9**) može dati progesteron (**8**) korištenjem kao katalizatora biljke crvene pustikare (*Digitalis purpurea* L.), žute pustikare (*Digitalis lutea* L.) i duhana (*Nicotiana tabacum*) i dalje uz *D. lutea* nastaje 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dion (**10**) nakon 7-14 dana.

#### 2.4.1.1. Biotransformacije steroida

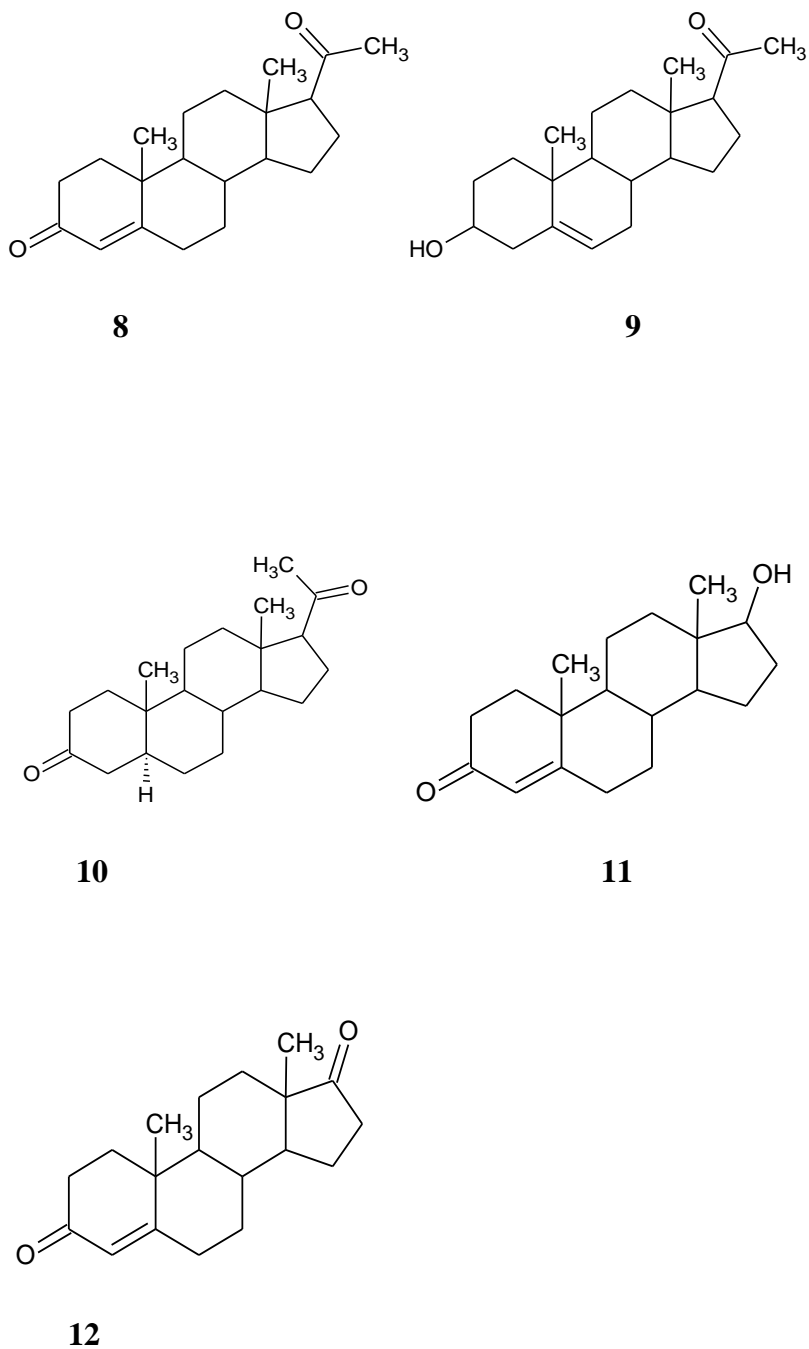
Furuya i suradnici [15] su pokazali da progesteron (**8**) može dati 5 $\alpha$ -pregnanolon-palmitat korištenjem stanica duhana (*Nicotiana tabacum*) i biljke sofore (*Sophora angustifolia*) nakon 4 i 5 tjedana.

Pregnenolon može dati pregnanolon-palmitat i pregnenolon-palmitat. U nastajanju pregnanolon-palmitata uključena su najmanje tri koraka:

1. Regio i stereospecifična redukcija karbonilne skupine na C-3 atomu
2. Stereospecifična redukcija dvostruke veze između položaja C-4 i C-5
3. Esterifikacija

Hirovani i Furuya [16] nakon ovog rada istražuju biotransformaciju testosterona i nekih androgenih derivata korištenjem stanične kulture *N. tabacum*. Rezultati su pokazali da testosteron (**11**) biotransformacijom daje 9 različitih metabolita, a androst-4-en-3,17-dion (**12**) daje 8 metabolita pri čemu su uključene iste tri reakcije koje su prethodno navedene uz esterifikaciju palmitinske kiseline ili glikozilaciju.

Frakcija  $5\alpha$ -androstan- $3\beta,17\beta$ -diola i frakcija epiandrosterona se nakon 5 dana smanjila dok su se frakcije palmitata i glukozida stalno povećavale i nakon 11 dana su stabilizirane.



**Slika 3.** Strukture progesterona (**8**), pregnenolona (**9**),  $5\alpha$ -pregnan-3,20-diona (**10**), testosterona (**11**) i androst-4-en-3,17-diona (**12**).

### 2.4.1.2. Biotransformacije terpena

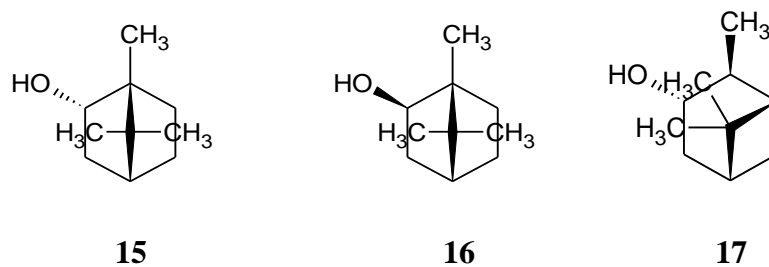
Suga i suradnici [17] su bili prvi koji su istraživali biotransformaciju jednostavnih monoterpena kulturama biljnih tkiva. Korištene su stanice duhana (*Nicotiana tabacum*) s nizom monoterpena u periodu od 7 dana. Dominantna reakcija bila je regioselektivna oksidacija *E*- metilne skupine u hidroksimetilnu skupinu.

Primjerice linalol (**13**) konverzijom daje 8-hidroksilinalol uz iskorištenje od 16,5 % i dihidro derivati linalola su odgovarajuće metabolizirani uz iskorištenje od 14,9 %. Istraživanje je prošireno korištenjem iste kulture s tri monociklična monoterpena,  $\alpha$ -terpineol, *trans*- $\beta$ -terpineol i *trans*- $\beta$ -terpinil-acetat. Iskorištenja su bila u rasponu od 3,9-15 % ali su izvedeni neki zanimljivi zaključci:  $\alpha$ -terpineol (**14**) daje 15% 7-hidroksi- $\alpha$ -terpineola dok *trans*- $\beta$ -terpineol daje 10-hidroksi i 4-hidroksi derivate pokazujući stereoselektivnu alilnu oksidaciju na C-4 atomu. Slični rezultati dobiveni su i za *trans*- $\beta$ -terpinil-acetat.



**Slika 4.** Strukture monocikličkih monoterpenских alkohola: linalola (**13**) i  $\alpha$ -terpineola (**14**)

Suga i suradnici [18] su se također bavili ispitivanjem oksidacije bicikličkih monoterpenских alkohola uključujući borneol (**15**), izoborneol (**16**) i izopinokamfeol (**17**) korištenjem suspenzije stanične kulture duhana (*Nicotiana tabacum*). Proučavane su razlike između brzina i stupnja oksidacije. Primjerice (+)-borneol nakon 10 dana daje (+)-kamfor a (-)-izomer je gotovo nepromijenjen. Slična enantioselektivnost primijećena je za (-)-izoborneol koji oksidacijom daje (+)-kamfor uz iskorištenje od 100 % te u manjem opsegu za (-)-izopinokamfeol koji oksidira u (-)-izopinokamfen uz iskorištenje od 44 %.

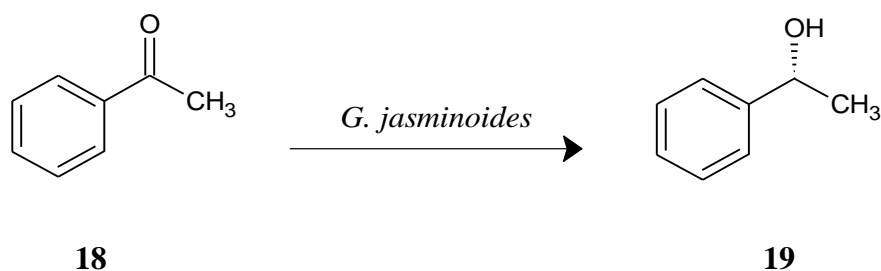


**Slika 5.** Strukture bicikličkih monoterpenskih alkohola: borneola (**15**), izoborneola (**16**) i izopinokamfeola (**17**)

#### 2.4.1.3. Biotransformacije aromatskih ketona

Naoshima i Akakabe [19] su 1991. istražili uporabu imobiliziranih stanica mrkve (*Daucus carota*), duhana (*Nicotiana tabacum*) i gardenije (*Gardenia jasminoides*), koje su bile obložene kuglicama kalcijeva alginata, u redukcijskoj biotransformaciji 4 aromatska ketona. Stanice duhana (*Nicotiana tabacum*) dale su iskorištenje u rasponu od 6-37 % a uporaba stanica gardenije (*G. jasminoides*) dala je iskorištenje 13-25 %. Imobilizirane stanice mrkve (*Daucus carota*) dale su iskorištenje u rasponu 54-70 % s enantiomernim viškom 89-99 %. Vrijeme inkubacije je variralo u rasponu od 2 do 13 dana za sustav *Daucus carota*. Naoshima i suradnici [20] su korištenjem stanica *Daucus carota* imobiliziranih u alginatu proveli reakcije u kojima su različiti keto-esteri, aromatski ketoni i heterociklički aromatski ketoni prevedeni u odgovarajuće sekundarne alkohole s iskorištenjem od 30-63 % i enantiomernim viškom od 52-99 %. Reakcije su provedene pri sobnoj temperaturi u trajanju od 5 sati do 6 dana. Acetofenoni s elektronakceptorskim skupinama reducirani su u većem stupnju nego acetofenoni s elektrondonorskim skupinama ili 2-,3- ili 4-acetopiridini. Mehanizam redukcije acetofenona imobiliziranim stanicama *Gardenia jasminoides* se sastoji od dva koraka pri čemu nastaje isključivo (*R*)-1-feniletanol. Prvi korak obuhvaća nestereospecifičnu redukciju kojom nastaje racemični alkohol, ta reakcija je praćena stereoselektivnom oksidacijom *S*-alkohola i redukcijom u ponavljajućem ciklusu. U daljnjim istraživanjima uporaba imobiliziranih stanica mrkve (*Daucus carota*) u redukciji acetofenona dala je (*S*)-alkohol s enantiomernim viškom od 99 % a uporaba stanica gardenije (*G. jasminoides*) je dala (*R*)-alkohol s enantiomernim viškom od 90 %. Imobilizirane stanice duhana (*N. tabacum*) su dale (*S*)-alkohol s enantiomernim viškom od 88 % i iskorištenjem reakcije od 50 % nakon 24 dana i jako slabe oksidacije racemičnog alkohola.





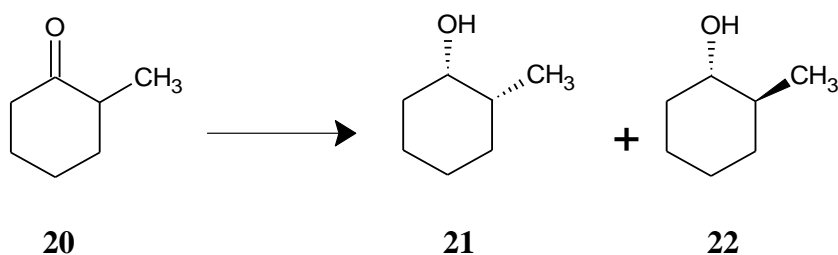
**Slika 6.** Redukcija acetofenona (**18**) u (*R*)-1-feniletanol (**19**) korištenjem stanica *Gardenia jasminoides*

### 2.4.2. Enzimi

K.D. Mukherjee [21] iznosi pregled uporabe lipaza dobivenih iz biljaka za biokatalitičku transformaciju lipida osobito triacilglicerol acilhidrolaza koje hidroliziraju esterske veze tijekom skladištenja sjemena. Gardner i Grechkin [22] proučavaju uporabu izoenzima lipoksigenaza u modifikaciji prirodnih i sintetičkih masnih kiselina koje se koriste za proizvodnju hidroperoksidnih derivata, pri čemu su reakcije regio- i stereospecifične. O uporabi biljnih sustava (stanice, organi i enzimi) za biokatalizu raspravljaju i Giri i suradnici. [23] Oni su opisali ključne moguće reakcije i strategije koje uključuju kloniranje i ekspresiju gena za potrebne enzime. Drugi primjer stereospecifičnosti koja može ukazati na veliku različitost supstrata je biosinteza alkaloida tropana. Utvrđeno je da u biosintezi alkaloida atropina ili skopolamina koji se nalaze u porodicama *Datura*, *Atropa* i *Hyoscyamus* ketoreduktaza daje  $\alpha$ -izomer na položaju C-3. S druge strane, u biosintezi kokaina na C-3 atomu nastaje  $\beta$ -izomer. Ove reduktaze, tropinon reduktazu I i tropinon reduktazu II su opsežno proučavali R.J. Robins i suradnici. [24] Jedan od ovih enzima korišten je za redukciju 3-kinuklidona u odgovarajući (*R*)-alkohol.

### 2.4.3. Neobrađivani biljni materijali

2000. godine Baldassare i suradnici [25], prepoznajući poteškoće prilikom upotrebe staničnih sustava, prvi koriste svježe biljne materijale, bez ikakvog obrađivanja, za reakcije na egzogenim organskim supstratima. Korijen mrkve (*Daucus carota*) je isjeckan te je promiješanoj suspenziji dodan supstrat. Omjer supstrata prema biljnom materijalu bio je 1:200. Nakon 50 h racemični 2-metilcikloheksanon je reduciran u smjesu (*1S,2R*)- i (*1S,2S*)-2-metilcikloheksanola u omjeru 1:1 s ee >99 % . (**Slika 7.**)



**Slika 7.** Redukcija 2-metilcikloheksanona (**20**) u (*1S,2R*)-2-metilcikloheksanol (**21**) i (*1S,2S*)-2-metilcikloheksanol (**22**) uz pomoć mrkve (*Daucus carota*)

J.S. Sousa i suradnici [26] provode eksperiment koji je usmjeren na ispitivanje sposobnosti 6 vrsta povrća za redukciju acetofenona u kiralni fenil-etanol. Korišteno povrće bilo je: patlidžan (*Solanum melongena* L.) (iskorištenje 42,1 %), slatka manioka (*Manihot dulcis*) (85,5 %), kasava, manioka, tapioka (*Manihot esculenta*) (89,3 %), mrkva (*Daucus carota*) (46,3 %), taro (*Colocasia esculenta*) (55,8 %) i batat (*Ipomoea batatas*) (42,6 %). Prema navedenim podacima iskorištenja vidljivo je da su najveći prinosi ostvareni korištenjem vrsta iz porodice *Manihot*, stoga su te dvije vrste korištene u redukciji acetofenona, benzaldehida, cinamaldehida i furfuraldehida, izvedene pri sobnoj temperaturi u trajanju od 3 dana. Iskorištenja reakcije bila su u rasponu 84-100 % s ee > 94 %. Regioselektivnost je proučavana na dva derivata cinamaldehida gdje se redukcija odvijala samo na karbonilnoj skupini. Reakcija je proširena korištenjem *M. esculenta* i *M. dulcis* za alifatske, cikličke i  $\alpha,\beta$ - nezasićene ketone te jednostavne derivate karboksilnih kiselina uključujući  $\beta$ -keto estere, nitrile i amide. Vrlo dobra iskorištenja postignuta su za heksan-3-on (97,5 % ; 96,7 %), ciklopentanon (92,3 % ; 93,4 %) i cikloheksanon (97,3 % ; 91,7). Alkoholi s (*S*)-konfiguracijom su dobiveni uz ee od 93-98 %. Puno manja iskorištenja dobivena su za pulegon i karvon.

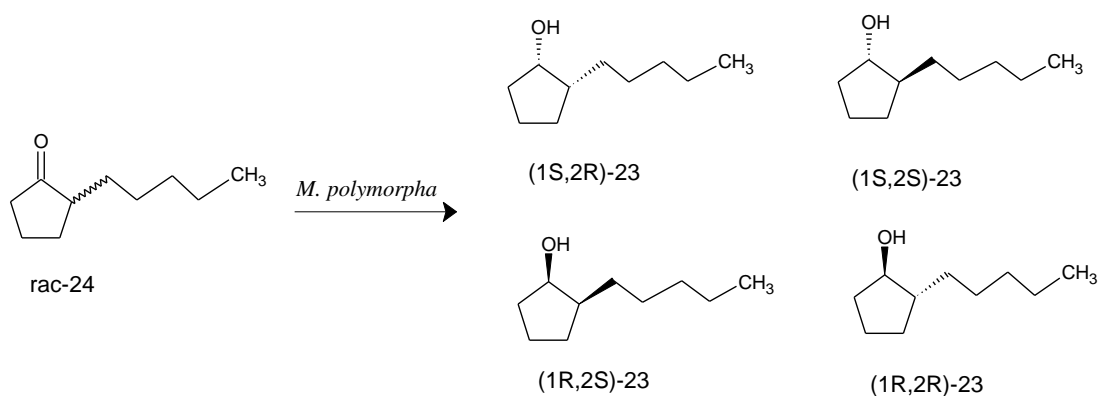
## 2.5. Stereoselektivna redukcija ketona i enona korištenjem biljnih stanica

Hamada i suradnici [27] su ispitivali biotransformaciju različitih karbonilnih spojeva i njihovih derivata uz uporabu biljnih stanica. Imobilizirane stanice mrkve, duhana i gardenije su reducirale karbonilnu skupinu aromatskih ketona u odgovarajući alkohol. Karbonil reduktaze, koje kataliziraju redukciju karbonilnih spojeva su od velike važnosti u metabolizmu lijekova.

### 2.5.1. Biotransformacija 2-pentilciklopentanona stanicama biljke jetrenke (*Marchantia polymorpha*)

Stanice biljke jetrenke (*M. polymorpha*) su inkubirane zajedno sa supstratom na temperaturi 25°C. Vrijeme reakcije i stereokemijski rezultati prikazani su u **Tablici 2**. Količina 2-pentilciklopentanol (23), koji nastaje redukcijom 2-pentilciklopentanona (24), se povećavala s vremenom inkubacije, a enantioselektivnost *syn*- (1*S*, 2*R*) i *anti*-(1*S*, 2*S*) alkohola se također poboljšala.

Međutim omjer *syn*- i *anti*- alkohola se nije znatno mijenjao. Ovi rezultati pokazuju da stanice *M. polymorpha* reduciraju 2-pentilciklopentanon u odgovarajući alkohol *anti*-2-pentilciklopentanol pri čemu je pretežno u većoj količini nastao alkohol sa (*S*)-konfiguracijom. [27]



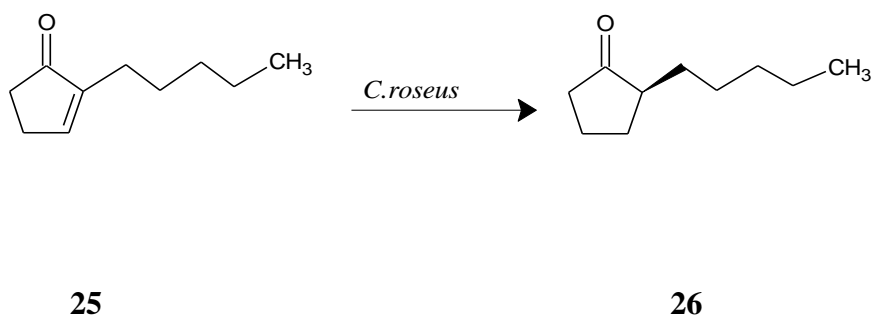
**Slika 8.** Biotransformacija 2-pentilciklopentanona (24) stanicama *M. polymorpha*

**Tablica 2.** Vrijeme biotransformacije 2-pentilciklopentanona (**24**) u 2-pentilciklopentanol (**23**)

Vrijeme reakcije(h)	Prinos (%)	Syn/Anti	ee(%)	
			Syn-(1S,2R)	Anti-(1S,2S)
12	11,5	21/79	26,8	54,9
24	20,0	20/80	32,5	62,9
48	25,1	24/76	34,1	65,2
72	32,3	26/74	80,3	65,1
120	48,3	25/75	86,9	73,3

### 2.5.2. Biotransformacija 2-pentilciklopent-2-enona (**25**) stanicama biljke madagaskarski zimzelen (*Catharanthus roseus*)

Hamada i suradnici [27] su također izveli i hidrogenaciju C=C dvostruke veze. Kada je redukcija izvedena stanicama biljke jetrenke (*Marchantia polymorpha*) nije došlo do hidrogenacije 2-pentilciklopent-2-enona (**25**) dok je korištenjem stanica biljke madagaskarski zimzelen (*C. roseus*) došlo do nastanka (*R*)-2-pentilciklopentanona (**26**) s visokom stereoselektivnošću (Slika 9). Nakon 48 h inkubacije omjer konverzije poslije hidrogenacije je bio 99 %, a apsolutna konfiguracija na položaju 2 bila je (*R*)- uz enantiomerni višak od 89 %. U ovoj biotransformaciji nije pronađen produkt reduciranja karbonilne skupine 2-pentilciklopentanona.



**Slika 9.** Hidrogenacija 2-pentilciklopent-2-enona (**25**) u (*R*)-2-pentilciklopentanon (**26**) stanicama *C.roseus*

### 2.6. Asimetrična redukcija prokiralnih ketona u kiralne alkohole katalizirana biljnim kulturama

Optički čisti lijekovi se obično sintetiziraju iz kiralnih građevnih elemenata koji se najčešće dobivaju kemijskom katalizom ili biokatalizom. Kiralni alkoholi su jedni od najvažnijih kiralnih građevnih elemenata za veliki broj kiralnih lijekova zahvaljujući njihovoj jedinstvenoj strukturi. Stereoselektivna redukcija prokiralnih ketona do kiralnih neracemičnih sekundarnih alkohola osnovni je proces u organskoj sintezi i odvija se uglavnom kemijskim i biokatalitičkim putem.

Vrlo djelotvorna reakcija za proizvodnju kiralnih alkohola je asimetrična redukcija odgovarajućih prokiralnih ketona. [28] Jedna od metoda asimetrične redukcije prokiralnih ketona je biokataliza koja uključuje izoliranu oksido-reduktazu ili žive organizme. Metoda je vrlo djelotvorna zahvaljujući blagim reakcijskim uvjetima, očuvanju enantioselektivnosti te ekološkoj prihvatljivosti. U ovom slučaju cijela stanica je dobra zamjena izoliranog enzima a kofaktor NAD(P)H i njegov regenerirajući sustav se nalaze unutar stanice te se na taj način izbjegava dodavanje ovog skupog kofaktora. Ovu metodu koja uključuje asimetričnu redukciju ketona kataliziranu cijelom stanicom razvijali su K. Nakamura i suradnici [29] pri čemu su dobivena dobra iskorištenja i visoka enantioselektivnost.

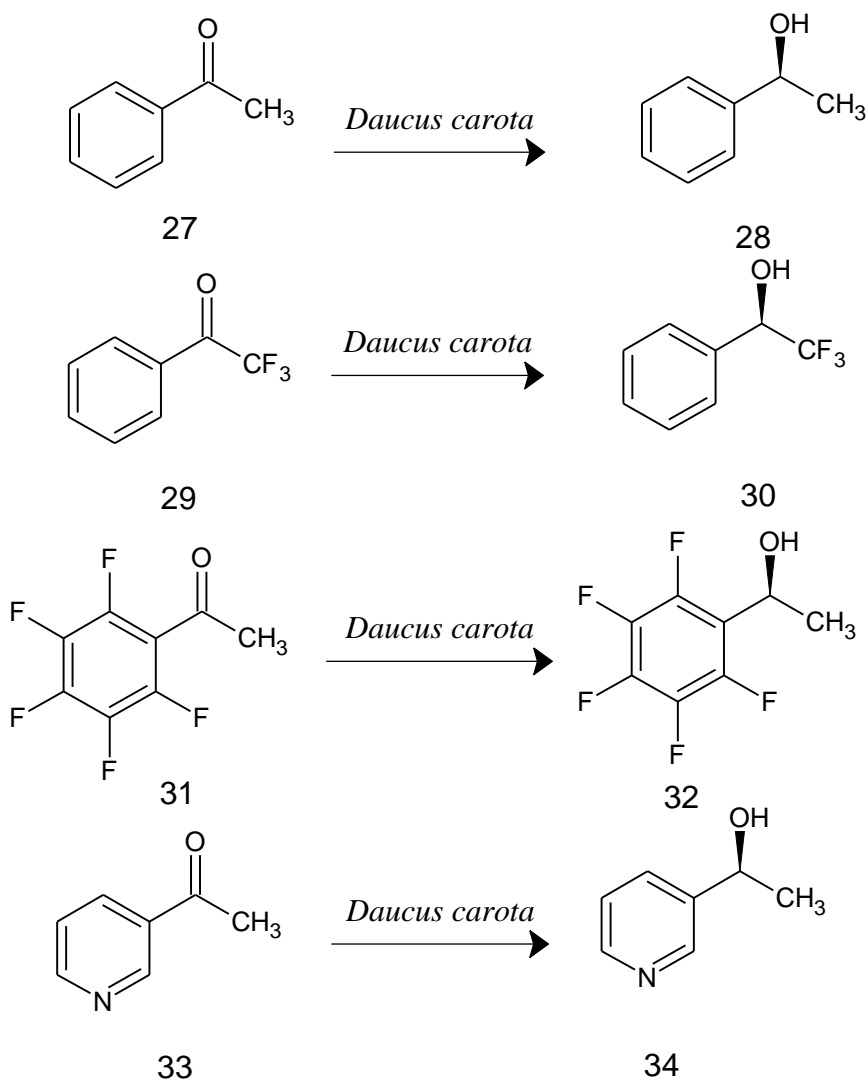
Prijašnja su istraživanja bila bazirana uglavnom na primjeni mikrobnih organizama kao biokatalizatora. Zbog toga je upravo biljna stanica potencijalni biokatalizator budući da su oksido-reduktaze i regenerirajući sustav kofaktora smješteni unutar stanice.

Nažalost, samo je nekoliko istraživanja bazirano na biotransformacijama kataliziranim cijelim stanicama. Asimetrična redukcija sintetskih prokiralnih ketona katalizirana biljnim materijalom slabo je istražena zbog čega je istraživanje vrlo vrijedno kako zbog teorijske vrijednosti tako i zbog praktične primjene. Regens koji se najčešće koristi za redukciju ketona u alkohol je  $\text{NaBH}_4$ . Ovaj spoj je toksičan i zapaljiv te je stoga vrlo opasan za rad. Uporaba ove štetne kemikalije se može izbjeći korištenjem bioreduktivnih enzima mrkve za redukciju ketona u alkohol. [28]

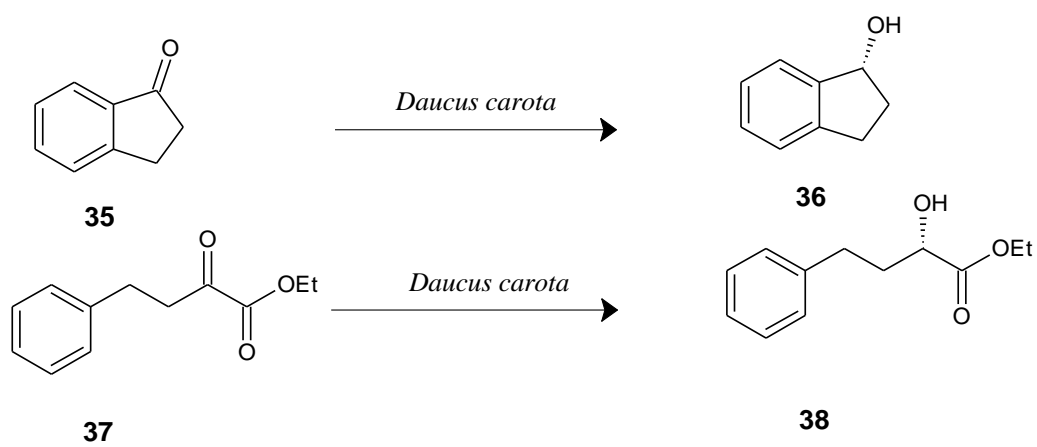
### 2.6.1. Redukcija prokiralnih ketona pomoću mrkve (*Daucus carota*)

Caron i suradnici [30] su izveli redukciju aromatskih ketona, keto estera i jednostavnih alifatskih ketona u odgovarajući alkohol. Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem spojeva u kojima je karbonilna skupina konjugirana s aromatskim i heteroaromatskim prstenom. (Slika 10) Slijedeći ketoni nisu reducirani: *p*-hidroksiacetofenon, 1-acetonafton, 3-acetilindol, 6-metoksi-1-tetralon i estron.

Cikloheksan-1,3-dioni koji nemaju supstituent na položaju 2 daju produkte kondenzacije. Razlog tome je dimerizacija diona s acetaldehidom. Stereokemijski ishod mnogih bioredukcija ketona može se predvidjeti pomoću Prelogova pravila [11]. Ovaj empirijski model je prvotno osmišljen za redukciju ketona s gljivicama *Curvularia falcata* i podrazumijeva da stereokemijski ishod ovisi o steričkim zahtjevima supstrata. Na osnovi Cahn-Ingold-Prelog pravila (CIP-sustav) [11] svrstavaju se skupine vezane na nezasićene atome prema prioritonom redosljedu, te se uspoređuju prioritne skupine na oba ugljikova atoma. Ako su obje prioritnije skupine smještene s iste strane dvostruke veze radi se o konfiguraciji Z (njem.zusammen=zajedno), a ukoliko se te skupine nalaze na suprotnim stranama dvostruke veze radi se o konfiguraciji E (entgegen=nasuprot). Prioritet se određuje na temelju atomskog broja atoma koji su neposredno vezani na nezasićene ugljikove atome. Atomi višeg atomskog broja imaju viši stupanj prioriteta. Enantioselektivnost svih dobivenih spojeva, osim za spojeve 36 i 38, je u skladu s Prelogovim pravilom [11] (Slika 11). Prisutnost nekoliko kompetitivnih oksidoreduktaza sa suprotnom stereoselektivnošću u biljnim materijalima može biti razlog ovakvog stereokemijskog ishoda za navedene supstrate.



**Slika 10.** Redukcije aromatskih ketona korištenjem kulture *Daucus carota*



**Slika 11.** Redukcije aromatskih ketona pomoću kulture *Daucus carota*

## 2.7. Redukcija acetofenona korištenjem različitih biljnih vrsta

Biokemijski potencijal biljnih stanica za proizvodnju sekundarnih metabolita kao što su lijekovi, arome, pigmenti i agrokemikalije, u vezi s njihovom biotehnološkom uporabom, je od značajne važnosti. Uzgojene biljne stanice korištene su za transformaciju važnih skupina spojeva kao što su fenil-propanoidi, terpenoidi i alkaloidi. Osim toga, redukcija aldehida i ketona sekundarnih metabolita pomoću uzgojenih biljnih stanica odvijala se stereospecifično. Proces biotransformacije pomoću različitih biljnih kultura je vrlo jednostavan zbog lake dostupnosti biljaka, uporabe vode bez izvora ugljika te ne dolazi do formiranja emulzije zbog čega se reakcija lako dovodi do kraja. Ovakva biotransformacija uz biljne stanice može zamijeniti redukciju koja se odvijala uz uporabu pekarskog kvasca. Yang i suradnici [28] su izveli asimetričnu redukciju prokiralnih ketona pri čemu su dobili kiralne alkohole. Najčešće korišteni supstrat u reakcijama redukcije ketona je acetofenon. Rezultati asimetrične redukcije acetofenona različitim biljnim kulturama prikazani su u **Tablici 3**. Asimetričnom redukcijom kataliziranom biljnim vrstama dobiven je 1-feniletanol u (*R*)- i (*S*)- konfiguraciji.

Najbolji rezultati postignuti su korištenjem mrkve (*Daucus carota*) i krumpira (*Solanum tuberosum*). Produkt reakcije katalizirane mrkvom je u (*S*)-konfiguraciji što je u skladu s Prelogovim pravilom. [11] Suprotno tome, produkt reakcije katalizirane krumpirom je u (*R*)-konfiguraciji što se protivi Prelogovom pravilu.



**Tablica 3.** Asimetrična redukcija acetofenona (**1**) u 1-feniletanol (**2**) katalizirana različitim biljnim vrstama

Biljne vrste	50h		100h		Konfiguracija
	Prinos(%) ( <b>2</b> )	Ee(%) ( <b>2</b> )	Prinos(%) ( <b>2</b> )	Ee (%) ( <b>2</b> )	
1. Jabuka ( <i>Malus pumila</i> )	38,7±2,1	82,5±2,5	40,9±1,5	81,5±2,7	R
2. Mrkva ( <i>Daucus carota</i> )	78,4±2,6	95,0±2,9	79,2±2,0	96,4±1,9	S
3. Krastavac ( <i>Cucumis sativus</i> )	50,5±1,5	75,2±3,1	55,8±1,8	75,8±3,2	S
4. Luk ( <i>Allium cepa</i> )	52,7±1,8	74,2±2,6	54,3±1,4	73,8±2,9	S
5. Krumpir ( <i>Solanum tuberosum</i> )	28,0±2,3	93,7±2,8	51,4±2,2	92,1±3,4	R
6. Rotkvica ( <i>Raphanus sativus</i> )	71,9±1,7	70,6±3,8	82,3±2,5	72,8±2,8	S
7. Batat ( <i>Ipomoea batatas</i> )	42,5±2,4	80,0±3,4	43,5±1,9	80,2±2,9	R

### 2.7.1. Redukcija acetofenona pomoću mrkve (*Daucus carota*)

Caron i suradnici [30] su također izveli redukciju acetofenona pri čemu su koristili samo enzime mrkve (*Daucus carota*). Eksperiment je izveden u sterilnim uvjetima da bi se eliminirala redukcija kontaminiranim mikroorganizmima. Produkt je lako dobiven filtracijom biljnog materijala i ekstrakcijom s etil-acetatom.

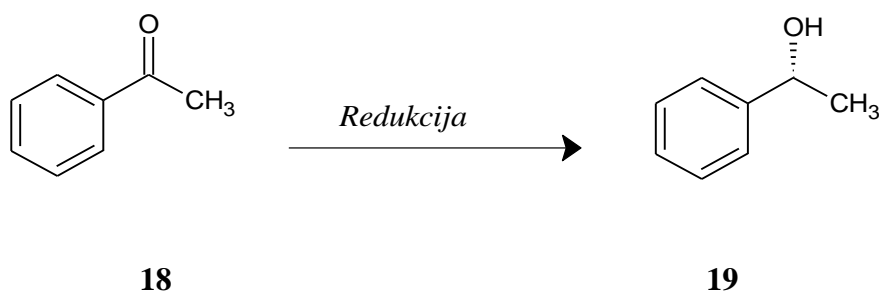
Ponovna uporaba korištenog biljnog materijala dovela je također do redukcije acetofenona i nakon šest uzastopnih pokušaja redukcije pri čemu je opet dobiven 1-feniletanol u istom visokom prinosu što znači da je biokatalizator zadržao svoju aktivnost. Nasuprot tome, nekorišteni biljni materijal je izgubio svoju aktivnost nakon jedne reakcije redukcije. Redukcije koje se odvijaju pomoću cijelih stanica obično zahtijevaju visoki omjer biokatalizatora u odnosu na supstrat.

Prisutnost nekoliko kompetitivnih oksidoreduktaza sa suprotnom stereoselektivnošću u biljnom tkivu može biti uzrok stereokemijskog ishoda s određenim supstratima. Rezultati istraživanja su pokazali da je redukcijom acetofenona nastao (*S*)-fenil etanol u visokom prinosu (96 %) te izvrsnom enantiomernom višku ( $\geq 98$  %). [30]

### 2.7.2. Redukcija acetofenona pomoću mrkve (*Daucus carota*), komorača (*Foeniculum vulgare*) i tikvica (*Cucurbita pepo*)

R. Bruni i suradnici [31] su proveli redukciju acetofenona uz pomoć tri različite biljne kulture: mrkve (*Daucus carota*), komorača (*Foeniculum vulgare*) i tikvica (*Cucurbita pepo*). Rezultati su prikazani u **Tablici 4**. Mrkva (*Daucus carota*) je nakon 3 dana reducirala prokiralni keton (acetofenon) (**18**) u čisti (*S*)-feniletanol (**19**) uz ee 100 %. Lošiji rezultati dobiveni su korištenjem komorača (*Foeniculum vulgare*) i tikvica (*Cucurbita pepo*) iako je u oba slučaja enantiomerni višak iznosio 100 %.

Druge korištene biljke bile su: patlidžan (*Solanum melongena*), krastavac (*Cucumis sativus*), bijeli i crveni luk (*Allium cepa*), češnjak (*Allium sativum*) i rotkvica (*Raphanus sativus*). No, uporaba navedenih biljaka nije reducirala acetofenon niti nakon 5 dana inkubacije.



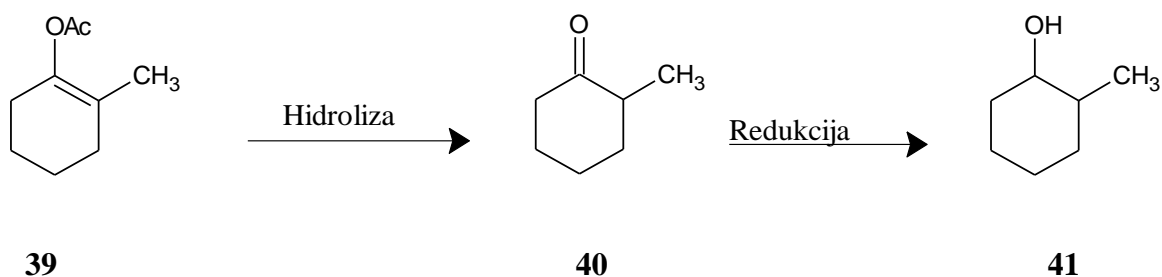
**Slika 12.** Redukcija acetofenona (**18**) u (*S*)-feniletanol (**19**)

**Tablica 4.** Redukcija acetofenona korištenjem navedenih biljnih vrsta

Biljke	Vrijeme (dani)	(S)-feniletanol	
		Prinos (%)	Ee (%)
Mrkva ( <i>Daucus carota</i> )	3	100	100 (S)
Komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	3	37	100 (S)
Tikvice ( <i>Cucurbita pepo</i> )	3	10	100 (S)

### 2.8. Hidroliza 1-acetoksi-2-metilcikloheksena

R. Bruni i suradnici [31] su proveli hidrolizu 1-acetoksi-2-metilcikloheksena uz uporabu različitih biljaka. Sve korištene biljke su kroz nekoliko sati dale 2-metilcikloheksanon hidrolizom 1-acetoksi-2-metilcikloheksena uz veliki prinos. Krastavac, banana (*Passiflora tarminiana*), bijeli i crveni luk, češnjak i rotkvica su dali (S)-2-metilcikloheksanon uz enantiomerni višak od 33-44 % za 8-24 h dok su komorač, tikvice i patlidžan dali isti produkt, ali uz puno manji enantiomerni višak (3-17 %). S druge strane neke vrste kao npr. mrkva, tropska jabuka (*Annona cherimola*), divlji krastavac (*Cyclanthera pedata*) i marakuja (*Passiflora quadrangularis*) su nakon hidrolize 1-acetoksi-2-metilcikloheksena u 2-metilcikloheksanon reducirali 2-metilcikloheksanon u homokiralni *trans* ili *cis* alkohol. (Slika13). Nakon dva sata inkubacije, mrkva je u potpunosti hidrolizirala 1-acetoksi-2-metilcikloheksen u (S)-2-metilcikloheksanon uz prinos od 89 % i ee 45 %, pri čemu je nastala i mala količina *trans*-alkohola (5 %). Redukcija se nastavila i nakon 24 h nastao je *1S,2S-trans*-2-metilcikloheksanol (prinos 75 %, ee 100 %) uz *cis*-alkohol (11 %) a ostatak (14 %) sačinjavao je čisti (*R*)-2-metilcikloheksanon (ee 100 %). [31]



**Slika 13.** Hidroliza 1-acetoksi-2-metil-cikloheksena (**39**) u 2-metilcikloheksanon (**40**) i njegova redukcija u metilcikloheksanol (**41**)

## 2.9. Redukcija aromatskih ketona s halogenom i $\beta$ -ketoestera

Enantiomeri aromatskih alkohola s halogenom su jedni od najvažnijih kiralnih građevnih elemenata mnogih lijekova kao što su L-klorprenalin, *R*-tomoksetin, *S*-fluoksetin, *R*-salbutamol i *R*-denopamin. Ovi kiralni alkoholi se mogu sintetizirati asimetričnom redukcijom odgovarajućeg prokiralnog aromatskog ketona s halogenom. Za istraživanje asimetrične redukcije aromatskih ketona s halogenom, katalizirane biljnim vrstama, Yang i suradnici [28] su kao model uzeli 4'-kloracetofenon budući da on posjeduje karakteristike navedenih skupina ketona, dok su za istraživanje redukcije  $\beta$ -ketoestera kao model izabrali etil-4-kloracetoacetat.

### 2.9.1. Redukcija 4'-kloracetofenona

Produkti redukcije 4'-kloracetofenona su *R*- ili *S*-1-(4-klorfenil)etanol koji su ključni međuproducti u sintezi mnogih kiralnih lijekova. Rezultati redukcije su prikazani u **Tablici 5**, te su slični rezultatima redukcije acetofenona katalizirane istim biljnim vrstama.

Štoviše, za većinu biljnih vrsta vrijednosti enantiomernog viška i iskorištenja reakcije su  $\geq 90\%$  i  $\geq 50\%$ , što je više nego za redukciju acetofenona.

Te vrijednosti enantiomernog viška i iskorištenja reakcije upućuju na to da su aromatski ketoni s halogenom prihvatljiviji supstrati za biljne stanice nego čisti aromatski ketoni.

Veza klora i ugljika fenilne skupine povećava razliku u elektronegativnosti između dvije skupine koje se nalaze na dvije strane karbonilne skupine što poboljšava enantioselektivnost ove reakcije. [28]

**Tablica 5.** Asimetrična redukcija 4'-kloracetofenona (**3**) u 1-(4-klorfenil)etanol (**4**) pomoću različitih biljnih vrsta

	<b>Biljne vrste</b>	<b>50h</b>		<b>100h</b>		<b>Konfiguracija</b>
		<b>Prinos(%) (4)</b>	<b>Ee (%) (4)</b>	<b>Prinos(%) (4)</b>	<b>Ee(%) (4)</b>	
1.	Jabuka ( <i>Malus pumila</i> )	59,2±1,2	92,4±1,6	65,2±1,9	93,1±1,9	R
2.	Mrkva ( <i>Daucus carota</i> )	41,7±1,6	99,0±0,8	42,6±1,1	98,2±1,7	S
3.	Krastavac( <i>Cucumis sativus</i> )	70,4±1,3	94,1±1,6	72,4±2,0	93,1±1,8	S
4.	Luk ( <i>Allium cepa</i> )	57,7±2,0	89,0±1,8	74,5±2,6	90,0±2,9	S
5.	Krumpir ( <i>Solanum tuberosum</i> )	50,1±1,7	99,1±0,9	62,6±1,9	98,6±1,4	R
6.	Rotkvica ( <i>Raphanus sativus</i> )	55,1±1,8	89,2±2,6	72,4±2,1	90,2±2,1	S
7.	Batat ( <i>Ipomoea batatas</i> )	53,1±1,9	93,6±1,2	53,1±2,4	93,0±1,8	R

### 2.9.2. Redukcija etil-4-kloracetoacetata

Redukcijom etil-4-kloracetoacetata nastaje etil-(*S*)-(-)-4-klor-3-hidroksibutanoat. Iskorištenja reakcije i enantioselektivnost reakcije prikazani su u **Tablici 6**. Najbolji rezultati dobiveni su kada se kao biokatalizator koristila mrkva (*Daucus carota*). Rezultati pokazuju da je u svim reakcijama, osim u reakciji u kojoj je kao biokatalizator korišten luk (*Allium cepa*) dobiven produkt *S*-konfiguracije. Vrijednosti iskorištenja reakcije i enantiomernog viška nisu tako dobre kao za redukciju aromatskih ketona, ali su rezultati usporedivi sa onima dobivenim u toj istoj reakciji kataliziranoj mikrobima. [28]

**Tablica 6.** Asimetrična redukcija etil- 4-kloracetoacetata (**5**) u etil(-)-4-klor-3-hidroksibutanoat (**6**) korištenjem različitih biljnih vrsta

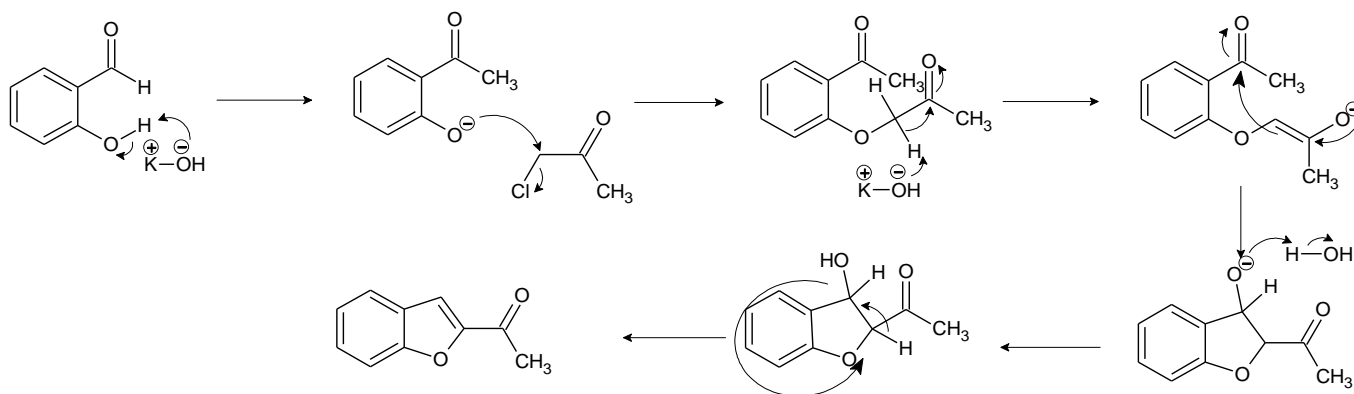
	Biljne vrste	50h		100h		Konfiguracija
		Prinos(%) (6)	Ee (%) (6)	Prinos(%) (6)	Ee (%) (6)	
1.	Jabuka ( <i>M. pumila</i> )	25,4±2,6	85,3±2,1	28,4±2,8	88,3±3,6	S
2.	Mrkva ( <i>D. carota</i> )	39,6±2,3	90,1±2,2	45,5±2,2	91,0±2,1	S
3.	Krastavac ( <i>C. sativus</i> )	35,±2,9	75,3±2,9	37,7±2,7	73,3±2,9	S
4.	Luk ( <i>A. cepa</i> )	48,8±2,1	70,6±3,6	56,0±3,4	76,6±3,4	R
5.	Krumpir ( <i>S.tuberosum</i> )	24,6±3,4	58,4±2,4	29,6±2,9	60,4±3,2	S
6.	Rotkvica ( <i>R.sativus</i> )	21,0±3,6	68,7±2,9	31,2±3,1	65,7±2,7	S
7.	Batat ( <i>I.batatas</i> )	36,0±2,7	82,4±3,6	46,7±2,4	80,4±3,3	S

## 2.10. Sinteza 1-(benzofuran-2-il)-etanola

1-(benzofuran-2-il)-etanol se može sintetizirati iz salicilaldehida aldolnom kondenzacijom te biotransformacijom uz pomoć enzima mrkve ili pekarskog kvasca. [32]

### 2.10.1. Sinteza 1-(benzofuran-2-il)-etanola iz salicilaldehida aldolnom kondenzacijom

Salicilaldehid se najprije prevodi u keton aldolnom kondenzacijom korištenjem jake baze, kalijeva hidroksida, (KOH) u etanolu. Nakon toga dodaje se kloroaceton te se dobiva 1-(benzofuran-2-il)-etanon koji će biti reduciran u 1-(benzofuran-2-il)-etanol. Sinteza se odvija prema mehanizmu prikazanom na **slici 14**. [32]

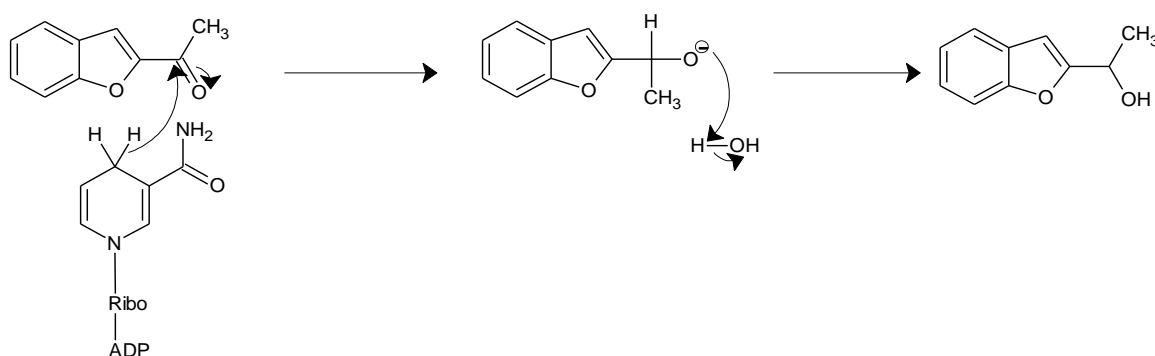


**Slika 14.** Mehanizam sinteze 1-(benzofuran-2-il)-etanola iz salicilaldehida aldolnom kondenzacijom

Općenito, u aldolnoj kondenzaciji molekule koje sadrže karbonilnu skupinu mijenjaju se u molekule koje sadrže aldehyd i neku drugu funkcionalnu skupinu kao što je karbonilna skupina, alkoholna itd. Najprije se odvija reakcija eliminacije korištenjem jake baze te se stvara enolatni ion. Ovaj međuprodukt može sudjelovati u brojnim reakcijama; u ovom eksperimentu formiranom prstenu dodan je ester. Zbog stabilnije konfiguracije, u molekuli dolazi do pregrađivanja te uz dodavanje vode nastaje keton. [32]

## 2.10.2. Redukcija 1-(benzofuran-2-il)-etanona korištenjem enzima mrkve

Budući da aktivnost enzima ovisi o dodirnoj površini enzima i reaktanta, veličina površine mrkve bi trebala utjecati na količinu nastalog produkta. Prema tome postavljena je hipoteza da povećavanjem površine mrkve, sjeckanjem, raste količina nastalog 1-(benzofuran-2-il)-etanola. U ovome eksperimentu korištene su tri varijacije mrkve: cijela mrkva, sjeckana i ribana mrkva te su dobiveni rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenim korištenjem  $\text{NaBH}_4$  kao reducensa. [32]



**Slika 15.** Mehanizam biotransformacije 1-(benzofuran-2-il)-etanona u 1-(benzofuran-2-il)-etanol korištenjem enzima mrkve

Kada su za redukciju 1-(benzofuran-2-il) etanona korištene ribane i sjeckane mrkve dobiven je 1-(benzofuran-2-il)-etanol. Kada su za biotransformaciju korištene cijele mrkve dobiveno je iskorištenje od 27 % što je puno manje nego kada su u biotransformaciji korištene sjeckane i ribane mrkve. To može biti povezano s nedostatkom površine izložene otopini, naročito kada se uspoređi s ribanim i sjeckanim mrkvama koje imaju veliku dodirnu površinu s vodom i međuproduktom reakcije, 1-(benzofuran-2-il)-etanonom. [32]

Uspoređeni su rezultati dobiveni korištenjem sjeckane mrkve s rezultatima dobivenim korištenjem ribane mrkve. Sjeckane mrkve dale su veće iskorištenje reakcije. Razlog tome je to što kada su mrkve ribane dolazi do lomljenja stanica mrkve što smanjuje njihovu reducirajuću moć prilikom biotransformacije. Drugi razlog je to što otopina koja sadrži sjeckane mrkve omogućava puno bolji kontakt međuprodukta i usitnjene mrkve te omogućuje puno bolje miješanje otopine. [32]



### 3. Zaključak

U ovome radu opisana je uporaba različitih biljaka za dobivanje alkohola iz spojeva s karbonilnom skupinom. Takve biotransformacije, koje uključuju primjenu načela zelene kemije, su se pokazale kao dostojna zamjena konvencionalnim kemijskim procesima.

Također, opisana je i uporaba mikroorganizama u redukciji spojeva s karbonilnom skupinom što su ujedno i prve izvedene biotransformacije. Primjerice, opisana je uporaba bakterija *Rhodococcus ruber* u transformaciji diola u kiralne keto alkohole, te u redukciji  $\alpha,\beta$ -nezasićenih ketona u alilne alkohole.

Opisana je i uporaba mahovine u reakcijama redukcije kao i uporaba kultura *Geotrichum candidum* u redukciji supstituiranih etanona.

Osim navedenih reakcija u radu je opisana i reakcija redukcije spojeva s karbonilnom skupinom pomoću pekarskog kvasca, što je ujedno i najčešće izvođena reakcija.

Brojni znanstvenici su proveli redukciju acetofenona korištenjem različitog povrća. U istraživanjima koja su proveli R. Bruni i suradnici [31] kao reducensi korištene su vrste povrća kao npr. mrkva, komorač, tikvice, patlidžan, luk, krumpir, krastavac itd. Opisana je i redukcija acetofenona u 1-feniletanol koju provode i Yang i suradnici [28] pomoću enzima mrkve a uz nju koriste i druge vrste povrća kao npr. batat, luk, krastavac, rotkvicu itd. Uporabu mrkve, *Daucus carota*, u redukciji acetofenona opisali su i Caron i suradnici. [30] Rezultati svih provedenih istraživanja navedenih znanstvenika pokazali su da kulture *Daucus carota* reduciraju ketone uz najveće iskorištenje reakcije te visok enantiomerni višak. Na kraju rada prikazano je istraživanje koje provode Blanchard i Weghe [32] u kojemu je opisana redukcija 1-(benzofuran-2-il)-etanona korištenjem enzima mrkve.

Rezultati su pokazali da enzimi mrkve daju odgovarajući alkohol, 1-(benzofuran-2-il)-etanol, u vrlo dobrom prinosu te da količina nastalog produkta ovisi također i o dodirnoj površini enzima i reaktanta.

Prema tome najbolje iskorištenje reakcije dobiveno je korištenjem usitnjene mrkve dok su neusitnjene mrkve reducirale alkohol uz puno manje iskorištenje reakcije.

Također, rezultati su pokazali da pretjeranim usitnjavanjem uzorka mrkve dolazi do lomljenja stanica mrkve što smanjuje njihovu reducirajuću moć, prema tome kada su korištene ribane mrkve dobiveno je manje iskorištenje nego prilikom korištenja nasjeckane mrkve.

Sva opisana istraživanja su provedena u ekološki prihvatljivim uvjetima. Još jedna prednost biotransformacije je to da se redukcija ketona i aldehida pomoću biljnih kultura odvija stereospecifično. Rezultati su pokazali da su prokiralni ketoni reducirani uz dobru enantioselektivnost u rasponu enantiomernog viška od 70-100 %. Iako su u mnogim navedenim istraživanjima dobiveni prihvatljivi rezultati prilikom izvođenja opisanih eksperimenata postoje i veliki problemi koji su navedeni i na samom početku rada. To su primjerice: pronalazak odgovarajućeg zelenog otapala, nedovoljna istraženost utjecaja korištenih prirodnih izvora te nemogućnost nastanka željenog produkta. Također, mnogi spojevi imaju različite optičke varijacije te su biološki i kemijski upotrebljivi samo u određenom stereospecifičnom obliku, prema tome za njihovu uporabu je važna selektivnost reakcije tj. ako neki prirodni izvor ne može dati točno određeni spoj zapravo je neupotrebljiv. Za većinu svijeta biokatalizatori još uvijek nisu opcija zbog njihove visoke cijene i problema prilikom njihova uvoza. Zelena kemija je novije područje i još uvijek nedovoljno istraženo stoga potpuna uporaba reagensa koji su ekološki prihvatljivi te izbacivanje toksičnih i štetnih reagensa iz uporabe u sintezama još uvijek nije moguće.

#### 4. Literatura

- [1] L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
- [2] H. Luna, *Rev. Soc. Quim. Mex.* **48**, (2004), 211-219.
- [3] D.V. Johnson, H. Griengl, *Adv. Biochem. Eng / Biotechnol.* **63**, (1999), 31-55.
- [4] F. Effenberger, *Chimia* **53**, (1999), 3-10.
- [5] G. Roda, S. Riva, B. Danieli, H. Griengl, U. Rinner, M. Schmidt, A.M. Zabelinskaja, *Tetrahedron* **58**, (2002), 2979-2983.
- [6] T. Matsuda, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada, K. Nakamura, *Chem. Commun.*, (2003), 1198-1199.
- [7] K. Toneva, S. Vlahov, S. Boneva, S. Vassilev, K. Vassilev, *Dokl. Bulg. Akad. Nauk.* **55**, (2002), 43-48.
- [8] A. Speicher, H. Roeser, R. Heisel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **22**, (2003), 71-77.
- [9] L. C. Fardelone, J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, *Arkivoc.* **10**, (2003), 404-410.
- [10] L. C. Fardelone, J. A. R. Rodrigues, P. J. S. Moran, *Journal of Molecular Catalysis B* **39**, (2006), 9-12.
- [11] S. H. Pine, Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
- [12] E. Reinhard, A. W. Alfermann, *Adv. Biochem. Eng.* **16**, (1980), 49-83.
- [13] S. J. Stohs, E. J. Staba, *J. Pharm. Sci.* **54**, (1965), 56-58.
- [14] J. M. H. Graves, W. K. Smith, *Nature* **214**, (1967), 1248-1249.
- [15] T. Furuya, M. Hortani, K. Kawaguchi, *Phytochemistry* **10**, (1971), 1013-1017.
- [16] M. Hirotsu, T. Furuya, *Phytochemistry* **13**, (1974), 2135-2142.
- [17] T. Suga, T. Hirata, Y. Hirano, T. Ito, *Chem. Lett.* (1976), 1245-1248.
- [18] T. Suga, T. Hamada, T. Hirata, *Plant Cell Rep.* **2**, (1983), 66-68.
- [19] Y. Naoshima, Y. Akakabe, *Phytochemistry* **30**, (1991), 3595-3597.

- [20] Y. Akakabe, M. Takahashi, M. Kamezawa, K. Kikuchi, H. Tachibana, T. Otani, Y. Naoshima, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, (1995), 1295-1298.
- [21] K. D. Mukherjee, *Lipid Biotechnol.*, (2002), 399-415.
- [22] H. W. Gardner, A. N. Grechkin, *Lipid Biotechnol.*, (2002), 157-182.
- [23] A. Giri, V. Dhingra, C. C. Giri, A. Singh, O. P. Ward, M. L. Narasu, *Biotechnol. Adv.* **19**, (2001), 175-199.
- [24] R. J. Robins, N. J. Walton, *The Alkaloids, Chemistry and Biology* (G. A. Cordell, G. A., Ed), Academic Press, San Diego, 1993, 115-187.
- [25] F. Baldassare, G. Bertoni, C. Chiappe, F. Marioni, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **11**, (2000), 55-58.
- [26] J. S. N. Sousa, L. L. Machado, M. C. de Mattos, S. Solange, T. L. G. Lemos, G. A. Cordell, *Phytochemistry* **67**, (2006), 1637-1643.
- [27] Hiroki Hamada, Y. Miyamoto, K. Ishihara, N. Nakajima, Hatsuyuki Hamada, *Plant Biotechnology* **19**, (2002), 203-205.
- [28] Z. H. Yang, R. Zeng, G. Yang, Y. Wang, L. Z. Li, Z. S. Lv, M. Yao, B. Lai, *J Ind Microbiol. Biotechnol* **35**, (2008), 1047-1051.
- [29] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsudab, *Tetrahedron Asymmetr.* **14**, (2003), 2659-2681.
- [30] D. Caron, A. P. Coughlan, M. Simard, J. Bernier, Y. Piche, R. Chenevert, *Biotechnology Letters* **27**, (2005), 713-716.
- [31] R. Bruni, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, G. Sacchetti, *Tetrahedron Letters* **43**, (2002), 3377-3379.
- [32] N. Blanchard, P. Van de Weghe, *Org. Biomol. Chem.* **4**, (2006), 2348.