



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

GRADU AMAIERAKO LANA

**AZILAZIO BIDEZKO [2,2]PARAZIKLOFANOEN  
DESIMETRIZAZIOA**

**Egilea:** Nahia Egaña Agirre

**Zuzendaria:** Rosa López Álvarez

Kimikako Gradua

Kimikako Fakultatea

Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV)



## LABURDURAK ETA AKRONIMOAK

Lan honetan, "Guidelines for Authors"-n (J. Org. Chem., January 2017) gomendatutako laburdurak eta akronimoak erabili dira. Ondorengoak izan dira:

Asp	Azido aspartikoa
Bal	Baliokide
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipasa
°C	Gradu Celsius
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
<i>ee</i>	Soberakin enantiomerikoa
EMN	Erresonantzia magnetiko nuklearra
EtOAc	Etil azetatoa
F.p.	Fusio-puntua
g	Gramoak
GMK	Geruza meheko kromatografia
h	Orduak
His	Histeina
HPLC	Bereizmen altuko likido kromatografia
Hz	Hertzio
IG	Infragorria
<i>J</i>	Akoplamendu konstantea
Kat	Katalizatzailea
mol	Molak
t	Denbora
T	Tenperatura
THF	Tetrahidrofurano
PCP	Paraziklofanoa
ppm	Part per million
Ser	Serina
μ	Mikro



## LABURPENA

Kiralitate planodun molekulak hiru dimentsiotako konplexutasuna nola kiralitatea sortzeko gai den adibide da, molekulen ezagueran eraginez. [2,2]paraziklofanoen (PCPak), propietate fisiko eta kimiko jakinak dituztenak, erabilera bultzatzen ari dira zurrun eta egonkorak diren bizkarrezur kiral gisan, adibide garrantzitsu bat izanik. Erabilera itxaropentsuak eduki ditzaketen arren, PCP enantiopuruak bereizmen kromatografikoan eta erresoluzio zinetikoetan oinarritzen diren metodologiaren bidez lortzen dira oraindik. Gradu Amaierako Lan hau *meso*- eta zentrosimetrikoak diren PCPen desimetrizazio katalitikoan oinarritzen da, hidrolasak bultzatutako azilazio erreakzioen bidez. Biokatalisiak erreakzio baldintza apalak eta erreakzioetan erabiltzeko erraztasuna bezalako abantailak eskaintzen ditu.

Zehazki, PCPtik eratorritako diol pseudo-gem- eta diol pseudo-para erabiliz, transesterifikazio erreakzioetan oinarritutako ikerketa gauzatu da, agente azilatzailer bezala binil azetatoa eta binil hexanoatoa erabiliz, *Candida rugosa* lipasaren presentzian. Lipasak ematen duen indukzio asimetrikoan disolbatzaile organikoak duen eraginari buruzko azterketa egin da, eta dagozkien monoazetatoak eta monohexanoatoak isolatzea posible izan da, hurrenez hurren, % 66 eta % 70 arteko enantiomero soberakinarekin. Lan honek lipasek bultzatutako transesterifikazioak balioztatzen ditu PCP enantiopuruak lortzeko metodo gisa. Enantiomero soberakina eta erreakzio eskala hobetzeko lanak martxan dihardu.

## SUMMARY

Molecules with chiral planes are an example of how three-dimensional complexity can produce chirality and, consequently, affect molecular recognition. [2,2]Paracyclophanes (PCPs), which possesses certain physical and chemical properties that are boosting their use as rigid and stable chiral backbones, are an important example. In spite of their promising uses, enantiopure PCPs are still mainly obtained by methodologies based on chromatographic and kinetic resolutions. This Final Degree Thesis is focused on the catalytic desymmetrization of *meso*- and centrosymmetric PCPs using acylation reactions promoted by hydrolases, as biocatalysis, and offers several interesting advantages such as mild reaction conditions and operational simplicity.

Specifically, a study has been carried out on the transesterification reactions of diols derived from the pseudo-gem- and pseudo-para PCP skeleton using vinyl acetate and vinyl hexanoate, as acylating reagents, in the presence of *Candida rugosa* lipase. A study of the impact of the organic solvent employed on the asymmetric induction provided by the lipase has been carried out and it has been possible to isolate the corresponding monoacetates and

monohexanoates with enantiomeric excesses of up to 66 and 70%, respectively. The work validates lipase-promoted transesterification as a valid approach to generate enantiopure PCPs. Work is underway to improve the enantiomeric excess and reaction scale.

# GARAPEN IRAUNKORREKO HELBURUEN (GIH) IDENTIFIKAZIOA ETA GOGOETA

2015.urtean, NBEk Garapen Iraunkorrerako 2030 Agenda onartu zuen, herrialdeek eta haien gizarteak, guztion artean bizitza hobetzeko bide berri bati ekiteko asmotan, inor atzean utzi gabe. Agendak Garapen Iraunkorreko 17 Helburu ditu, hala nola, pobrezia ezabatzen hasi eta klima aldaketaren aurkako borroka, hezkuntza, genero berdintasuna, ingurumenaren defentsa edo gure hirien diseinua.

Gradu Amaierako Lan hau katalisi entzimatiakoaren erabileran oinarritzen da nagusiki. Batez ere, molekula enantiopuruak lortzea du helburu, gero molekula hauek kimikaren alor ezberdinetan erabil daitezten, materialen kimikan zein biomedikuntzan erabilerak eduki ditzatenak. Konposatu enantiopuruaren sintesian aplikatutako katalisi entzimatiakoa funtsezko tresna da Garapen Iraunkorreko hainbat Helburu (GIH) jorratzeko. Lehenik eta behin, 9. GIHri (Industria, Berrikuntza eta Azpiegitura) ekarpena egiten dio, kimikaren alorrean teknologia jasagarrien ikerketa eta garapena sustatzen duelako. Gainera, katalizatzaile gisa lipasak erabiltzen direnez, baliabideen erabileran eraginkortasuna sustatzen da (12. GIH - Ekoizpen eta Kontsumo Arduratsua), sintesi kimikoko prozesuetan sortzen diren hondakin kopurua murriztuz. Beste aldetik, konposatu enantiopuruak modu selektibo eta eraginkorrago batean lortuz, medikamentu seguruago eta eraginkorragoen produkzioa bultzatzen da, alor farmazeutiko zein osasungintzan, 3. GIHrekin erlazionatuta dagoena (Osasuna eta Ongizatea). Hau guztia esan ondoren, laburbilduz, konposatu enantiopuruaren sintesirako aplikatutako katalisi entzimatiak ez dio soilik industria kimikoaren berrikuntzari bultzada ematen, baizik eta jasagarritasunari eta gizartearen ongizateari ere ekarpena egiten dio.





## AURKIBIDEA

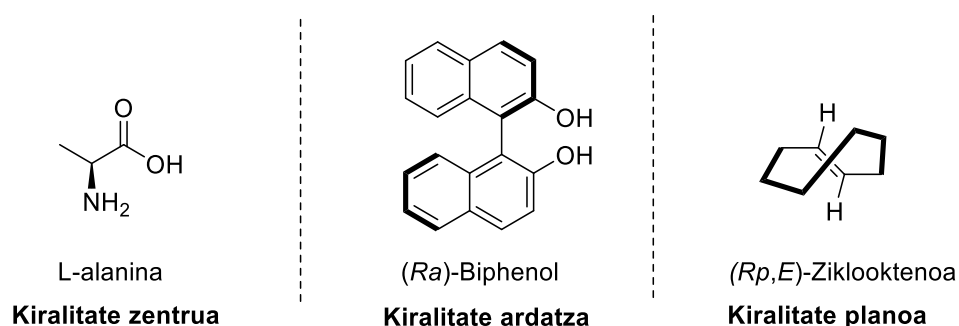
1.	SARRERA .....	10
2.	HELBURUAK .....	26
3.	EMAITZAK ETA DISKUSIOA.....	28
3.1.	[2,2]Paraziklofanoen sintesia desimetrizazio erreakzioetarako (4 eta 7) .....	28
3.2.	Diol pseudo-gem 4 eta pseudo-para 7-tik eratorritako monoester errazenikoaren prestaketa (8, 9, 10, 11, 12 eta 13) .....	29
3.3.	Lipasa bidez katalizatutako 4 eta 7 diolen transesterifikazio erreakzioen jarraipena (8, 9, 10, 11, 12 eta 13).....	30
4.	ONDORIOAK.....	36
5.	ZATI ESPERIMENTALA.....	38
5.1.	Erreaktiboak, disolbatzaileak eta prozedura orokorrak .....	38
5.2.	4-13-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (4) .....	39
5.2.1.	4-Karboximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (2) .....	39
5.2.2.	4-Karboximetil-13-formil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (3).....	40
5.2.3.	4-Karboximetil-13-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (4).....	41
5.3.	4-16-Dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (7) .....	41
5.3.1.	Pseudo-para-diformil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (6).....	41
5.3.2.	4,16-Dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (7).....	42
5.4.	Monoazetato/monohexanoato errazemikoaren eta diazetato/dihexanoatoaren sintesi orokorra (8, 9, 10, 11, 12 eta 13).....	43
5.5.	Lipasa bidez katalizatutako transesterifikazio-erreakzioen prozedura orokorra (8, 9, 10, 11, 12 eta 13).....	46
	ERANSKINAK 1: HPLC.....	48
	ERANSKINAK 2: <sup>1</sup> H-EMN ETA <sup>13</sup> C-EMN .....	56
	ERANSKINAK 3: IG .....	68



# 1. SARRERA

Kiralitatea, biologikoki aktiboak diren molekuletan oso presente dagoen ezaugarri bat da. Molekula bat kirala da bere ispilu irudiarekin gainezarri ezin denean, kasu horretan, enantiomeroak izango dira.<sup>1</sup> Hauek simetria elementuen gabezia daukate,  $C_1$  talde puntualekoak izanik. Hala ere, kiralitatea simetria ardatza erakusten duten molekulekin bateragarria da,  $C_n$  talde puntualekoak izanik ( $n > 1$ ). Enantiomeroen berezitasuna da ingurune asimetrikoarekin interakzionatzean propietate desberdinak eduki ditzaketela, hau da, erantzun biologiko desberdina eman dezakete ingurune berean interakzionatu arren.<sup>2</sup> Aipatutakoaren harira, eta farmakologian sor ditzakeen arazoengatik, konposatu enantiopuruen eta soberakin enantiomeriko handia erakusten duten konposatuen sintesiak garrantzia handia hartu du azken urteetan.<sup>3</sup>

Kiralitatea ulertzeko adibiderik errazena kiralitate zentroa da. Alabaina, konplexutasun maila handitzen joan ahala, beste kiralitate elementu batzuk adierazten dituzten molekulak agertzen dira. Horien barnean kiralitate ardatza<sup>4</sup> eta plano bidezko kiralitatea<sup>5</sup> dituztenak egongo lirатеke (1. irudia). Kasu honetan, plano bidezko kiralitatea erakusten duten molekuletan zentratuko da.



1. irudia: kiralitate elementu desberdinak.

<sup>1</sup> Sir William Thomson Lord Kelvin. *The Molecular Tactics of a Crystal*. Clarendon Press, 1894. DOI: 10.1080/09500830701697498.

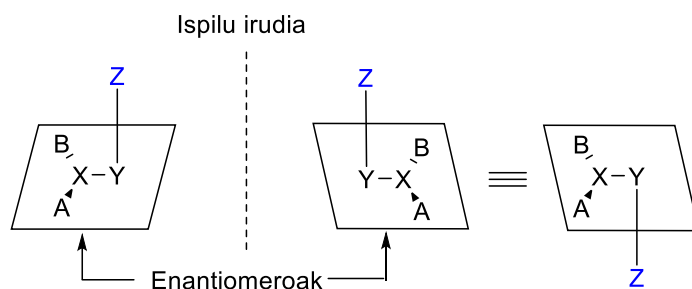
<sup>2</sup> Guijarro, A.; Yus, M. *The Origin of Chirality in the Molecules of Life: A revision from Awareness to the Current Theories and Perspectives of this Unsolved Problem*, RCS Publishing, 2008. DOI: 10.1002/anie.200805910.

<sup>3</sup> Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, M.; Stürmer, R.; Zelinski T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824. DOI: 10.1002/anie.200300599.

<sup>4</sup> Sheng, F. T.; Wang, S. C.; Zhou, J.; Chen, C.; Wang, Y.; Zhu, S. *ACS Catal.* **2023**, *13*, 3841-3846. DOI: 10.1021/acscatal.2c06284.

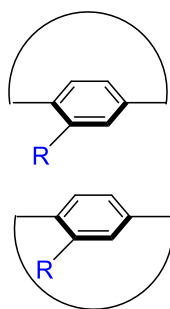
<sup>5</sup> Gleiter, R.; Hopf, H. *Modern Cyclophane Chemistry* (Ed: Gleiter, R.; Hop, H.), Wiley-VCH, Weinheim, 2004. DOI: 10.1002/3527603964.

Cahn izan zen lehena plano bidezko kiralitatea azaltzen 1956. urtean.<sup>6</sup> Berak zioen simetria planoak hausten denean kiralitate planoak agertzen dela, kiralitate planoaren bi aldeak desberdinak direlako. Kiralitate planoaren kontzeptua ulertzeko, baliokideak ez diren bost puntuko irudia osatzen da. Lau puntu planoan kokatzen dira eta bosgarren puntuan planoaren goi edo behealdetik irteten da, hirugarren dimentsio bat emanez. 2. irudian ikusi daitekeen bezala, Z puntua izango litzateke planotik irteten den puntua. Horrela, bi irudiak enantiomeroak dira.<sup>7</sup>



2. irudia: plano bidezko kiralitatea.

Plano bidezko kiralitatea erakusten duten konposatu familia bat ziklofanoak dira.<sup>8</sup> Azken urteotan, molekula hauek interes handikoak bihurtu dira ikuspegi sintetiko, biologiko eta kiroptikoan. Ziklofanoak ordezkaturik egon daitezke. Aurrerago aipatuko den arren, ziklofanoek ez daukate konformazio askatasunik. Horregatik ordezkaturik ez daudenean ez da ezer gertatzen, baina ordezkaturik dauden kasuetan, errotazio hori ezin emateak molekula kiralak sortzeko aukera ematen du, plano bidezko kiralitatea erakutsiz (3. irudia).



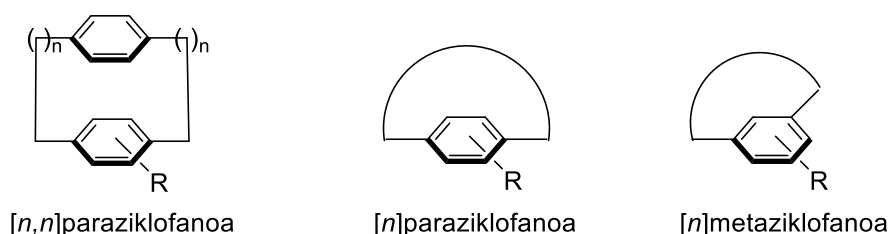
3. irudia: ziklofano kiralak.

<sup>6</sup> Cahn, R. S.; Ingold, K. C.; Prelog, V. *Experientia*, **1956**, *12*, 81-94.

<sup>7</sup> Karnik, A. V.; Hasan, M. *Stereochemistry, A Three-Dimensional Insight*, Elsevier, 2021, 49-91. DOI: 10.1002/chir.23506.

<sup>8</sup> Ashton, P.; Boyd, S. E.; Menzer, S.; Pasini, D.; Raymo, F.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; White, A.; Williams, D. J.; Wyatt, P. G. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 299-310. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3765(19980210)4:2<299::AID-CHEM299>3.0.CO;2-Z

Ziklofano izena jatorriz, aurrez aurre dauden bi para-fenileno eraztun kate alifatiko baten bidez lotuta dauden molekulei egiten dio erreferentzia ( $[n,n]$ paraziklofanoak). Geroago ordea, eraztun aromatiko bakarreko ( $[n]$ ziklofanoak) eta bi aldeak lortzen dituen katea, ansa katea deitua, daukaten konposatuak ere sartu ziren (4. irudia).<sup>9</sup>



**4. irudia:** ziklofano motak.

Ziklofanoa eraztun aromatiko lotuta duen molekula bat da, tamainaz alda daitekeen barrunbe molekular bat duena.<sup>10</sup> Zubi hau kate alifatiko batez edo beste konposatu aromatiko bati lotuta dagoen kate alifatiko batez osa daiteke. Lehenak, ansa konposatuak sortzen ditu eta mono-kateatuak edo multikateatuak izan daitezke.<sup>9</sup> Ansa konposatu mono-kateatuak  $[n]$ ortoziklofano,  $[n]$ metaziklofano eta  $[n]$ paraziklofano bezala izendatzen dira.<sup>11</sup> Aurizkiak katea eraztun aromatikoaren zer posiziotan lotzen den adierazten du.  $[n]$ -k berriz, katea zenbat metileno osatuta dagoen.

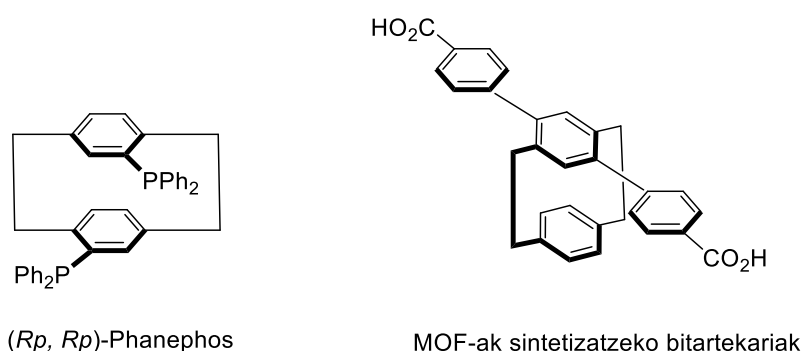
Ziklofano “txikiak”, kate laburrak dituztenak, tentsio eta aromatizitatea bezelako oinarrizko aspektuen ikerkuntzarako eredu izan dira. Sistema osoan zehar zabaldua dagoen tentsioa dela eta, distortsioa eragiten du plano aromatikoan eta ezohiko errektibotasuna erakusten du. Gainera, eragotzita dagoen eraztun aromatikoaren errotazioak plano bidezko kiralitatea sortu dezake. Unitate estereogeniko honen egonkortasun konfigurazionala auresatea ez da lan erraza, hainbat faktoreetan oinarritzen baita, hala nola, katearen luzera eta konstituzioa, eta eraztun aromatikoko ordezkatzailen tamaina. Metalozeno kiralak eta metal arenoak ez bezala, nahikoa da ordezkatzaille bat izatea plano bidezko kiralitatea edukitzeko. Ziklofano kiral baten ohiko egitura para- eta metaziklofanoen familiei dagokie. Nahiz eta, zenbait olefina ziklikoetan, ortoziklofanoetatik eratorriak, plano bidezko kiralitateaz jakinarazi den.<sup>9</sup> Kiralak izango dira bi enantiomeroak elkarren ispilu irudiak direnean eta ezin direnean elkar bihurtu.

<sup>9</sup> Lopez, R.; Palomo, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202113504. DOI: 10.1002/anie.202113504.

<sup>10</sup> Marrocchi, A.; Tomasi, I.; Vaccaro, L. *Isr. J. Chem.* **2012**, *52*, 41-52. DOI: 10.1002/ijch.201100091.

<sup>11</sup> Vögtle, F.; *Tetrahedron. Lett.* **1969**, *10*, 3193-3196. DOI:10.1016/S0040-4039(01)88385-4.

Nahiz eta guztiek beraien garrantzia duten, ziklofanoen adibide esanguratsuenetakoa [2,2]paraziklofanoak dira. 70 urte baino gehiago igaro dira 1949. urtean Brown eta Farthing-ek aurkitu zituztenetik. Halere, orain hasi dira ikerlarien interesa pizten.<sup>12</sup> [2,2]paraziklofanoen egitura orokorra aurrez aurre kokatutako bi bentzenok eta hauek para posizioan lotzen dituzten bi etileno katek osatzen dute (5. irudia). Bentzenoen arteko distantzia txikiagoa da grafito planoen artekoa baino. Fenilo eraztunen gertutasuna dela eta, beraien  $\pi$  hodeiak elkar zulutzen dira. Horregatik,  $\pi$  elektroi sistema bakarra edukiko balute bezala jokatzeko dute. Honi, konjugazio espaziala deritzo.



#### 5. irudia: [2,2]paraziklofanoen adibideak

X izpien bidezko ikerketek frogatu dute aldaratzeak geometria molekularra apur bat distortsionatzea eragiten duela, fenilo eraztunen okertzea eraginez. Errazte aldera, molekula laua bezala marrazten diren arren, eraztun tentsioek paraziklofanoaren nukleoan dauden eraztun aromatikoak desitxuratu egiten ditu. Horrek distortsio bat eragiten du. Ondorioz, bi eraztun aromatikoak planotik atera behar dira zubi-buruko karbonoarekin. Honek distortsio-anomaliatarako oinarria ematen du, plano aromatikoetatik eta propietateen eta erreaktibotasun-portaera ezohikoen arteko korrelazioa adieraziz.<sup>13</sup>

[*n,n*]Paraziklofano handiagoetan (adibidez, [3,3]paraziklofanoetan), karbonoz osaturiko zubia handiagoa denez, bi bentzenoen arteko distantzia handiagoa da. Hori dela eta, konposatu hauek ez daude hain tentsionaturik eta egitura irekiko konposatuekin konparagarriak izan daitezke.<sup>14</sup>

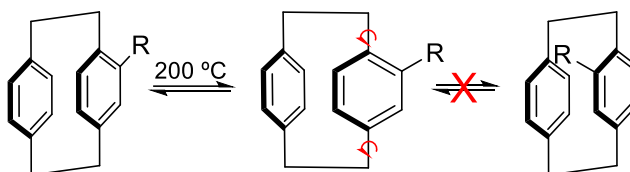
<sup>12</sup> Hopf, H. *Isr. J. Chem.* **2012**, *52*, 18-19. DOI: 10.1002/ijch.201100083.

<sup>13</sup> Hassan, Z.; Spuling, E.; Knoll, D. M.; Bräse, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 2156-2170. DOI: 10.1002/anie.201904863.

<sup>14</sup> Cram, D. J.; Cram, J. M. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 204-213. DOI: 10.1021/ar50042a003.

Sistema aromatiko arruntekin alderatuz, [2,2]paraziklofanoen deribatuek ezohiko portaera kimikoa erakusten dute sarritan. Honen arrazoa, beraien egitura molekularra eta konjugazio espaziala dira.<sup>15</sup> Gainera, arilo sistema arruntak baino azkarrago ematen dute ordezkapen nukleozailea, horrela errektibotasuna handituz.<sup>16</sup>

Paraziklofanoen nukleoek ordezkatzailerik desberdinak kokatzea ahalbidetzen du; posizio bat edo gehiagotan, modu erregioselektiboan. Ordezkapenak zuzenean bentzenoan edo etilenoazko zubian eman daitezke, sarritan molekula kiralak lortuz. Paraziklofano ordezkatuak izendatzeko, pseudo-geminal, pseudo-meta, pseudo-orto eta pseudo-para terminoak erabiltzen dira. Hauek bi bentzeno eta ordezkatzailerik nola kokatuta dauden adierazten baitute.<sup>13</sup> Lan honetan, pseudo-geminal eta pseudo-para ziklofanoetan sakonduko da. [2,2]paraziklofanoen egitura berezia dela eta, etilenoazko zubiek bi eraztunen arteko errotazioa eragozten baitute (1. eskema). Horregatik, ordezkapenaren ondoren molekula kirala lortzen bada, plano bidezko kiralitatea edukiko du kiralitate elementu gisa.<sup>17</sup>



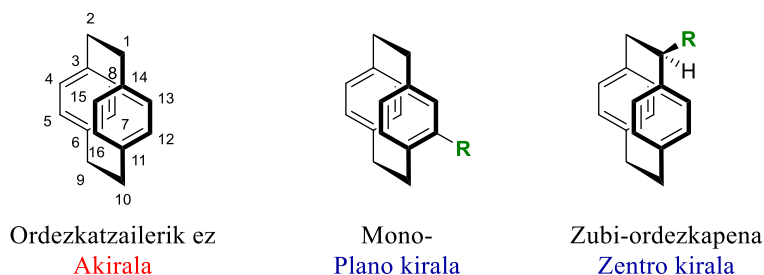
I. eskema: [2,2]paraziklofanoaren errotazio eragotzia.

PCPtan sakonduz joateko, batez ere ordezkatuetan, hainbat adibide aipatu eta azalduko dira. PCPen egiturak ordezkatzailerik ezberdinak modu erregioselektibo batean kokatzeko aukera ahalbidetzen du, alde batean zein bietan, aplikatzen diren parametroen arabera. Talde funtzionalak etilenoazko zubian edo zuzenean bentzenoan gehitu daitezke, sarritan konposatu kiralei bide emanez. PCPtan ematen diren ordezkapenek inpaktu handia sorrarazten dute naturan eta propietateetan. PCP monoordezkatu guztiak kiralak izango dira, bai ordezkapena eraztun aromatikoan eta baita zubian ematen denean ere (6. irudia).

<sup>15</sup> Hopf, H.; Psiorz, M. *Chem. Ber.* **1986**, *119*, 1836-1844. DOI: 10.1002/cber.19861190606.

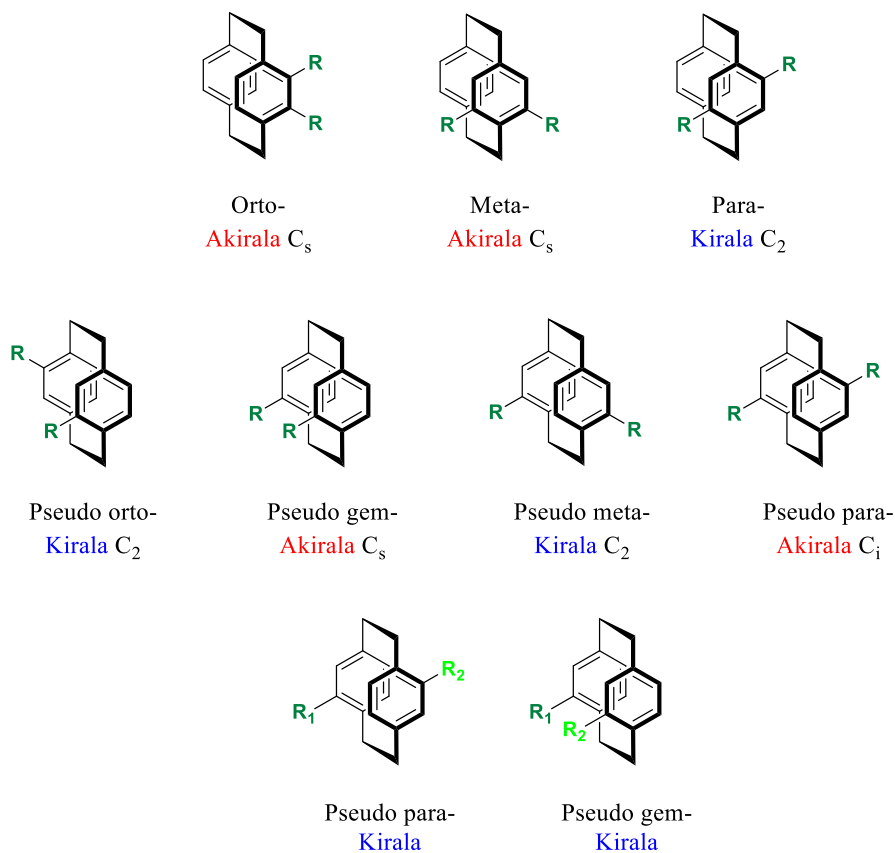
<sup>16</sup> Dyson, P. J.; Humphrey, D. G.; McGrady, J. E.; Mingos, D. M. P.; Wilson, D. J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, *24*, 4039-4043. DOI: 10.1039/DT9950004039.

<sup>17</sup> Cram, D. J.; Wechter, W. J.; Kierstead, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3126-3132. DOI: 10.1021/ja01545a052



**6. irudia:** PCP monoordezkatuak

Diordezkatuak kasurako, akiralak zein kiralak izan daitezke. Posizioaren eta bentzeno eraztun berdinean dauden edo ez eragina izango du. Hona hemen adibide posibleak (7. irudia):

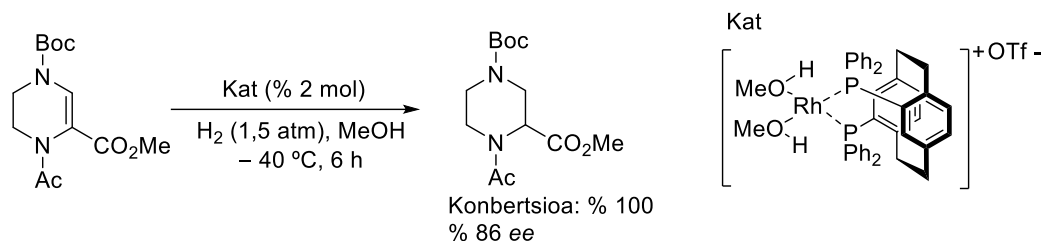


**7. irudia:** [2,2]PCP diordezkatuak

Nahiz eta badauden plano bidezko kiralitatea erakusten duten monoordezkatutako [2,2]paraziklofanoen sintesiak, diordezkatuak ohikoagoak dira. PCPen ligando eta katalizatzaile tipikoak diordezkatuak dira, eraztun baten zein bitan ordezkatzailak eduki ditzaketenak. Nahiz eta sintesian interes handikoak izan eta bere ezaugarri elektronikoek eremu optoelektrikoko erabilerak ahalbidetu, enantiopuruak diren PCPak normalean erresoluzio kromatografiko edo zinetiko bidez lortzen dira.

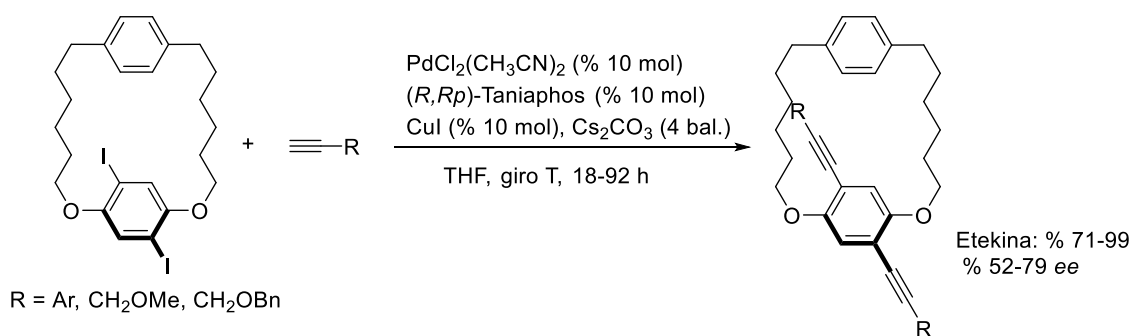


Gehien ezagutzen den [2,2]paraziklofanotik abiatutako ligando kirala bis(difenilfosfino)[2,2]paraziklofanoa edo PhanePhos deiturikoa da, lehendabizi lortu zen [2,2]paraziklofanotik eratorritako fosfinadun ligando kirala izanik (2. eskema).<sup>18</sup> Lehen adibidea da deskribatzen duena PCP kiral baten erabilera ligando bezela, hidrogenazio asimetrikoa lortzeko. Bere erabilera trantsizio metalen bidezko erredukzioan datza, Rh katalizatzailearen bidezko tetrahidropirazinaren hidrogenazio enantioselektiboan, produktu erreduzitua lortuz, % 86 *ee* izanik.



2. *eskema*: PhanePhos bidezko erredukzio enantioselektiboa.

PCP baten erresoluzio zinetiko dinamiko bidezko lehen sintesi enantioselektiboa, Shibata eta bere lankideek gauzatutakoa izan zen. Sonogashira akoplamenduan datza. Hauek lehenak izan ziren deskribatzen Sonogashira akoplamendu bikoitzaren bidezko ziklofano kiralen sintesi katalitikoa, katalizatzaile gisa Pd erabiliz (3. eskema).<sup>19</sup> Diiodoparaziklofano substratua ordezkataile ezberdinak zituen [7,7]ziklofanoan bihurtu zen, katalizatzaile kiral baten presentzian. Katalizatzaile kiral honen sintesirako PdCl<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub> eta (*R,Rp*)-Taniaphos erabili ziren, plano bidezko kiralitatea duen ferrozenil ligandoa izanik. Aipatu beharra dago, ez dela posible [2,2]paraziklofanoari erresoluzio zinetiko dinamikoa aplikatzea, giro tenperaturan ez daukatelako eraztunen errotazio askerik.

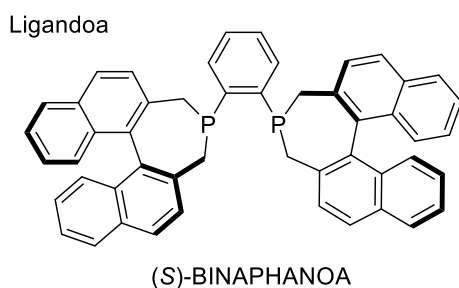
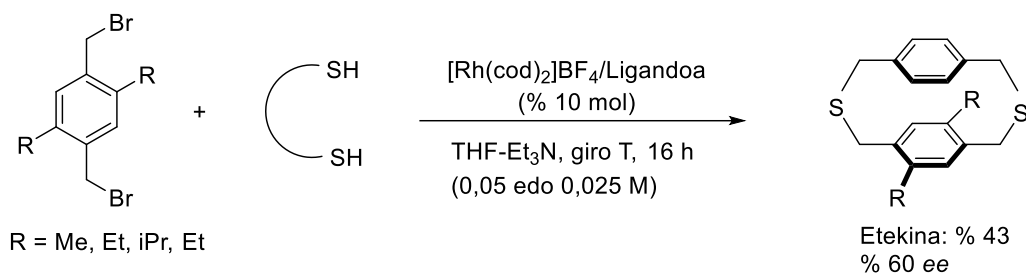


3. *eskema*: Sonogashira akoplamendu bikoitzaren bidezko ziklofano kiralen sintesi katalitikoa.

<sup>18</sup> Pye, P.; Rossen, K.; Reamer, R. A.; Tsou, N.; Volante, R. P.; Reider, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6207-6208. DOI:10.1021/ja970654g.

<sup>19</sup> Kanda, K.; Koike, T.; Endo, K.; Shibata, T. *Chem. Commun.* **2009**, 1870-1872. DOI: 10.1039/B818904H.

Ziklofano kiral baten lehendabizikoa sintesi asimetrikoa, ansa katearen osaketa katalitiko enantioselektibo bidez, Tanka eta bere lankideek deskribatu zuten 2007an (4. eskema).<sup>20</sup> Ditiol eta diordezkatutako 1,4-bis(dibromometil)bentzenoaren arteko erreazio bidez, ditiaparaziklofanoak prestatu ziren, rodio (I) kationikoa/ (S)-BINAPHANOA konplexuaren laguntzaz. Halaber, etekina eta enantioselektibotasun baxuak lortu ziren.



4. eskema: rodio konplexu bidez katalizatutako ditiaparaziklofanoaren sintesia.

Sintesi enantioselektiboan murgilduz, 70 urte igaro dira jada paraziklofanoen kiralitatearen inguruko ezaugarriez ohartu zirenetik. Alabaina, ordekatzaileak dituzten konposatuen forma enantiopuru urri isolatzea lortu da.

Optikoki aktiboak diren konposatuak lortu ahal izateko metodo desberdinak erabili dira. Hainbat aukera daude: jada kirala eta enantiopuru den konposatu batetik abiatzea edo optikoki aktiboa ez den konposatu bat kirala bihurtzea.<sup>21</sup> Substratu kiral batetik abiatuz, kiralitate elementua jada badago konposatuan. Metodo honen bidez, naturan dauden konposatu enantiopuruez baliatzen da, kontzeptuari “chiral pool” deituz. Substratu akiral batetik abiatuz berriz, kiralitate elementu baten gehikuntza egin beharko da, eraldaketa emanez. Multzo honetan sartuko litzateke erresoluzio

<sup>20</sup> Tanaka, K.; Hori, T.; Osaka, T.; Noguchi, K.; Hirano, M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4881-4884. DOI: 10.1021/ol702242x.

<sup>21</sup> Halpern, J., Trost, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 5347-5355.

zinetiko bidezko errazematoen hurbilketa, hau da, enantiomeroen nahaste ekimolar bat lortzea.<sup>22</sup> Aipatu diren bi estrategia hauek hainbat muga eduki ditzakete. Lehenengoan, naturan enantiopuru den eta transformazio eraginkorra ahalbidetuko duen konposatu bat aurkitzeko zailtasuna. Bigarren kasuan berriz, intereseko enantiomeroaren errendimendu maximoa % 50-ekoa izatea. Hori dela eta, azken hamarkadetan metodo sintetiko berriak proposatu dira konposatu enantiopuruak prestatu ahal izateko.<sup>23</sup> Orain arte, nagusiki, erresoluzio zinetikoa eta iturri kiral enantiopuru naturalak (chiral pool) erabili izan dira baina sintesi asimetrikoaren bidez ordezkatuak izaten ari dira.<sup>24</sup> Sintesi asimetrikoaren abantaila nagusia da molekula enantiopuru bakar bat (katalizatzailea) gai dela idealki molekula prokiral kantitate handi bat molekula kiral eta enantiopuru bihurtzeko.

Sintesi asimetrikoa, sintesi enantioselektiboa ere deitua, konposatu akiral bat kiral bihurtzean datza, enantiomero edo diastereomero bat faboratzen duen erreakzio mota izanik. Sintesi asimetrikoaren barruan, katalisi asimetrikoa dago.<sup>25</sup> Katalisi asimetrikoa sintesi asimetrikoaren hurbilpen eraginkorrena da. Erreakzio kimikoen azelerazioan datza, molekulan karbono-karbono zein karbono-heteroatomo lotura enantioselektiboak osatuz. Horretarako katalizatzaile kiral baten kantitate subestekiometrikoak erabiltzen dira. Atomoen ekonomia eta ingurumen- inpaktua kontuan hartuz, metodo hau estereoisomerikoki puruak diren molekulak lortzeko modurik eraginkorrena da. Bere garrantzia, batez ere, 2001 urtean aitortu zen. Urte horretan, Kimikako Nobel Saria irabazi baitzuten Sharpless, Knowles eta Noyorik, metal/ligando kiral konplexuekin egiten zuten ikerkuntzagatik.<sup>26</sup> Hortik 20 urtera, Kimikako Nobel Saria berriz ere katalisi asimetrikorako izan zen, Benjamin List eta David MacMillan-ek organokatalisia asimetrikotan egin zuten lanagatik.<sup>27</sup>

Katalisi asimetrikotan zentratuz, bere barnean hainbat mota bereiz ditzakegu, erabiltzen den katalizatzailearen arabera: katalisi organometalikoa, organokatalisia eta biokatalisia. Katalisi

---

<sup>22</sup> Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, L. N. *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley & Sons: New York, 1994.

<sup>23</sup> Jacobsen, E. N.; Pfaltz, A.; Yamamoto, H. *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Springer: Berlin, 1999. DOI: 10.1021/ja033659o.

<sup>24</sup> Erresoluzio zinetiko dinamikoak era alternatiba eraginkorra dira. a) Gihani, M. T.; Williams, J. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 11-15. DOI: 10.1016/S1367-5931(99)80003-9. b) Turner, N. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 115-121. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.11.027.

<sup>25</sup> Christmann, M., Bräse, S. *Asymmetric Synthesis: The Essentials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**. DOI: 10.1002/9780470584248.ch1.

<sup>26</sup> Lohray, B. B., *Current Science*, **2001**, *81*, 1519-1525.

<sup>27</sup> Dilanas, Melina, E. A., *Chemistry-A European Journal*, Wiley, **2022**, *28*, 44. DOI: 10.1002/chem.202201236.

organometalikoan katalizatzaile bezala metal-karbono loturak dituzten konposatuak erabiltzen dira. Organokatalisian, konposatu organikoak dira katalizatzaile gisa erabiltzen direnak. Biokatalisian berriz, jatorri biologikoa daukaten molekulak dira katalizatzaile bezala jokatzeko dutenak. Nagusiki, katalizatzaile metalikoen bidez egin izan ohi da. Alabaina, orain, katalizatzaile organikoen erabilpena hazten ari da, erreazioak azeleratu eta aldi berean, estereoisomero baten formakuntza bultzatzen baitute.<sup>28</sup> Bai katalisi organometalikoaren eta bai organokatalisiaren abantaila nagusiak dira talde funtzionalak dituzten konposatuak katalizatzekeo daukaten efizientzia altua, bai erregioselektibitatea eta enantioselektibitatea. Baita ere, lehenago existitzen ez zuten estrategien bidezko loturen sintesia ahalbidetu dute.<sup>29</sup> Katalisi organometalikoaren desabantaila nagusia metalen erabilera da, garestiak baitira eta sarritan kutsakorak. Biokatalisiak katalisi organometalikoak eta organokatalisiak erakusten dituzten abantailez gain, kimika berdeago bat egiteko aukera ahalbidetzen du. Nahiz eta hiru katalisi asimetriko mota hauek kiralitate zentroa, ardatza edo plano induzitzeko erabil daitezkeen, aipatu beharrekoa da, aurrerapen guzti hauek kiralitate zentroa erakusten duten molekuletan zentratu direla, hala ere, orain, kiralitate ardatza daukaten konposatuetan ere zenbait ikerketa gauzatu diren. Plano bidezko kiralitatea azaltzen duten molekuletan berriz, ez da ia katalisi asimetriko egin. Honen arrazoiak plano bidezko kiralitatea noiz sortu daitezkeen aurreikusteko zailtasuna eta substratu gisa erabiltzen diren konposatuen zurruntasuna dira.<sup>9</sup>

Konposatu enantiopuruak sintetizatzekeo optikoki aktiboak ez diren molekulen bidez ere gauzatu daitezke katalisi asimetrikoak. Nahiz eta molekulak akiralak izan, garrantzitsua da talde edo aurpegi enantiotopikoak edukitzea. Beste aukera bat, molekula zentrosimetiko edo meso-formen desimetrizazioan oinarritzea da, ez daukatelako isladapen-simetriarik, lan honetan egingo dena.

Nahiz eta garrantzia irabazten joan den, oraindik ere oso metodo gutxi daude [2,2]paraziklofanoak desimetritzatekeo gai izan direnak. Zehazki, proiektuarekin hasi arte, [2,2]paraziklofanoak desimetritzatekeo metodo katalitiko eraginkor bakarra zegoen: pseudo-paradiformil[2,2]paraziklofanoaren transferentzia asimetriko hidrogenazioa (ATH).<sup>30</sup> Erreakzio baldintza egokiak erabiliz, posible da 4-formil-16-hidroximetil[2,2]paraziklofanoa isolatzea, etekin egokia (% 61) eta % *ee* bikaina lortuz (% 99 *ee*). Hala ere, produktu honekin batera 4,16-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoa lortuko da azpi-produktu bezala eta erreazioan gabeko

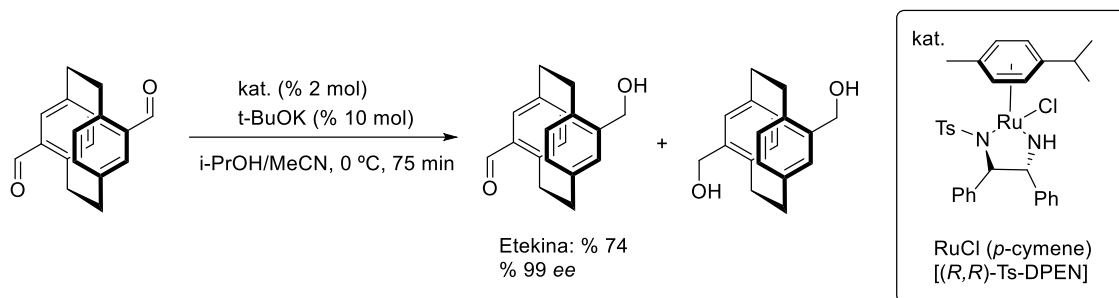
---

<sup>28</sup> Berkessel, A.; Groger, H. *Asymmetric Organocatalysis. From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley- VHC, New York, 2005. DOI:10.1055/s-2006-932678.

<sup>29</sup> Frady G.; Adly, F. G.; Ghanem, A. *Catalysts* **2019**, *9*, 775. DOI:10.3390/catal9090775.

<sup>30</sup> Delcourt, M. L.; Felder, S.; Benedetti, E.; Micouin, L. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 6612-6616. DOI: 10.1021/acscatal.8b01872.

substratua ere egongo da. Gainera, gai izan ziren 1 g-ko eskalan baldintzak mantenduz emaitza onak lortzeko: % 74-ko etekina eta % 99 ee (5. eskema).



5. eskema: ATH erreakzioa

Biokatalisari erreferentzia eginez, kimikaren alorrean gutxien aztertutako katalisi asimetrico mota izan da, lan honetan aztertuko dena.

Biokatalizatzaileen bidezko katalisia nagusiki entzimekin egiten da. Entzimak molekula organikoak dira eta beraien funtzioa erreakzio kimikoen abiadura handitzea da, hau da, katalizatzaileak dira.<sup>31</sup> Orokorrean proteina globularrak dira eta beraien aktibitatea egitura tertziarioaren menpe dago. Aldi berean, egitura tertziarioa proteinaren aminoazido sekuentziaren arabera izango da.<sup>32</sup> Entzimak izaki bizidunetan zein naturan dauden katalizatzaile eraginkorrenak dira.<sup>33</sup> Beraien funtzioaren arabera, hainbat motatakoak izan daitezke: oxidoerreduktasak, transferasa, hidrolasak, liasak, etabar.

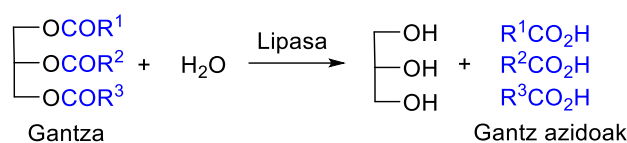
Prozedura katalitikoetan gehien erabili diren entzimak hidrolasak izan dira. Izenak dioen bezala, entzima hauek loturak apurtzeaz arduratzen dira. Normalean, amida lorturak (proteasak), esterrak (esterasak eta lipasa) eta lotura glikosidikoak hidrolizatzen dihardute. Entzimak erabiltzearen alde on bat naturarekiko daukaten inpaktu baxua da; hau da, beste katalizatzaileekin alderatuz, jasangarriagoak dira. Horrez gain, alderdi biokimikoari erreparatuz, hidrolasek ez daukate kofaktoreen beharrik. Honen arrazoia, aldaketak gauzatzeko erreaktibo gisa inguruneko ura erabil dezaketela da.

<sup>31</sup> Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry*, 5. edizioa, W. H. Freeman Publishing, New York, 2002.

<sup>32</sup> Anfinsen, C. B. *Science*, **1973**, *181*, 223-230. DOI: 10.1126/science.181.4096.223.

<sup>33</sup> Drauz, K.; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 2.edizioa, Wiley-VCH, Weinheim, 2002. DOI: 10.1002/9783527618262.

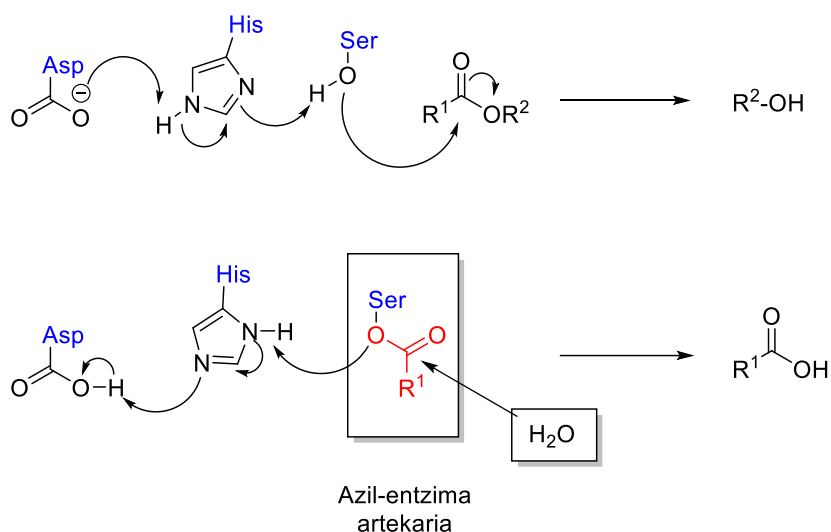
Lehenago aipatu den bezala, lipasak ester loturak apurtzeaz arduratzen diren entzimak dira. Beste era batera esanda, gantzak edo triglizeridoak hidrolizatzea da beraien lana (6. eskema). Esan daiteke entzima talderik ikertuena dela, biotransformazio ugari gauzatzeko erabili baitira.<sup>34</sup>



6. eskema: Lipasa bidezko hidrolisia.

Jakina da zein den lipasen ardura, baina hobeto ulertzeko mekanismoa erreparatu behar da. Maila molekularrean, entzimak amidak eta esterrak hidrolizatzearen mekanismoa antzekoa da ingurune basikoan ematen den hidrolisi kimikoarena. Bi etapetan ematen da (7. eskema):

- Lehenengoa, entzimaren talde nukleozaleak (normalean serina unitatearen hidroxilo taldea) esterra erasotzen du azil-entzima artekaria osatuz. Horrela, esterraren alkohola askatzen da.
- Jarraian, ur molekula batek azil-entzima artekaria erasotzen du, azidoa askatuz eta entzima askea berreskuratuz.

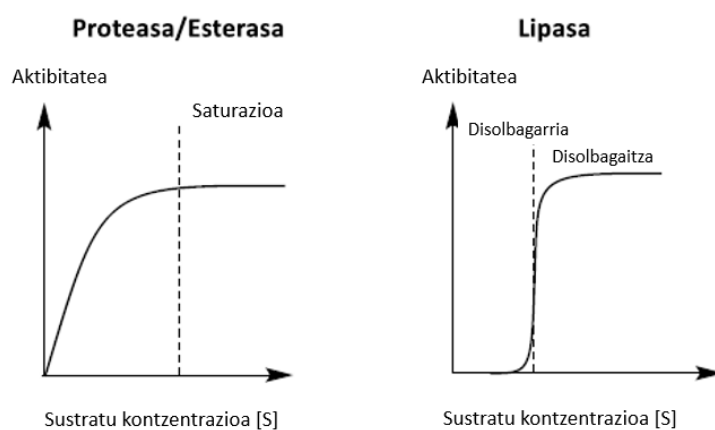


7. eskema: Lipasen zentro aktiboko triada katalitikoa: Asp-His-Ser.

Mekanismoaren berri edukita, uler daiteke zergatik diren hain bereziak. Lipasak hain ikertuak dira beraien ezaugarriak direla eta, hala nola, lortzeko eta erabiltzeko errazak, substratuarekiko tolerantzia handia eta garrantzitsuena, kimio, erregio eta estereoselektibitate handia. Nahiz eta beste entzima batzuek bezala, hidrolizatu eta ester loturak osatzeko gai diren, gainontzekoekin alderatuz, mekanismo ezberdinez baliatzen dira. Beste hidrolasekin gertatzen ez den bezala,

<sup>34</sup> Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 1.edizioa, Springer, Berlin, 2004. DOI: 10.1007/978-3-642-98071-8.

lipasek ez dute Michaelis-Menten zinetika jarraitzen. Horregatik, beste entzimek ez dituzten berezitasunak dituzte, adibidez, disolbatzaile organikoetan erabiltzeko aukera. Michaelis-Menten zinetika jarraitzen ez dutenez, substratuaren kontzentrazioa baxua denean (kontzentrazio kritikoaren azpitik) ez dute ia aktibitate erakusten. Alabaina, substratuaren kontzentrazioak disolbagarritasun-muga gainditzen duenean, aktibitatea izugarri hazten da (8. irudia). Lipasek kontzentrazio kritikoaren gainetik aktibitate handia erakustea baina azpitik hidrolisia ez emateko daukaten jokaerari aktibazio interfaziala deitzen zaio.<sup>35</sup>



8. irudia: hidrolasen mekanismoak

Gertaera hau azaltzeko asmotan ikertu da proteinaren egitura tertziarioan berrantolaketa bat ematen dela. Lipasa ez dagoenean ura-lipido interfasean, egoera ez-aktibo batean egongo da. Kasu honetan, kate peptidikoaren zati bat  $\alpha$ -helize moduan egongo da, gune aktiboa tapatuz. Bestalde, lipasa ura-lipido interfasean dagoenean, egoera aktibo batean egongo da. Oraingo honetan berriz,  $\alpha$ -helizea atzeraka dagoen konformazioa izango da egonkorrena, gune aktiboa oztopatu gabe. Hau dela eta, oso garrantzitsua da lipasen erreakzioak ingurune bifasiko batean ematea.<sup>36</sup>

Entzima hauen berezitasun bat da disolbatzaile organikotan eman ditzaketela erreakzioak.<sup>37</sup> Hori dela eta, ura beste nukleozale batzuegatik ordezkatu daitekeenez, lipasek abantaila ugari dituzte:<sup>38</sup>

<sup>35</sup> Reis, P.; Holmberg, K.; Lesera, M. E., Miller R. *Adv. Colloid. Interf. Sci.* **2009**, *147*, 237-250. DOI: 10.1016/j.cis.2008.09.012.

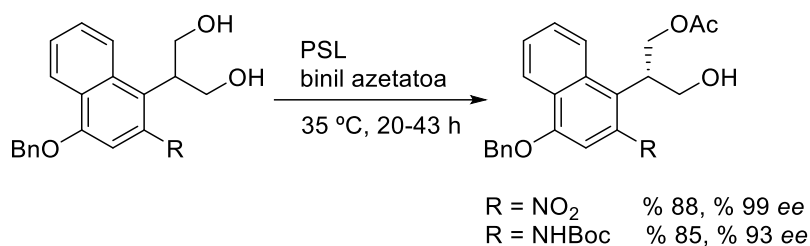
<sup>36</sup> Brocca, S.; Secundo, F.; Ossola, Alberghina, M. L.; Carrea, G.; Lotti, M. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2312-2319. DOI: 10.1110/ps.0304003.

<sup>37</sup> Zaks, A.; Klibanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 3192-3196. DOI: 10.1073/pnas.82.10.3192.

<sup>38</sup> Klibanov, A. M. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114-120. DOI: 10.1021/ar00172a004.

- Katalizatzailea (entzima) iragazketa bidez errekupearatu daiteke, entzima disolbatzaile organikotan ez baita disolbagarria.
- Oreak sintesiaren aldera lerratu daiteke, hidrolisia murriztuz. Horrela, azido eta alkoholetatik esterifikazioa eginez edo ester eta alkoholetatik transesterifikazioz, esterrak lortu daitezke. Erreakzio hauek ur ingurunean egiteko zailak dira, hidrolisia ematen baitute nagusiki.
- Disolbatzaile organikoak erabiltzeak entzimaren hainbat ezaugarri aldatu ditzazke: substratuarekiko espezifikotasuna, erreakzioaren erregioselektibitatea eta estereoselektibitatea.

Frogatu dan lipasak eraginkorrak direla meso eta prokiralak diren alkohol batzuen desimetrizazioan. Irageanean, bi estrategia ezberdin planteatzen ziren: (i) alkohol aske baten azilazioa esterifikazio edo transesterifikazio erreakzio bidez, eta (ii) alkoholaren azil deribatuen hidrolisia. Kontzeptu hauen azalpena eman zutenen artean Boger eta bere lankideek daude. CBI prekursorren (antibiotiko antitumoral) sintesia egin zuten. Komertzialki saltzen den *Pseudomonas sp.* lipasa (PSL) eta binil azetatoa (agente azilatzailea) erabili ziren diol prokiral monoazetilatzeko. Lortutako etekina eta enantioselektibotasuna bikainak izan ziren (8. eskema).<sup>39</sup>



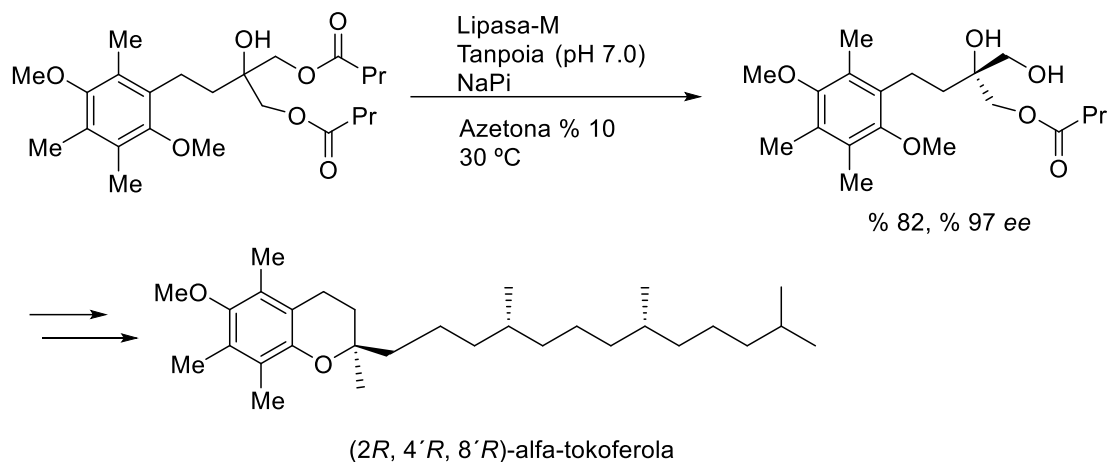
8. eskema: PSL bidezko desimetrizazioa.

Beste adibide adierazgarri bat orain dela gutxi deskribatu dena izan da, Chen taldearen eskutik, 2022. urtean. Diol kiral baten sintesi estereoselektiboa gauzatu zuten, (+)-(2*R*,4'*R*,8'*R*)- $\alpha$ -tokoferolaren bitartekari sintetikoa dena, pauso erabakigarria entzima bidezko desimetrizazioa izanik, diester prokiral baten hidrolisian oinarritua. Lipasa-M, *Mucor javaicana*-tik eratorria dena, izan zen etekin eta enantioselektibotasun handiena ahalbidetu zuen lipasa (9. eskema).<sup>40</sup>

<sup>39</sup> Kastrinsky, D. B.; Boger, D. L. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2284-2289. DOI: 10.1021/jo035465x.

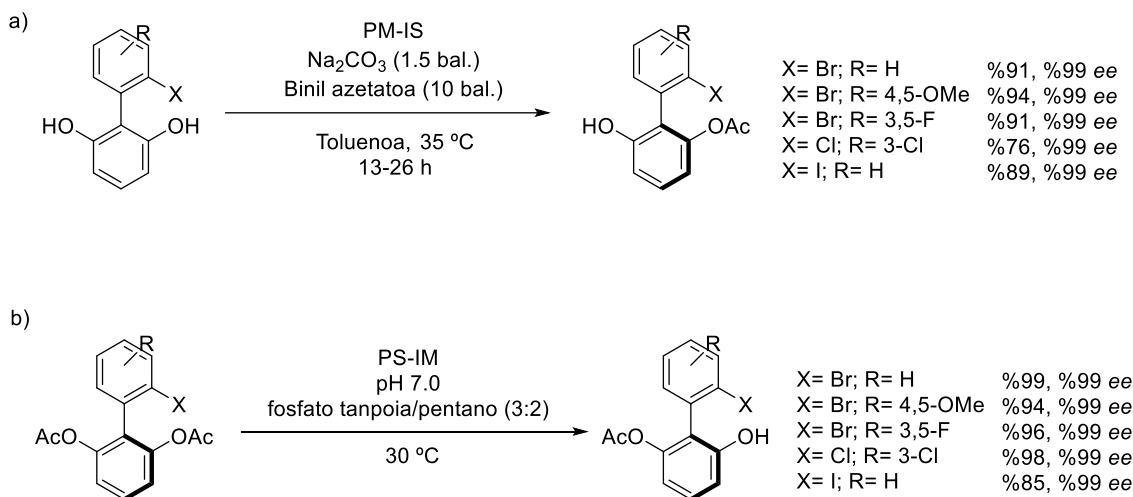
<sup>40</sup> Yang, H.; Liu, J.; Hu, P.; Gao, L.; Huang, Z.; Chen, F. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 2909-2921. DOI: 10.1039/D2OB00384H.





9. eskema: Lipasa-M bidezko desimetritzazioa.

Lipasak kiralitate zentrua sortzeko ez ezik, kiralitate ardatza indutzeko ere erabili izan dira. Eredu honetan lehenetarikoa Akai eta bere lankideak izan ziren. Lehenak izan ziren  $\sigma$ -bifenil diol simetrikoei lipasa bidez katalizatutako desimetritzazio enantioselektiboa aplikatzen. Azilazio entzimatikoa komertzialki lortu daitekeen *Burkholderia cepacia* lipasa (Amano PS-IM) erabiliz egin zen, euskarri diatomazeoan immobilizatuta, (*Sa*)-monoesterrak lortuz. Zegokien diesterren desimetritzazio hidrolitikoak lipasa berdina erabiliz egin zen, (*Ra*)-monoesterrak lortuz (10. eskema).



10. eskema: a) Lipasak katalizatutako  $\sigma$ -bifenil diol simetrikoei esterifikazio eta hidrolisi enantioselektiboa. b)  $\sigma$ -bifenil diazetato simetrikoei desimetritzazio hidrolitikoak.

Lipasen bidez katalizatutako desimetritzazioetan, adibideetan lortu diren konposatuak kiralitate zentro bidezko kiralitatea erakusten dute. Beste adibide batetan, kiralitate ardatzdun konposatuak ere lortu dira. Hala ere, ez dago desimetritzazioan oinarritutako prozedurarik plano bidezko kiralitadedun konposatuak lortu ahal izateko.



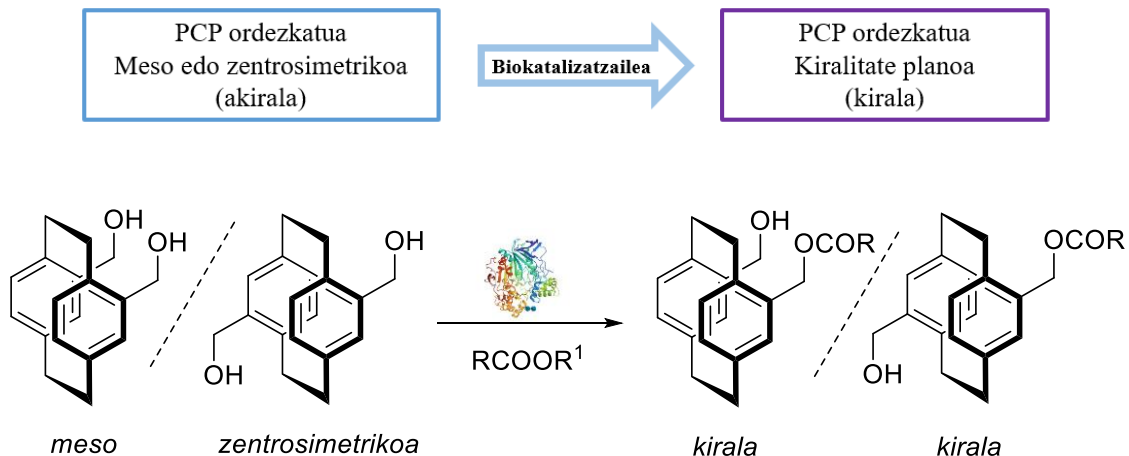
## 2. HELBURUAK

Sarreran aipatu den bezala, kimika organikoaren munduan plano bidezko kiralitatea duten molekulen garrantzia gutxi aztertua izan da. Asimetria hau erakusten duten metodo katalitikoaren urritasuna oztopo garrantzitsua da kimikaren alor desberdinetan plano bidezko kiralitatea erakusten duten molekulen aplikazio posibleetarako.

Gradu Amaierako Lan honen helburu nagusia [2,2]paraziklofanoen desimetrizazio-erreakzioetarako erabiltzen diren lipasen balio katalitikoak frogatzea da eta kiralitate elementu bezala plano bidezko kiralitatea bakarrik erakusten duten molekula enantiomerkoki aberatsen sintesi jasangarri eta erraza aplikatzea.

Helburu nagusia aurrera eramateko, ondorengo zereginak proposatu dira:

- Beharrezko pseudo-gem- eta pseudo-para-[2,2]paraziklofano deribatuen prestaketa transterifikazio bidezko desimetrizazio-erreakzioak egiteko.
- Lipasa bidez katalizatutako transesterifikazio erreakzioen jarraipena: entzimaren, agente azilatzailearen eta disolbatzailearen aukeraketa, eta [2,2]paraziklofano enantiopuruen lorpenerako erreakzio-baldintzen optimizazioa (11. eskema).



11. eskema: helburu orokorra eta jarraitu beharreko estrategia.



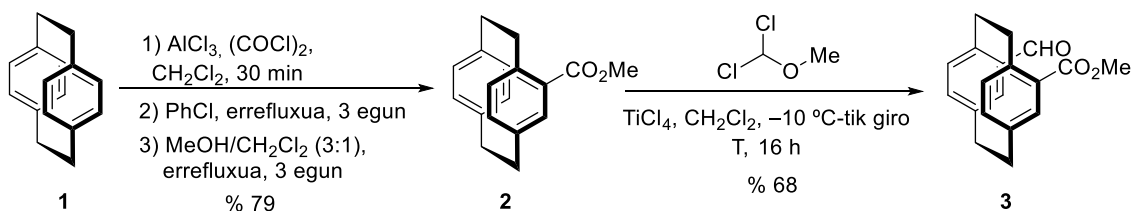
### 3. EMAITZAK ETA DISKUSIOA

Planteatu den bezala, lanaren helburua da [2,2]paraziklofano funtzionalizatu enantiopuruak lortzea, lipasek katalizatutako azilazio-erreakzioen bidez. Hurrengo ataletan, desimetritzazio-erreakzioak gauzatzeko behar diren substratuen prestaketa eta lortutako emaitzak zehazten dira.

#### 3.1. [2,2]Paraziklofanoen sintesia desimetritzazio erreakzioetarako (4 eta 7)

Lipasen bidezko biokatalisia eta bere aldagaiak aztertzeke, bi substratu ezberdinetatik abiatu da, 4-13-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoa eta 4-16-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoa. Bakoitza sintetizatzeko bide ezberdinak erabili dira, aurrerago azalduko direnak.

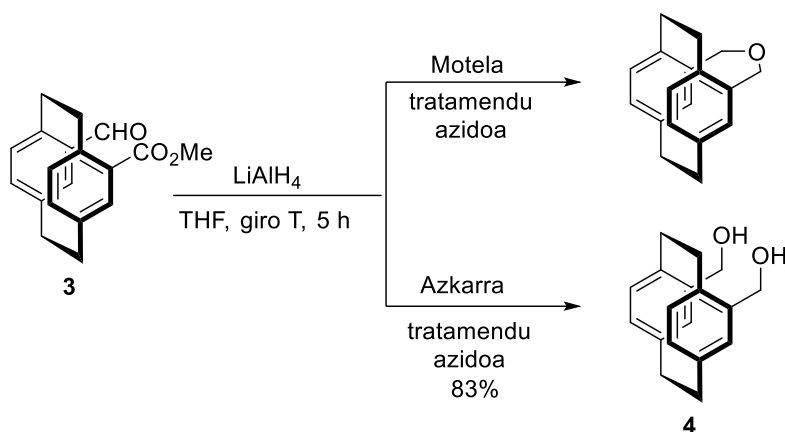
Komertzialki lortzen den [2,2]paraziklofanoa (1) Hopf eta Jones-en bide sintetikoa jarraituz erabili zen. Honek, bi Friedel-Crafts azilazio jarrai egiten dituelarik (12. eskema).<sup>41</sup> Lehengo urratsean, [2,2]paraziklofanoa zeto azido kloruroa bihurtzen da, deskarboxilazio eta esterifikazioak jarraituz, 2 lortuz % 96 etekin globalarekin. Pseudo-geminal ordezkapenari sarrera emanez, 3 lortu da. Rieche formilazioaren bidez, 2 konposatua 1,1-diklorometileterrearekin erreakzionatzen da titanio tetrakloruroaren presentzian.



12. eskema: 4-13-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesiaren lehen hiru urratsak.

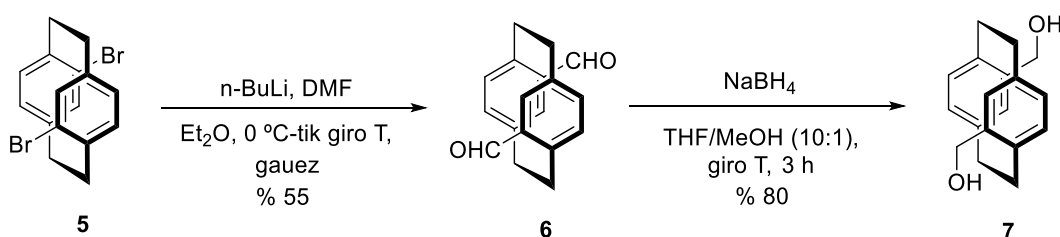
3-ren erredukzioa litio aluminio hidruoaren presentzian ematen da, desimetritzatorako dagokion 4 diola lortuz. Aipatu beharrekoa da kontu handiz ibili behar dela tratamendu azidoa egitean, eterra lortu baitaiteke (13. eskema). Baita ere, aztertu da denbora luzez egon ondoren, CDCl<sub>3</sub>-tan (EMN laginak) ere ematen da eterraren osaketa. Honetaz <sup>13</sup>C-EMN-ko lagina jaso ostean ohartu zen, denbora luzez egon zelako egiteko zain.

<sup>41</sup> Zitt, H.; Dix, I.; Hopf, H.; G. Jones, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2298-2307. DOI: 10.1002/1099-0690(200207)2002:14<2298::AID-EJOC2298>3.0.CO;2-E.



13. eskema: 4-13-dihidroxiometil[2,2]paraziklofanoaren sintesiaren azken urratsa.

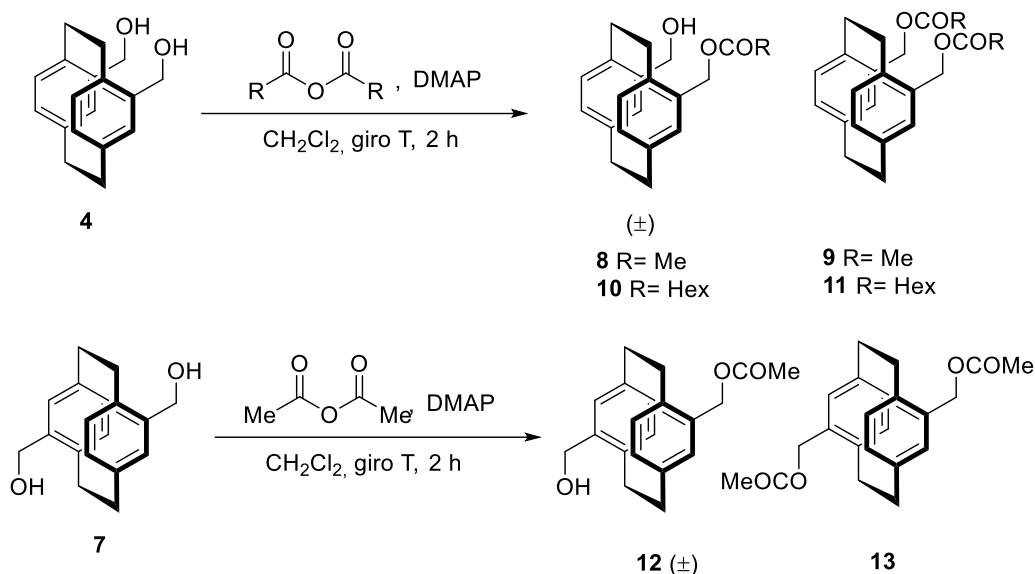
4-16-Dihidroxiometil[2,2]paraziklofanoaren sintesia gauzatzeko (7), 4,16-dibromo[2,2]paraziklofano komertziala (5) erabili da, ortolitazioa eta formilazioa emanez 6 diala lortuz % 55, hurrenez hurren. Amaitzeko,  $\text{NaBH}_4$  erabiliz erreduzitu da 7 diola emanez, errendimendu onarekin (14. eskema).



14. eskema: 7 substratuaren sintesia.

### 3.2. Diol pseudo-gem 4 eta pseudo-para 7-tik eratorritako monoester errazemikoen prestaketa (8, 9, 10, 11, 12 eta 13)

Behin substratuak edukirik, monoester errazemikoen sintesiarekin hasi zen, lipasekin katalizatutako erreakzioen estereoselektibitatea determinatzeko. Lipasaren jatorria eta erreakzio ingurunea ezinbestekoak dira transformazioaren efikazia eta bere selektibitatea determinatu ahal izateko. Agente azilatzaileak ere badu garrantzia, horregatik 4-aren monoazetatoa eta monohexanoatoa eta 7-aren monoazetatoa prestatu dira. Horiek prestatzeko erreakzio baldintza arruntak erabili dira, zegozkien anhidroen eta DMAP-ren presentzian (15. eskema). Gehigarri gisa, eta produktu diazilatua identifikatuta edukitzeko, lipasek katalizatutako erreakzioetan ere sortuko dena, anhidroaren kantitate subestekiometrikoak (0.7) erabili dira eta nahastetik zegozkien monoesterrak eta diesterrak isolatu dira.

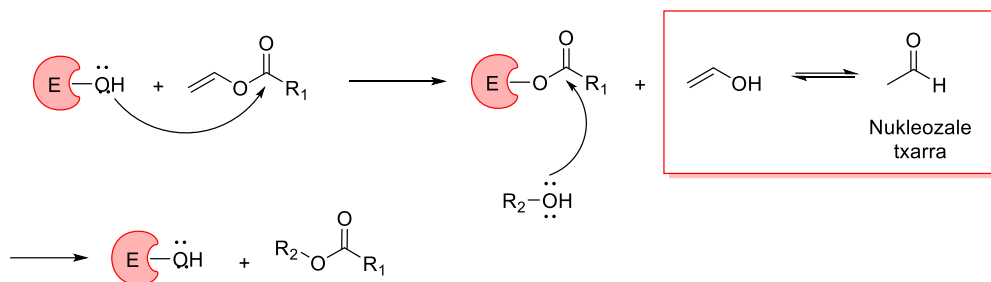


15. eskema: monoester errazemikoak eta diesterrak.

### 3.3. Lipasa bidez katalizatutako 4 eta 7 diolen transesterifikazio erreakzioen jarraipena (8, 9, 10, 11, 12 eta 13)

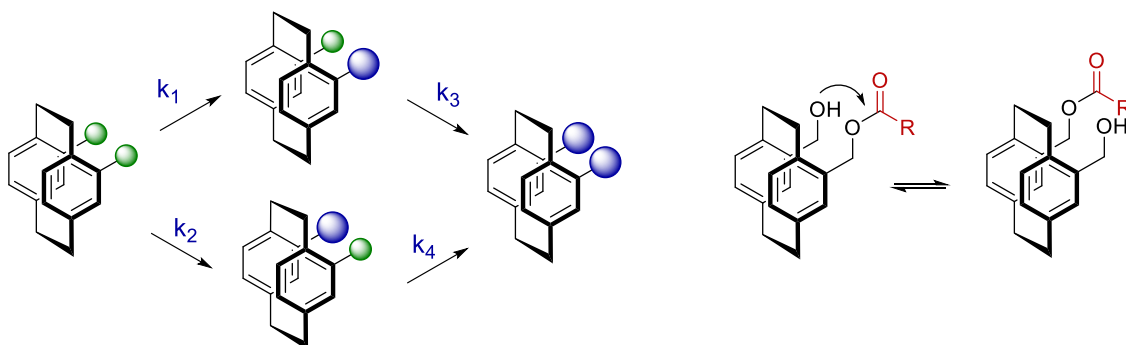
Substratuak sintetizaturik eta azilazio erreakzioen produktuak identifikaturik daudela, lipasa *Candida rugosa* (CRL) erabili deneko erreakzioak aztertuko dira. Lipasa mikrobiano hau komertziala eta merkea da. Isoforma ezberdinetan aurkitu daiteke eta erreakzio organikoetan gehienetarikoa erabiltzen den lipasa da.<sup>42</sup> Agente azilatzaileari dagokionez, mekanismo katalitikoa kontuan hartuz (ikus 7. eskema, triada katalitikoarena), gomendagarria da transesterifikazio erreakzioetan binilodun esterrak erabiltzea. Hauek ingurunera enola askatzen dute, azkar tautomerizatzen dena forma karbonilikora eta ez du prozesuan parte hartuko (16. eskema).

<sup>42</sup> a) Vanleeuw, E.; Winderickx, S.; Thevissen, K.; Lagrain, B.; Dusselier, M.; Cammue, B. P. A.; Sels, F. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 15828-15844. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b03257. b) Barriuso, J.; Vaquero, M. E.; Prieto, A.; Martínez, M. J. *Biotechnology Advances*, 2016, *3*, 874-885. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.004.



16. eskema: entzimaren mekanismoa.

Erreakzioak erakusten duen zinetika bikoitza dela eta, entzimak sustatzen duen jatorrizko estereoselektibitatea hondatu daiteke. Monoazetatoa berriz azetilatu eta **8**-aren soberakin enantiomerikoa murriztu daiteke, konstanteen arteko abiadura erlazioa ez bada egokia. Gainera, monoazetato **8**-aren kasuan, errazemizazio bat eman daiteke *in situ* (17. eskema).



17. eskema: a) zinetika bikoitzaren azalpena. b) transesterifikazio intramolekularraren edukitzearen posibilitatea

Erreakzioak 0,1 mmol-eko eskalan gauzatu ziren, 5 baliokide agente azilatzaile, 5 mL disolbatzaile eta 20 mg/mL entzima erabiliz. Erabili zen entzima *Candida rugosa* lipasa izan zen eta bere aktibitatea 700 u/mg solidokoa da.

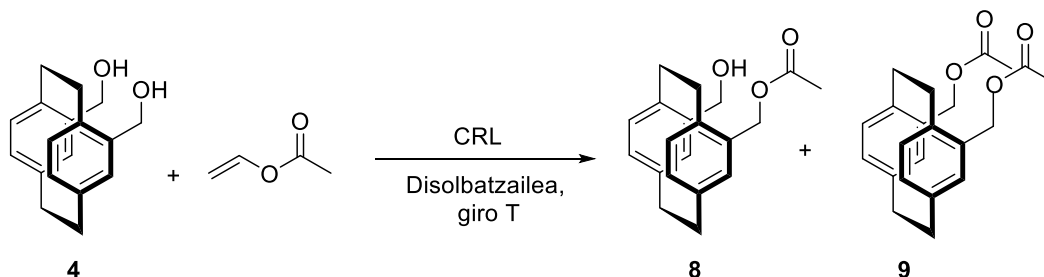
Lehenik eta behin, binil azetatoa erabiliz erreakzioaren erreaktibitatea eta estereoselektibitatea aztertu dira **4** pseudo-gem diolaren erreaktziorako (1. taula). Transformazioak GMK bidez jarraitu dira eta eboluziorik hauteman ez denean edo **9** diazetatoaren formazioa hasi zenean geratu dira.

Aztertu zen lehen erreakzioa hexanotan izan zen eta 16 orduara **9** diesterraren formazioa agertu zen. Horregatik, berriro ipini zen erreakzioa eta 3 orduara geratu zen, lehen etapan entzimak sustatutako soberakin enantiomerikoa determinatu ahal izateko. Gauza bera gertatu zen tBuOMe erabili zenean. Lehen ondorio gisa, disolbatzaile apolarretan azilazio erreakzioa azkarrago sustatzen dutela da, bat datorrela lipasek gantz ingurunean daukaten aktibazio fazialarekin. 2-metiltetrahidrofuranoa, etil azetatoa eta azetonitriloa erabiltzean (3, 4 eta 5. sarrerak, hurrenez



hurren) baieztatzen da disolbatzailearen polartasunaren eta lipasaren suspentsioko aktibitatearen arteko erlazioa.

**1. taula:** lipasek katalizatutako **4** pseudo-gem diolaren azilazioa binil azetatoarekin



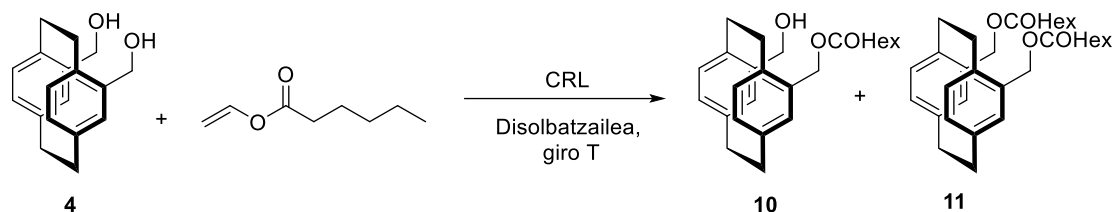
Sarrera	Disolbatzaile	t (h)	<b>4:8:9</b> <sup>a</sup>	<b>8 ee (%)</b> <sup>b</sup>
1	Hexanoa	3	56:44:0	52
		16	14:57:29	-
2	tBuOMe	3	45:54:0	50
		16	18:59:23	-
3	MeTHF	96	41:59:0	64
4	EtOAc	96	26:74:0	66
5	CH <sub>3</sub> CN	96	87:13:0	0

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H-EMN bidez determinatutako ratioa erreazio gordinarentzat. <sup>b</sup> HPLC kiralaren bidez determinatua (Chiralpack OD-H, Hexano/iPrOH (80:20), 1 mL/min).

Erreakzioen estereoselektibitatea determinatzeko beharrezkoa izan zen monoazetato **8** isolatzea, ez baitzen aurkitu baldintza egokirik HPLC-an **4** diola, **8** monoazetatoa eta **9** diazetatoa ezberdindu ahal izateko. Lortutako soberakin enantiomerikoak ondorengoak izan dira (1. taula): hexanotan % 52 (1. sarrera), tBuOMe-tan % 50 (2. sarrera), MeTHF-tan % 64 (3. sarrera) eta EtOAc-tan % 66 (4. sarrera). Azetonitriloa disolbatzaile gisa erabili zen erreazioak izan zuen transformaziorik baxuena eta monoazetato **9** errazemikoa lortu zen. Nahiz eta, soberakin enantiomerikoak moderatuak izan, paraziklofano enantiopuruak lortzeko planteamendua bideragarria dela baieztatzen dute.

Jarraian, agente azilatzaileak eduki dezakeen bolumen esterikoaren eragina aztertu da. Horretarako, binil hexanoatoa aukeratu da binil azetatoarekin konparatzeko eta erreazio baldintza berdinak aplikatu dira. Erreakzioa hiru disolbatzailetan gauzatu zen, eta azetonitriloa disolbatzaile bezala ez erabiltzea erabaki zen, indukzio asimetricorik erakutsi ez zuelako (2. taula).

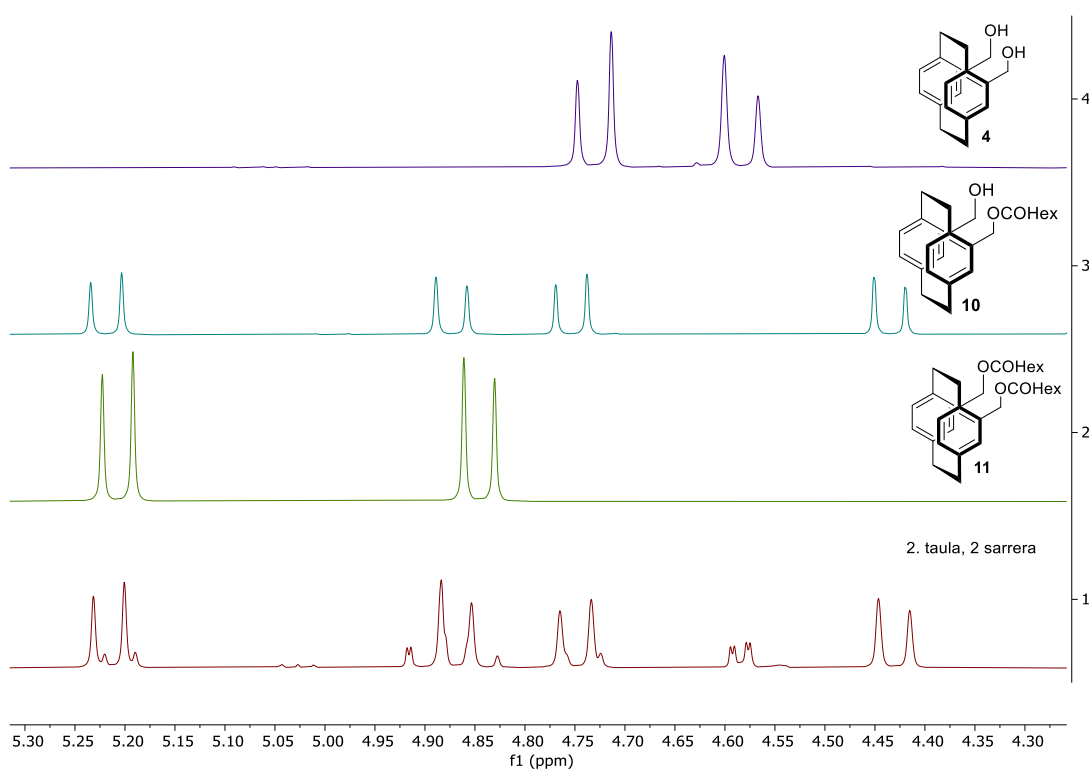
2. taula: lipasek katalizatutako 4 pseudo-gem diolaren azilazioa binil hexanoatoarekin



Sarrera	disolbatzaile	t (h)	4:10:11 <sup>a</sup>	10 ee (%) <sup>b</sup>
1	Hexanoa	3	56:32:12	40
2	tBuOMe	3	0:92:8	36
3	EtOAc	96	46:54:0	70

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H-EMN bidez determinatutako ratioa erreakzio gordinarentzat. <sup>b</sup> HPLC kiralaren bidez determinatua (Chiralpack OD-H, Hexano/iPrOH (80:20), 1 mL/min).

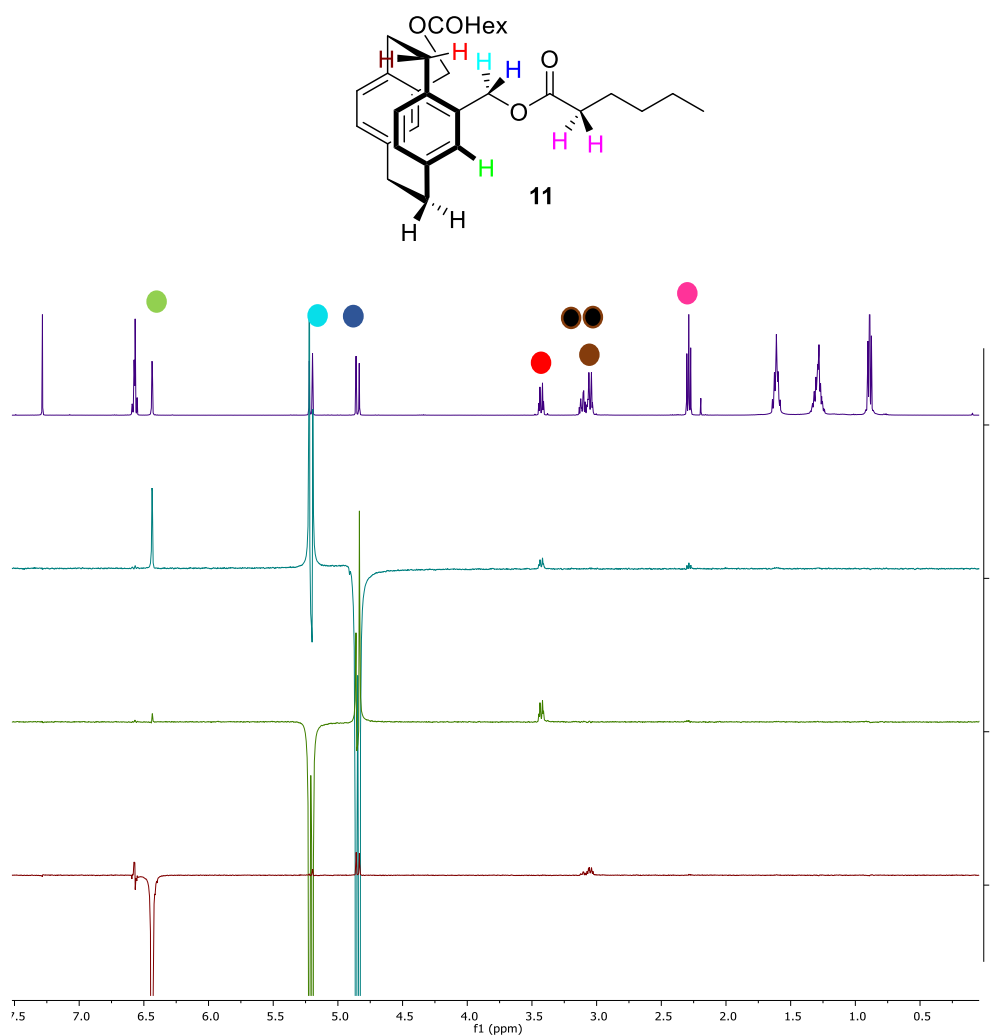
Entzimaren aktibitateak binil azetatoarekin zeukan tendentzia bera jarraitu du hexanotan eta etil azetatotan baina erreaktibotasun gorakada hauteman zen tBuOMe-tan (2. taula, 2. sarrera). 9. irudian, erreakzio honen <sup>1</sup>H-EMN espeketroak ageri dira, erreakzio guztietan eman den transformazio maila adierazteko adibide gisa edukitzeko. Horretarako, hidroxilo taldeetara lotuta dauden metileno hexoziklikoen seinaleak alderatu dira.



**9. irudia:** erreakzio gordina binil hexanoatoarekin tBuOMe-tan giro tenperaturan 96 h igaro ondoren.

Erreakzioaren estereoselektibitatea antzekoa izan zen binil azetatoarekin alderatuta eta soberakin enantiomerikoa zertxobait handiagoa, etil azetatotan % 70-ko balioa lortu zen.

Dihexanoatoaren (**11**) kasurako, asignazioa NOE bidezko esperimentua eginez gauzatu da (10. irudia).

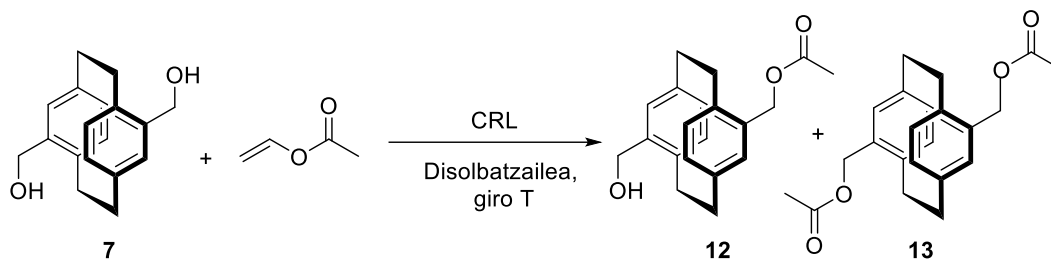


**10. irudia:** dihexanoatoaren NOE espektroak eta protoien asignazioa

Modu paralelo batean, diol pseudo-para-paraziklofanoaren (**7**) azetilazio erreakzioa aztertu zen lau disolbatzaile desberdinetan (3. taula). Erreferentzia gisa diol pseudo-gem-paraziklofanoaren denborak hartu ziren. Lehendabizi ondorioztatu zena baldintza berdinetan diol pseudo-para-paraziklofanoaren erreaktibitatea baxuagoa zela izan zen. Kasu honetan ere, transformazio

portzentaia disolbatzailearen polartasunarekin erlazionatuta dagoela ikusten da, azetonitrilotan transformaziorik ematen ez dela ikusiz (4. sarrera).

3. taula: lipasek katalizatutako **7** pseudo-para diolaren azilazioa binil azetatoarekin



Sarrera	disolbatzaile	t (h)	<b>7:12:13</b> <sup>a</sup>	<b>12 ee (%)</b> <sup>b</sup>
1	Hexanoa	3	60:20:20	56
2	tBuOMe	3	31:49:20	-16
3	EtOAc	96	23:43:34	22
4	CH <sub>3</sub> CN	96	--	--

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H-EMN bidez determinatutako ratioa erreakzio gordinarentzat. <sup>b</sup> HPLC kiralaren bidez determinatua (Chiralpack OD-H, Hexano/iPrOH (80:20), 1 mL/min).

Bestalde, hexanotan lortutako monoazetato **12**-aren soberakin enantiomerikoa antzekoa izan zen monoazetato **8**-arekin lortu zenarekin alderatuta (1. sarrera), baxuagoa tBuOMe-tan eta etil azetatotan (2. eta 3. sarrera). tBuOMe erabili zeneko kasuan, indukzio asimetrikoaren inbertsioa eman daitekela ikusten da (2. sarrera).

Aplikatu diren erreakzio baldintzetan ezinezkoa izan da diazetato **13**-aren fomazioa saihestea. Horregatik, CRL-k ez dirudi lipasa egokia denik monoazetato **12**-aren errendimendu egokia lortzeko, nahiz eta amaiaren, soberakin enantiomerikoa hobetzea lortu zen.

## 4. ONDORIOAK

Gradu Amaierako Lan honen helburua ziklofano akiralen transesterifikazio asimetrikoan erabiltzen diren lipasen balio katalitiko frogatzea zen, molekula enantiomerkoki aberatsen sintesi jasangarri eta erraza lortzeko.

Horretarako, 4-13-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoa (**4**) eta 4-16-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoa (**7**) sintetizatu dira eta beraien portaera aztertu da *Candida rugosa* lipasa bidez katalizatu diren transesterifikazio-erreakzioetan, binil azetatoa eta binil hexanoatoa agente azilatzaile gisa erabiliz disolbatzaile organiko ezberdinetan.

Atera diren ondorio nagusiak ondorengoak dira:

- Frogatu da disolbatzaile organikotan *Candida rugosa* lipasa gai dela **4** eta **7**-aren azilazio-erreakzioak aurrera emateko.
- Bi diolentzat, disolbatzailearen polartasuna eta aktibitate entzimatiakoaren arteko erlazioa aztertu da. Disolbatzaile apolarretan erreakzioa azkarragoa da, aktibitate interfazialarekin bat etorritik.
- **7** diolak, produktu diazilatua lortzeko joera erakutsi du, hau da, lortu nahi ez zen produktua. Horregatik, monoazetilazioaren errendimendu altuagoa emango duten erreakzioen baldintzak optimizatzeko, **4** diola substratu hobea izan daitekeela ikusi da.
- Soberakin enantiomerkiko altuenak etil azetatotan egin diren erreakzioetan lortu dira: % 66 *ee* monoazetatoarentzat (**8**) eta % 70 *ee* monohexanoatoarentzat (**10**).
- Diol **7**-arekin egin diren erreakzioetan, lortu diren soberakin enantiomerkikoak baxuagoak izan dira (% 16-56 *ee*) eta aztertu da nola disolbatzailea aldatzean indukzio asimetrikoaren direkzioa aldatu duen.
- Soberakin enantiomerkikoak hobetze aldera, etorkizun hurbil batean, agente azilatzaile desberdinak, diol **4**-aren erreakzio tenperatura etil azetatotan eta lipasa mikrobiano komertzial gehiago aztertzeke asmoa dago.

## CONCLUSIONS

The aim of this Final Degree Thesis was to demonstrate the catalytic value of lipases used in asymmetric transesterification reactions of achiral cyclophanes, in order to achieve a sustainable and easy synthesis of enantiopure molecules.

To this end, 4-13-dihydroxymethyl [2.2]paracyclophane (**4**) and 4-16-dihydroxymethyl [2.2]paracyclophane (**7**) have been synthesized and their behavior was analysed in transesterification reactions catalysed by lipase *Candida rugosa*, using vinyl acetate and vinyl hexanoate as acylating agents in different organic solvents.

The principal conclusions are:

- In organic solvents, it has been proved that *Candida rugosa* is capable of carrying out acylation reactions of **4** and **7**.
- For both diols, the relation between the polarity of the solvent and the enzymatic activity was analyzed. Taking into account the interfacial activity, in apolar solvents the reaction is faster.
- The diol **7** has shown a tendency towards a diacylated product, which is an unwanted product. Therefore, in order to optimize the conditions of the reactions that will yield a higher yield of monoacetylation, it has been observed that diol **4** would be better.
- The highest enantiomeric excess have been obtained in ethyl acetate reactions: 66 % *ee* for monoacetate (**8**) and 70 % *ee* for monohexanoate (**10**).
- In the reactions carried out with diol **7**, the enantiomeric excess obtained have been lower (16-56 % *ee*) and it was analyzed how changing the solvent changed the direction of the asymmetric induction.
- In order to improve enantiomeric excess, it is planned to study in the near future different acylating agents, the reaction temperature of diol **4** in ethyl acetate and more commercial microbial lipases.

## 5. ZATI ESPERIMENTALA

### 5.1. Erreaktiboak, disolbatzaileak eta prozedura orokorrak

Alde batetik, fase organikoen garbiketa akuosoak egin eta gero,  $\text{MgSO}_4$  edo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gatzekin lehortu dira, kotoia erabiliz iragazi dira. Bestetik, disolbatzaileen eliminazioa errotabapenez egin da. Büchi R-210 ur-tronpa bidez presio murriztuan lurrundu dira. Disolbatzaileen eliminazio osorako, Edwards-RV3 (0.5 mmHg) hutsune ponpak erabili dira.

Erreakzio ez-akuoso guztiak nitrogeno atmosfera pean, kristalezko ontzi lehorretan eta imantxoekin gauzatu dira. Etekinak kromatografikoki eta espektroskopikoki puruak diren konposatuei egiten die erreferentzia, bestelakorik adierazten ez bada.

Berotu behar ziren erreakzioak, plaka berogailu bidez egin dira. Beharrezkoa zenean, kondentsagailua ere erabili da. Tenperatura baxuko erreakzioak aurrera eramateko, hozte bainuak, Huber TC100E eta isopropanol bainuak erabili dira.

Kontrakorik azaltzen ez bada, erreaktiboak erosi bezala erabili dira, aurre-purifikaziorik gabe. Disolbatzaile lehorrak behar zirenean, HPLC kalitatezkoak erabili dira eta THF-a *Pure Solv It* lehortze zutabetik pasarazi da. Bestelako disolbatzaileak, lehorrak behar ez zirenean, kromatografiarako eluitzaile gisa, adibidez, maila sintetikokoak ziren eta aurretik lehortu gabe erabili dira, orokorrean.

- **Kromatografia:** erreakzioak eta kromatografia zutabeak geruza meheko kromatografia (GMK) bidez monitorizatu dira. Horretarako euskarri bezala aluminiozko plaka duen silizezko gela erabili da (Merk, kiesegel 60, F-254) eta argi ultramorez ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) edo potasio permanganatotan errebelatuz eta berotuz behatu dira.

Kromatografia bidezko purifikazioa kromatografia zutabe bidez gauzatu da. Fase geldikor bezala silizezko gela (ROCC, 0.040-0.063 mm partikulen tamaina, 60 Å-ko poroen tamaina eta 230-240-mesh ) eta dagokion disolbatzaile nahastea adierazitako proportzioetan erabiliz.

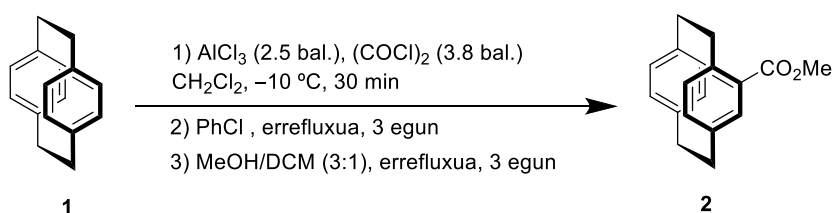
- **Erresonantzia magnetiko nuklearra:**  $^1\text{H}$ -EMN eta  $^{13}\text{C}$ -EMN espektroak Bruker Avance DPX 400 MHz espektrometroan egin dira ( $^{13}\text{C}$ -EMN-ren kasuan 100 MHz). Desplazamendu kimikoen balioak ( $\delta$ ) ppm-tan adierazi dira. Disolbatzaile hondarraren seinaleak,  $\text{CDCl}_3$ -renak,  $^1\text{H}$ -EMN = 7.26 ppm eta  $^{13}\text{C}$ -EMN = 77.23 ppm-tan agertzen dira. Akoplamendu konstantea ( $J$ ) Hertziotan (Hz) adierazten da.

Ondorengo laburdurak erabili dira seinaleen deskripziorako: m (multiplotea), t (tripletea), d (dobletea), dd (doble dobletea), ddd (doble doble dobletea), dddd (doble doble doble dobletea) eta s (singletea). Espektroak ikusi eta editatzeko MestReNova 21.0.0 programa erabili da.

- **Urtze tenperatura:** Büchi B-450 urtze tenperatura neurtzeko aparatuarekin determinatu da.
- **Masa espektrometria:** masa-espektroak LC/Q-TOF batean gauzatu dira Agilent Jet Stream ESI ionizazio-iturri batekin. Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Ikerketa Zerbitzu Orokorrean (SGIker) egin dira analisiak.
- **HPLC:** bereizmen altuko likido kromatografiako laginak fase geldikor kiral batean gauzatu dira, Waters 2695 kromatografo batean Waters 2998 fotodiodo detektagailuarekin. Chiralcel OD-H zutabea (250 x 4,6 mm) erabili da. Kasu bakoitzerako baldintzak zehaztu dira.
- **IG:** infragorri espektroak ALPHA II FT-IR espektrometroan egin dira eta OPUS programa erabiliz prozesatu dira.

## 5.2. 4-13-dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (4)

### 5.2.1. 4-Karboximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (2)



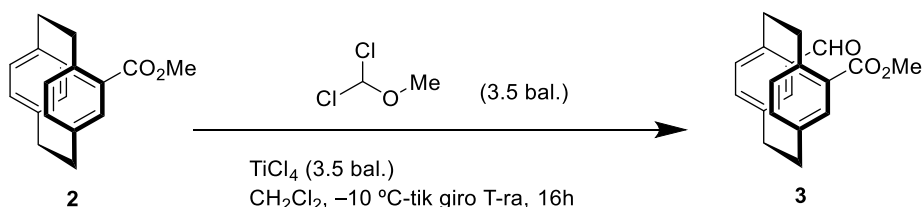
$\text{AlCl}_3$  anhidroa (1, 10,12 g, 75,9 mmol, 2,5 bal.)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  lehorrean disolbatu da (100 mL) 250 mL-ko matraze batean eta nitrogeno ingurunean. Oxalilo kloruroa (9,88 mL, 115 mmol, 3,8 bal.) gehitu da tantaz tanta. Nahastea  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ -tan irabiatu da 5 minutuz. Ondoren, [2,2]paraziklofanoa (6,32 g, 30,3 mmol, 1 bal.) astiro gehitu da. Gorri-ilun koloreko nahastea  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ -tan irabiatu da 30 minutuz. Izotza zein ur hotza erantsi dira erreakzioa horia bihurtuz. Bi faseak banatu eta ur fasea  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hotzarekin (3x50 mL) tratatu da. Fase organikoa  $\text{MgSO}_4$ -ekin lehortu eta



hutsunepean kontzentratu da, disolbatzailea eliminatuz. Klorobentzenotan (20 mL) disolbatu da eta nahastea irabiatzen utzi da 3 egunez errefluxuan. Hutsunepean disolbatzailea eliminatzen da. Lortu den solido marroia MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (3:1, 75 mL) nahastean disolbatu da eta irabiatzen utzi da 3 egunez errefluxuan. Giro tenperaturara hoztu eta gero, hutsunepean kontzentratu da. Produktu gordina zutabe kromatografiaren bidez purifikatzen da (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), **2** konposatua lortuz (6,4 g, 23,4 mmol, etekina %79) solido zuri gisa. Datu espektroskopikoak, bibliografian deskribatutakoekin bat datoz.<sup>43</sup>

<sup>1</sup>H-EMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.16 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 1H), 6.59-6.53 (m, 2H), 6.52-6.46 (m, 3H), 4.11 (ddd, *J* = 12.9, 9.8, 1.8 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.26-2.94 (m, 6H), 2,87 (ddd, *J* = 12.9, 10.1, 6.9 Hz, 1H).

### 5.2.2. 4-Karboximetil-13-formil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (**3**)



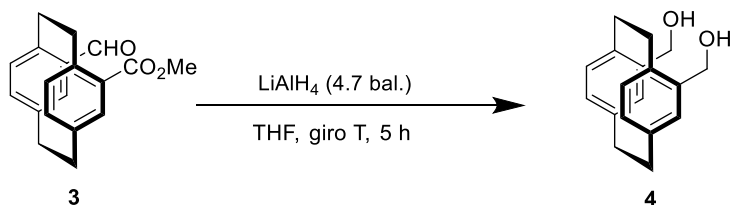
4-Karboximetil[2,2]paraziklofanoa **2** (0,873 g, 3,26 mmol, 1 bal.) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> lehorrean (50 mL) disolbatzen da eta – 10 °C-tara hozten da nitrogeno ingurunean. TiCl<sub>4</sub> (1M CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-tan, 11,4 mL, 11,4 mmol, 3,5 bal.) eta 1,1-diklorometileterra (1,31 g, 1 mL, 11,4 mmol, 3,5 bal.) gehitu dira, hurrenez hurren. Nahastea giro tenperaturara hoztu eta 16 orduz irabiatu da. Disoluzioa izotzetara bota da eta irabiatzen utzi da. Bi faseak banatu eta ur fasea CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hotzarekin (2x50 mL) tratatu da. Fase organiko NaHCO<sub>3</sub> disoluzio saturatuarekin (2x30 mL), H<sub>2</sub>O (2x30 mL) eta gatzunarekin (2x30 mL) garbitu da. Ondoren, fase organikoa MgSO<sub>4</sub>-ekin lehortu, iragazi eta hutsunepean kontzentratu da. Produktu gordina zutabe kromatografiko bidez purifikatu da ( 9:1 Hex/EtOAc), **3** konposatua lortuz, solido zuri gisa (0,659 g, 2,22 mmol, etekina %68). Datu espektroskopikoak, bibliografian deskribatutakoekin bat datoz.<sup>43</sup>

<sup>1</sup>H-EMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.93 (s, 1H), 7.09 (t, *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.72-6.67 (m, 2H), 6.65-6.60 (m, 2H), 4.29-4.05 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.21-3.05 (m, 5H), 3.05-2.93 (m, 1H).

<sup>43</sup> Delcourt, M.; Felder, S.; Benedetti, E.; Micouin, L. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 6612-6616. DOI: 10.1021/acscatal.8b01872.

<sup>13</sup>C-EMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 190.6, 167.0, 143.5, 142.1, 140.1, 139.7, 138.2, 136.6, 136.2, 136.0, 135.7, 134.5, 133.8, 130.8, 51.9, 35.0, 34.8, 34.6, 31.2.

### 5.2.3. 4-Karboximetil-13-dihidroxiometil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (4)



4-Karboximetil-13-formil[2,2]paraziklofanoa **3** (0,659 g, 2,23 mmol, 1 bal.) THF lehorrean disolbatu (100 mL) eta LiAlH<sub>4</sub> (1 M CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-tan, 10,5 mL, 10,49 mmol, 4,7 bal.) gehitzen zaio nitrogenu ingurunean. Nahastea giro temperaturan irabiatzen da 5 orduz. Ondoren, EtOAc-rekin (80 mL) diluitzen da. Fase organikoa banatu eta ur fasea HCl 6 M-ekin (2x30 mL) garbitzen da. Ondoren, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erabiliz lehortu eta hutsunepean kontzentratzen da. Produktu gordina zutabe kromatografiko bidez purifikatu da (1:1 Hex/EtOAc), **3** konposatua lortuz, solido zuri gisa (0,409 g, 1,52 mmol, etekina %98). Datu espektroskopikoak, bibliografian deskribatutakoekin bat datoz.<sup>43</sup>

<sup>1</sup>H-EMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.64 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.56 – 6.50 (m, 2H), 4.73 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.45 – 3.39 (m, 1H), 3.14 – 3.07 (m, 2H), 3.03 – 2.97 (m, 1H).

<sup>13</sup>C-EMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 139.8, 139.1, 135.8, 134.8, 132.4, 129.8, 62.8, 35.1, 31.5.

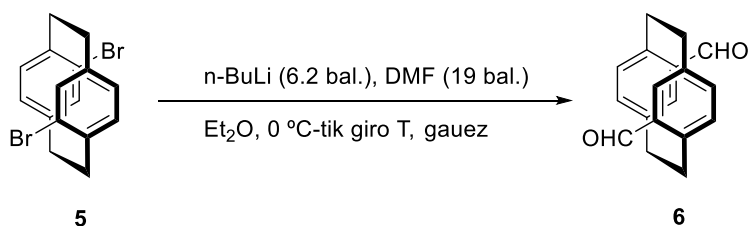
IR (cm<sup>-1</sup>): 3250, 2921, 1412, 1229, 1137, 1035, 1007, 886, 712, 648, 510.

F.p.: 146-148 °C

HRMS (ESI) (*m/z*): C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>) kalkulaturakoa: 268.1463, aurkitua: 268.1465.

### 5.3. 4-16-Dihidroxiometil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (7)

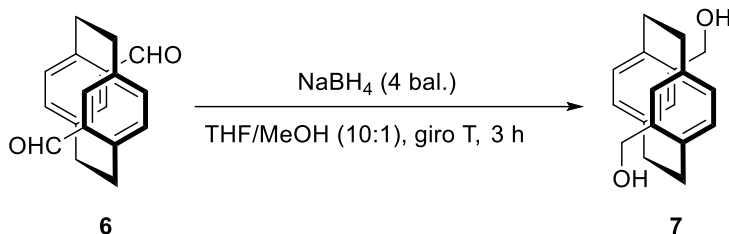
#### 5.3.1. Pseudo-para-diformil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (6)



Komertzialki saltzen den 4,16-dibromo[2,2]paraziklofanoa **5**, labean lehortutako matraxe batera isurtzen da (500 g, 1,37 mmol, 1 bal.). Matraxeari septuma jartzen zaio eta hutsune zein nitrogenozko hiru ziklo egiten dira, ingurune inerte lortzeko. Et<sub>2</sub>O lehorra (30 mL) gehitzen da matraxera eta edukia 0 °C-tara hozten da. Ondoren, *n*-BuLi gehitzen da tantaz tanta (1,6 M in hexane, 5,14 ml, 8,22 mol, 6.2 bal.), edukia giro tenperaturara etortzen uzten da pixkanaka, 8 orduz irabiatzen da eta berriz ere, 0 °C-tara hozten da. Azkenik, DMF lehorra (2 mL, 25,8 mmol, 19 bal.) isurtzen da. Erreakzioa giro tenperaturara epeltzen utzi eta gaba osoan zehar irabiatzen da. HCl 1M disoluzioa (10 mL) gehitzen da eta ordu batez irabiatzen da. Erreakzioa ur distilatua erabiliz diluitzen da. Gero, erauzketa egiten da CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> erabiliz (2x50 mL). Fase organikoa NaHCO<sub>3</sub> disoluzio saturatuaren (2x50 mL) eta gatzunaren bidez (2x50 mL) garbitzen da. Amaitzeko, MgSO<sub>4</sub>-rekin lehortu, iragazi eta hutsunepean kontzentratzen da. Birkristalizazioa egiten da toluenoa erabiliz, **6** konposatua lortuz (0,201 g, 0,76 mmol, etekina % 50). Datu espektroskopikoak, bibliografian deskribatutakoekin bat datoz.<sup>43</sup>

<sup>1</sup>H-EMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.85 (s, 1H), 6.89 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.82 (ddd, *J* = 7.8, 2.1, 0.8 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.20 (ddd, *J* = 13.1, 10.0, 1.3 Hz, 1H), 3.34 (dd, *J* = 13.2, 10.1 Hz, 1H), 3.14 (ddd, *J* = 13.2, 10.0, 7.3 Hz, 1H), 2.95 (ddd, *J* = 13.1, 10.1, 7.3 Hz, 1H).

### 5.3.2. 4,16-Dihidroximetil[2,2]paraziklofanoaren sintesia (**7**)



**6** konposatua labean lehortutako matraxe batera isurtzen da (0,315 g, 1,19 mmol, 1 bal.). Matraxeari septuma jartzen zaio, baina ez da beharrezkoa ingurune inerte jartzea. THF/MeOH 10:1 nahastea (12 mL) gehitzen dira. Jarraian, NaBH<sub>4</sub> (0,180 g, 4,76 mmol, 4 bal.) gehitzen dira eta hiru egunez irabiatzen uzten da. Gero, ur distilatuarekin diluitzen da (20 mL) eta erauzketa egiten da EtOAc (3x20 mL) erabiliz. Fase organikoa NaHCO<sub>3</sub> disoluzio saturatuaren (2x20 mL) eta gatzunaren bidez (2x20 mL) garbitzen da. Amaitzeko, MgSO<sub>4</sub>-rekin lehortu, iragazi eta hutsunepean kontzentratzen da. Lortu den produktu gordina zutabe kromatografikoaren bidez purifikatu da (2:1 Hex/EtOAc), **7** konposatua lortuz, solido zuri gisa (0,252 g, 0,94 mmol, etekina % 80).

<sup>1</sup>H-EMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.79 (s, 1H), 6.54-6.45 (m, 2H), 4.61 (t, *J* = 1.1 Hz, 2H), 3.27 (ddd, *J* = 13.4, 9.8, 2.5 Hz, 1H), 3.14 – 3.05 (m, 2H), 2.85 (ddd, *J* = 13.4, 10.6, 6.0 Hz, 1H).

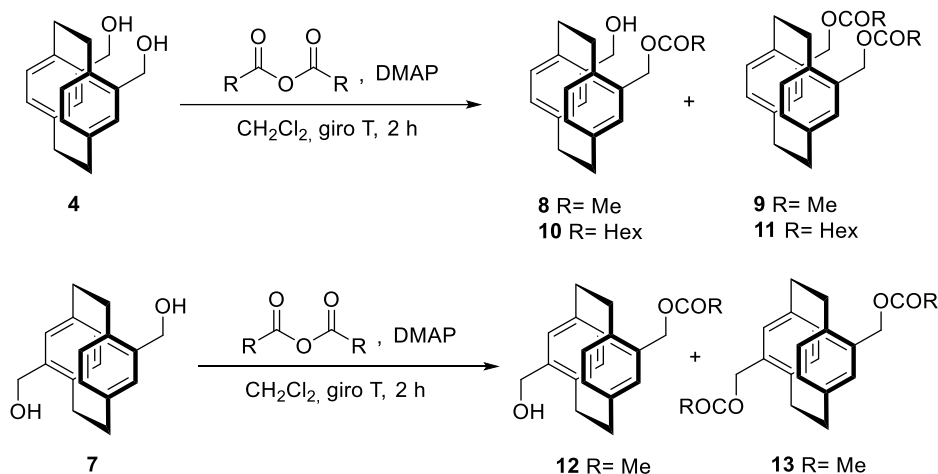
<sup>13</sup>C-EMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 139.8, 139.7, 135.9, 134.8, 131.7, 126.6, 62.6, 33.6, 32.3.

IR (cm<sup>-1</sup>): 3394, 2926, 1720, 1593, 1411, 1333, 1017, 899, 716, 655, 500.

F.p.: 122-124 °C

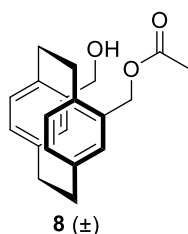
HRMS (ESI) (*m/z*): C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> (M + H<sup>+</sup>) kalkulaturakoa: 268.1463, aurkitua: 268.1463.

#### 5.4. Monoazetato/monohexanoato errazemikoaren eta diazetato/dihexanoatoaren sintesi orokorra (**8**, **9**, **10**, **11**, **12** eta **13**)



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-tan disolbatu den (10 mL) diol **4** edo **7**-aren (1,16 mmol, 1 bal.) soluzio bati DMAP (0,12 mmol, 0,1 bal.) eta dagokion anhidroa (0,81 mmol, 0,7 bal.) gehitzen zaizkio, hurrenez hurren. Erreakzioa giro tenperaturan irabiatzen da 2 orduz. Erreakzio nahastea HCl (0,1M, 2x80 mL) bidez garbitu, fase organikoa lehortu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eta disolbatzailea eliminatzen zaio. Produktu gordina zutabe kromatografiko batez purifikatzen da (9:1 Hex/EtOAc), dagozkien monoesterrak eta diesterrak isolatuz (**8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**).

#### 4-Hidroximetil-13-azetato[2,2]paraziklofanoa (**8**)



**<sup>1</sup>H-EMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.67-6.51 (m, 4H), 6.5-6.41 (m, 2H), 5.21 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.42 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.49 -3.33 (m, 2H), 3.18-2.95 (m, 6H), 2.06 (s, 3H).

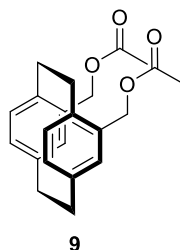
**<sup>13</sup>C-EMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.9, 139.0, 138.8, 138.5, 136.7, 135.7, 134.0, 133.0, 132.6, 131.7, 130.3, 63.3, 62.3, 34.0, 30.9, 30.7, 30.6, 28.7, 20.0.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3300, 2927, 1727, 1377, 1226, 1017, 879, 757, 717, 567.

**F.p.:** 71-72 °C

**HRMS (ESI) (m/z):** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub> (M + H<sup>+</sup>) kalkulatatukoa: 310.1569, aurkitua: 310.1575.

#### Pseudo-gem-diazetato[2,2]paraziklofanoa (9)



**<sup>1</sup>H-EMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.69 -6.54 (m, 2H), 6.50-6.37 (m, 1H), 5.18 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 12.2, 1H), 3.46-3.40 (m, 1H), 3.12-3.03 (m, 3H), 2.06 (s, 3H).

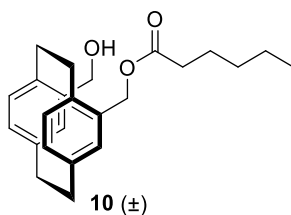
**<sup>13</sup>C-EMN** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.8, 139.8, 137.8, 135.1, 134.1, 133.6, 133.0, 64.3, 34.9, 31.8, 21.0.

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 2930, 1723, 1377, 1236, 1017, 975, 883, 754, 717, 564.

**F.p.:** 85-86 °C

**HRMS (ESI) (m/z):** C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> (M + H<sup>+</sup>) kalkulatatukoa: 352.1675, aurkitua: 352.1677.

#### 4-Hidroxi metil-13-hexanoato[2,2]paraziklofanoa (10)

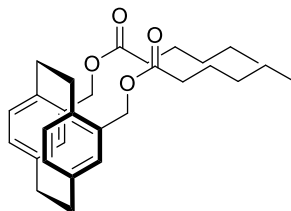


**<sup>1</sup>H-EMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.56 (dd, *J* = 4.5, 1.4 Hz, 4H), 6.48 (s, 1H), 6.42 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 12.5, 0.7 Hz, 1H), 3.44 - 3.38 (m, 2H), 3.15 - 3.09 (m, 2H), 3.08 - 3.02 (m, 4H), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.66 - 1.62 (m, 2H), 1.31 - 1.28 (m, 4H), 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H).

$^{13}\text{C-EMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.8, 140.0, 139.8, 139.5, 138.4, 137.6, 136.8, 135.0, 134.3, 133.4, 132.8, 132.6, 131.3, 64.2, 63.4, 53.4, 35.0, 34.3, 31.7, 31.3, 29.7, 24.6, 22.3, 13.9.

**HRMS (ESI) (m/z):**  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_3$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ) kalkulatatukoa: 366.2195, aurkitua: 366.2203.

#### Pseudo-gem-dihexanoato[2,2]paraziklofanoa (11)



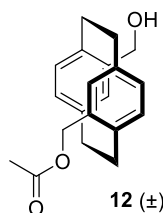
11

$^1\text{H-EMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.60 – 6.55 (m, 2H), 6.44 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 5.21 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 4.85 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 3.45 – 3.41 (m, 1H), 3.14 – 3.02 (m, 3H), 2.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.60 (s, 2H), 1.33 – 1.26 (m, 4H), 0.89 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C-EMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.79, 140.01, 138.0, 135.3, 134.6, 133.7, 133.2, 64.3, 35.2, 34.5, 32.1, 31.5, 24.9, 22.6, 14.1.

**HRMS (ESI) (m/z):**  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_4$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ) kalkulatatukoa: 464.2927, aurkitua: 464.2933.

#### 4-Hidroxi metil-16-azetato[2,2]paraziklofanoa (12)



12 ( $\pm$ )

$^1\text{H-EMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.60 (s, 1H), 6.59-6.51 (m, 5H), 5.03 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 4.93 (d,  $J = 12.9$  Hz, 1H), 4.65 (d,  $J = 13.1$  Hz, 1H), 4.38 (d,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 3.45-3.26 (m, 2H), 3.18 (dddd,  $J = 12.8, 10.6, 5.9, 2.1$  Hz, 2H), 3.03 – 2.83 (m, 4H), 2.17 (s, 3H).

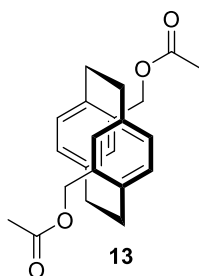
$^{13}\text{C-EMN}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.3, 139.9, 139.8, 137.9, 137.2, 135.2, 135.1, 134.2, 132.9, 132.0, 129.4, 128.7, 64.8, 63.7, 33.9, 33.7, 32.7, 32.6, 29.7, 21.1

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3457, 3261, 2925, 1716, 1413, 1263, 1033, 899, 769, 713, 571.

**F.p.:** 72-73  $^\circ\text{C}$

**HRMS (ESI) (m/z):**  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_3$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ) kalkulatatukoa: 310.1569, aurkitua: 310.1576.

### Pseudo-para-diazetato[2,2]paraziklofanoa (13)



<sup>1</sup>H-EMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.61-6.52 (m, 3H), 5.05 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.36 (ddd, *J* = 13.5, 9.7, 1.9 Hz, 1H), 3.19 (ddd, *J* = 12.4, 10.5, 1.9 Hz, 1H), 3.04-2.84 (m, 2H), 2.14 (s, 3H).

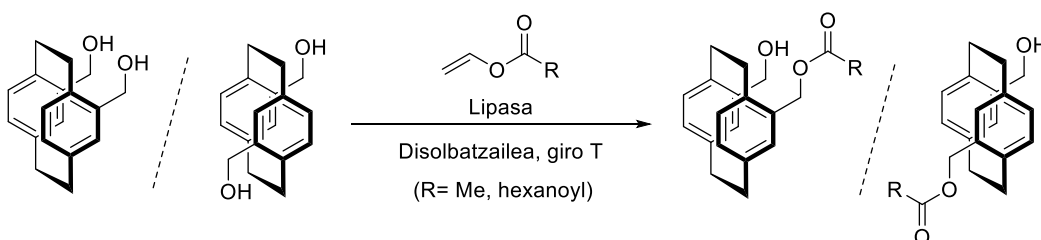
<sup>13</sup>C-EMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.0, 139.8, 138.1, 135.3, 134.3, 133.0, 130.3, 65.0, 33.8, 32.8, 21.1.

IR (cm<sup>-1</sup>): 2948, 1724, 1375, 1236, 1020, 958, 893, 769, 726, 571.

F.p.: 84-85 °C

HRMS (ESI) (*m/z*): C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> (M + H<sup>+</sup>) kalkulaturakoa: 352.1675, aurkitua: 352.1667.

#### 5.5. Lipasa bidez katalizatutako transesterifikazio-erreakzioen prozedura orokorra (8, 9, 10, 11, 12 eta 13)



Dagokion disolbatzailean (5 mL) disolbatu da diol **4** edo **7** (0,05 mol). Ondoren, lipasa CRL (100 mg) eta dagokion binil esterra (4 bal., 0,2 mmol) gehitu dira, hurrenez hurren. Erreakzioa giro temperaturan irabiatu da 500 rpm-tan eta dagokion denboraz. Gero, entzima iragazi, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-rekin garbitu eta disolbatzailea eliminatu da, produktu gordina lortuz. H-EMN bidez ikusi dira diol/monoester/diester portzentaiak. Monoesterrak zutabe kromatografiko bidez isolatu dira (Hex/EtOAc 9:1) eta soberakin enantiomerikoa HPLC (OD-H zutabea, Hexano:iPrOH/ 80:20, 1 mL/min) bidez lortu da.

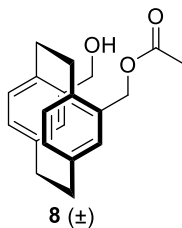
HPLC-ko baldintzak: Chiralcel OD-H zutabea (250 x 4,6 mm); Hexano:iPrOH/ 80:20, 1 mL/min); T = 25 °C; fluxua = 1 mL/min; λ = 300 nm.

Konposatu errazemikoentzat lortu diren balioak ondorengoak izan dira:

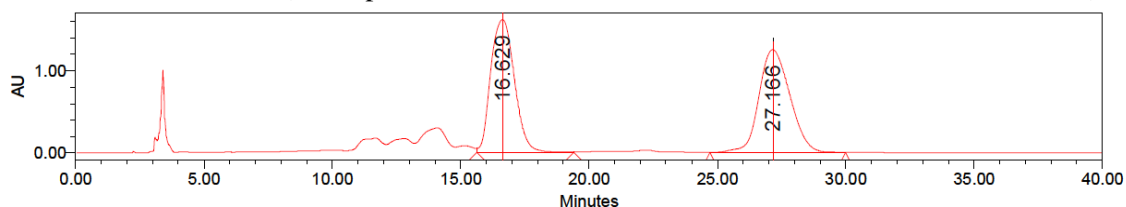
- **8** konposatu errazemikoa: TR1 = 16.6 min; TR2 = 27.1 min.
- **10** konposatu errazemikoa: TR1 = 12.29 min; TR2 = 18.8 min.
- **12** konposatu errazemikoa: TR1 = 11.8 min; TR2 = 14.4 min.



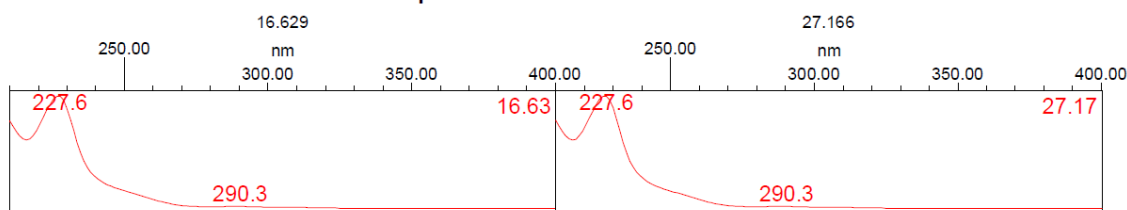
# ERANSKINAK 1: HPLC



HPLC kirala (Chiralpak OD-H zutabea; hexano:*i*-PrOH 80:20; 1 mL/min, 226 nm)



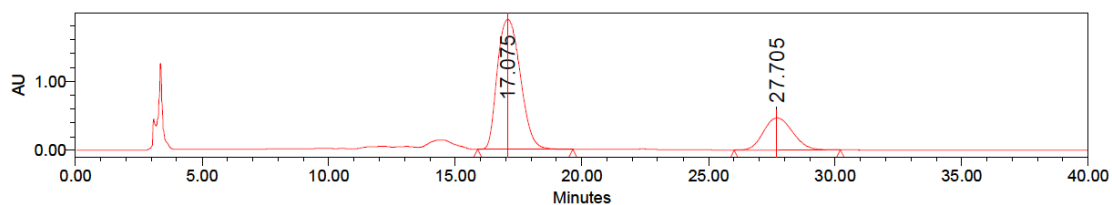
Spectrum Index Fraction Plot



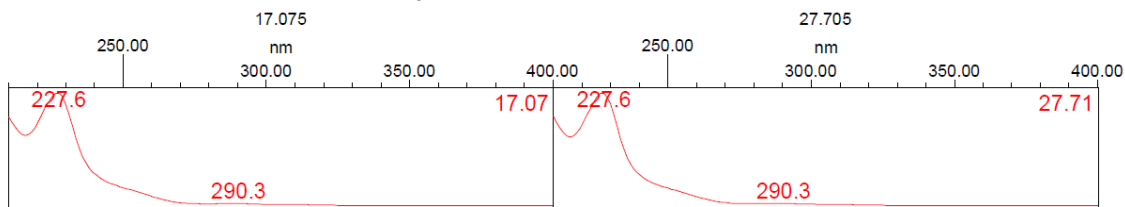
Peak Results

	Name	RT	Area	% Area
1		16.629	103634540	49.83
2		27.166	104323759	50.17

1. taula, 1. sarrera: CRL, hexano, 3 h



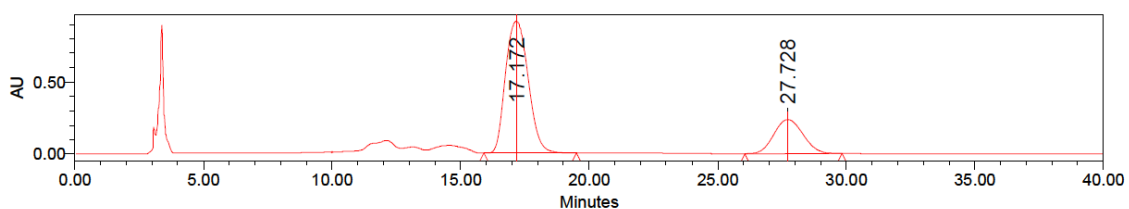
Spectrum Index Fraction Plot



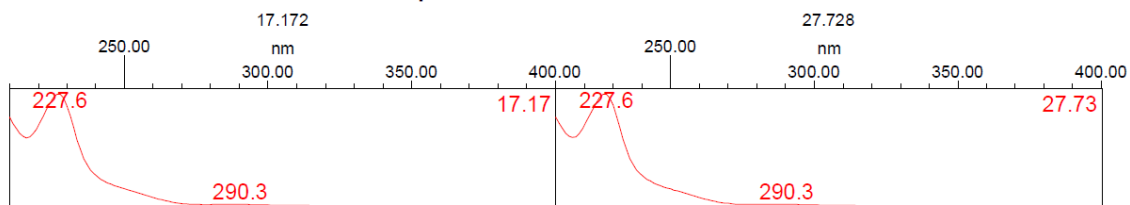
Peak Results

	Name	RT	Area	% Area
1		17.075	118343961	76.23
2		27.705	36899652	23.77

1. taula, 2. sarrera: CRL, tBuOMe, 3 h



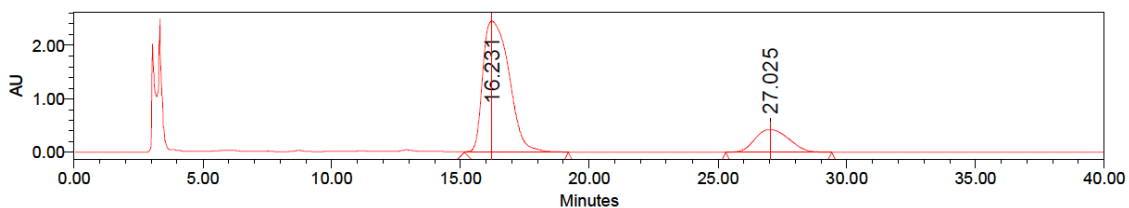
Spectrum Index Fraction Plot



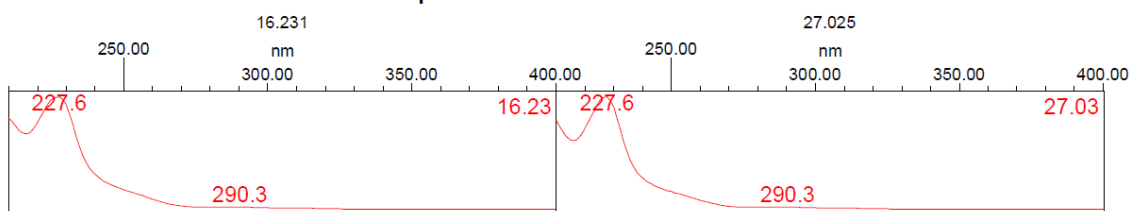
Peak Results

	Name	RT	Area	% Area
1		17.172	56090944	75.09
2		27.728	18611679	24.91

1. taula, 3. sarrera: MeTHF, 96 h



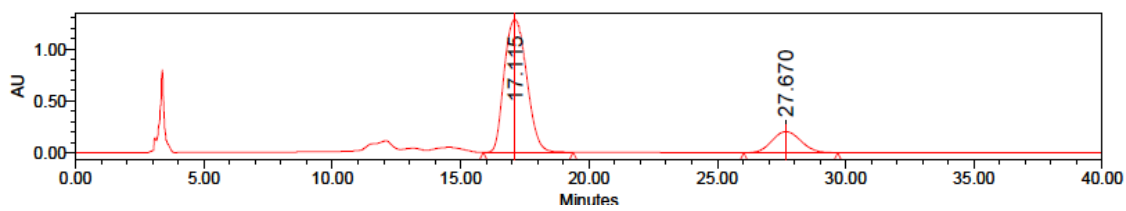
Spectrum Index Fraction Plot



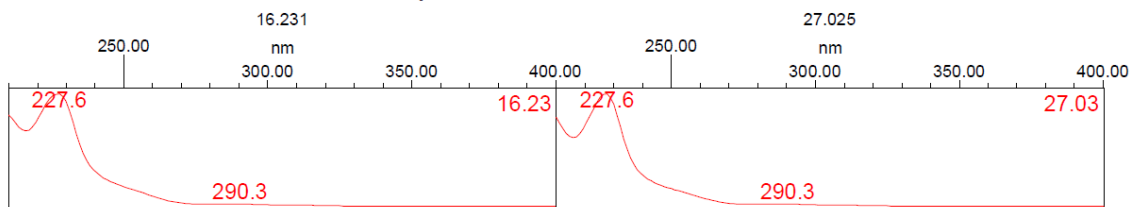
Peak Results

	Name	RT	Area	% Area
1		16.231	174137186	81.82
2		27.025	38704691	18.18

**1. taula, 4. sarrera: CRL, EtOAc, 96 h**



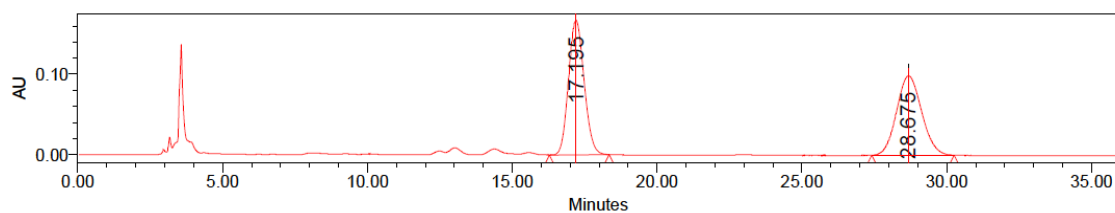
**Spectrum Index Fraction Plot**



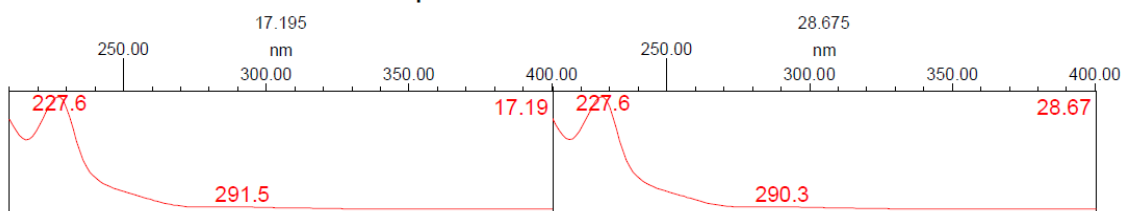
**Peak Results**

	Name	RT	Area	% Area
1		17.115	77552781	83.11
2		27.670	15756726	16.89

**1. taula, 5. sarrera: CRL, CH<sub>3</sub>CN, 96 h**

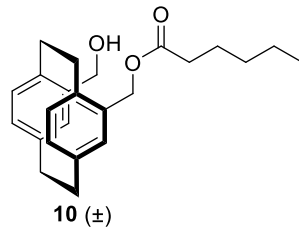


**Spectrum Index Fraction Plot**

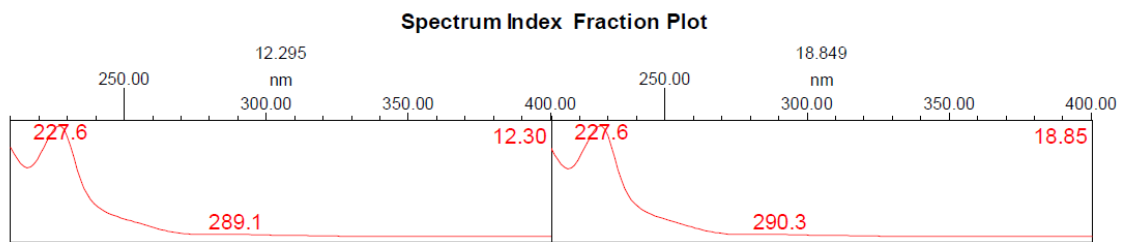
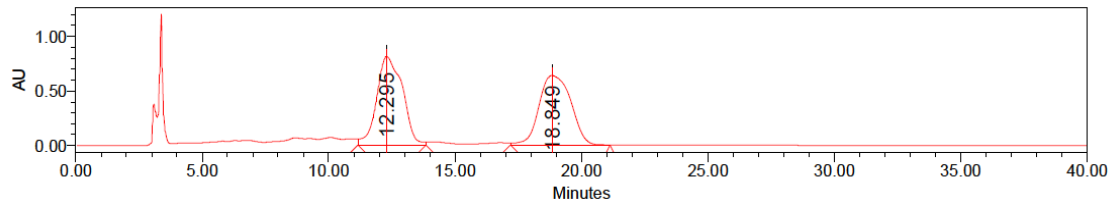


**Peak Results**

	Name	RT	Area	% Area
1		17.195	6200380	50.95
2		28.675	5968456	49.05



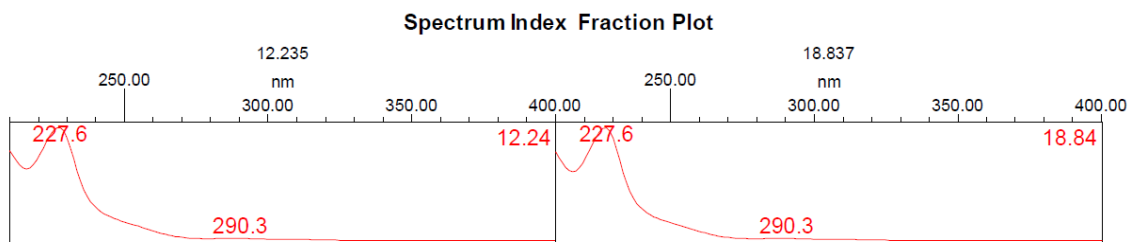
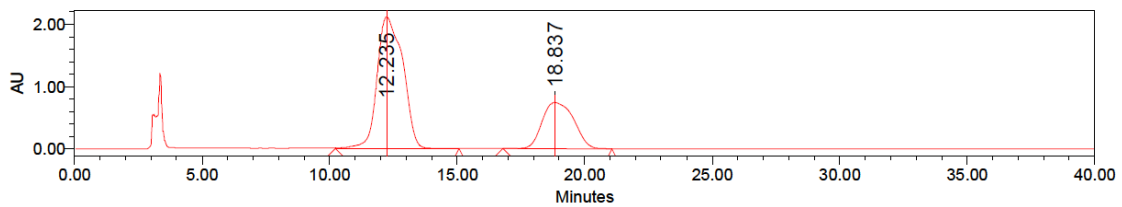
HPLC kirala (Chiralpak OD-H zutabea; hexano:*i*-PrOH 80:20; 1 mL/min, 226 nm)



**Peak Results**

	Name	RT	Area	% Area
1		12.295	57805149	50.95
2		18.849	55647969	49.05

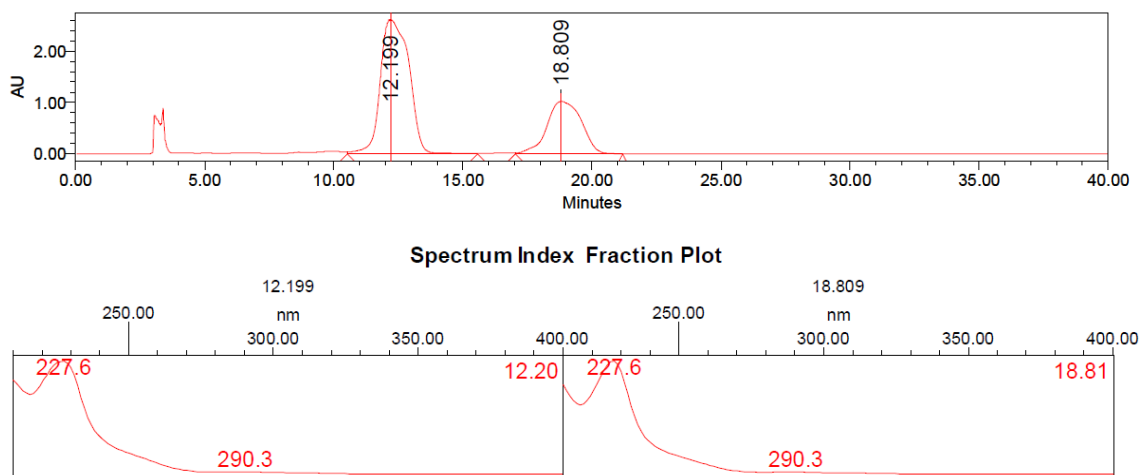
2. taula, 1. sarrera: CRL, hexano, 16 h



**Peak Results**

	Name	RT	Area	% Area
1		12.235	148730916	70.03
2		18.837	63648065	29.97

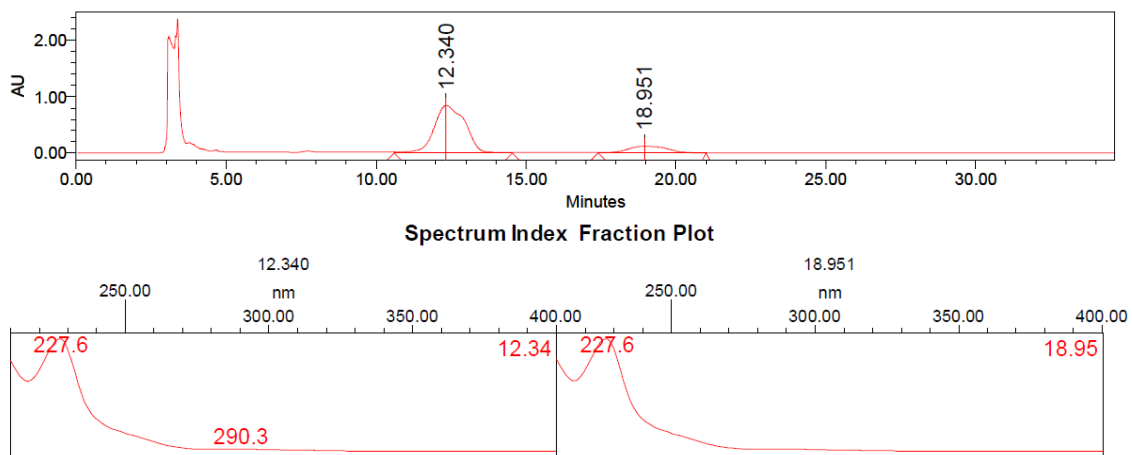
**2. taula, 2. sarrera: CRL, tBuOMe, 16 h**



**Peak Results**

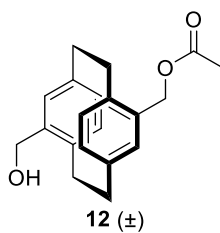
	Name	RT	Area	% Area
1		12.199	200988579	68.09
2		18.809	94195153	31.91

**2. taula, 3. sarrera: CRL, EtOAc, 96 h**

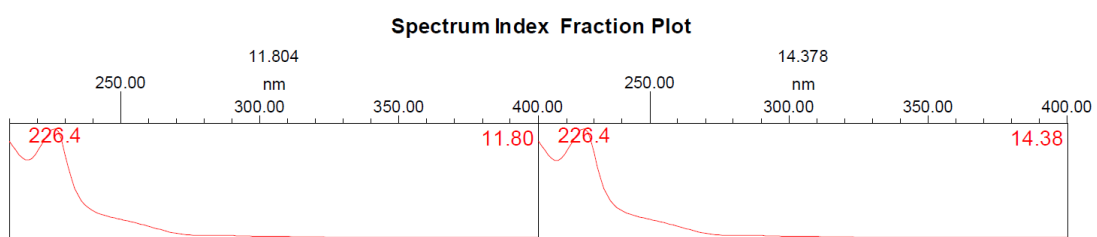
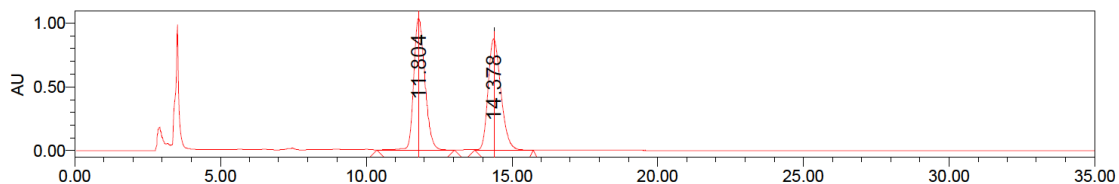


**Peak Results**

	Name	RT	Area	% Area
1		12.340	60683132	84.83
2		18.951	10847956	15.17

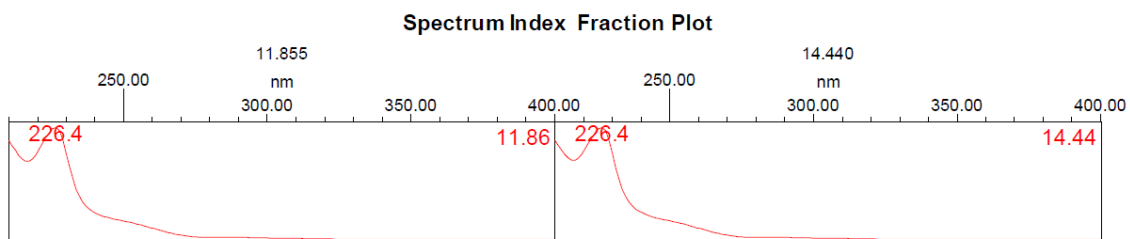
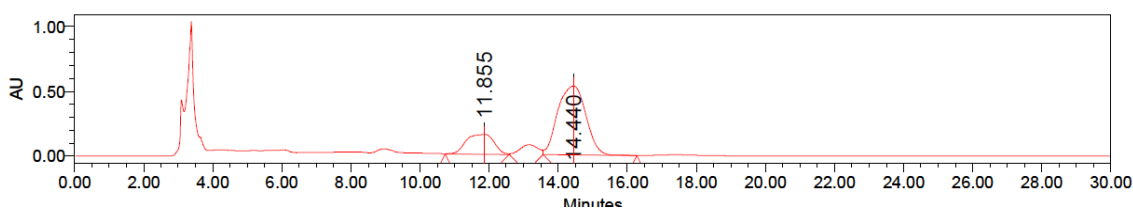


HPLC kirala (Chiralpak OD-H zutabea; hexano:*i*-PrOH 80:20; 1 mL/min, 226 nm)



	Name	RT	Area	% Area
1		11.804	27237890	50.44
2		14.378	26763508	49.56

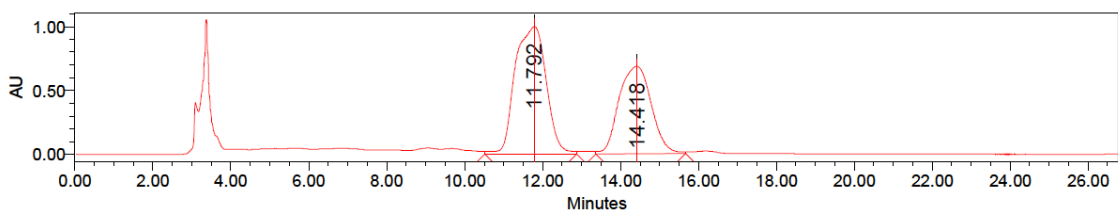
3. taula, 1. sarrera: CRL, hexano, 3 h



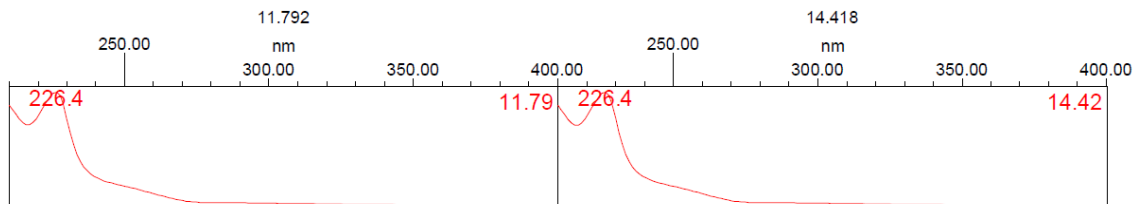
### Peak Results

	Name	RT	Area	% Area
1		11.855	8449761	22.00
2		14.440	29956002	78.00

**3. taula, 2. sarrera: CRL, tBuOMe, 3 h**



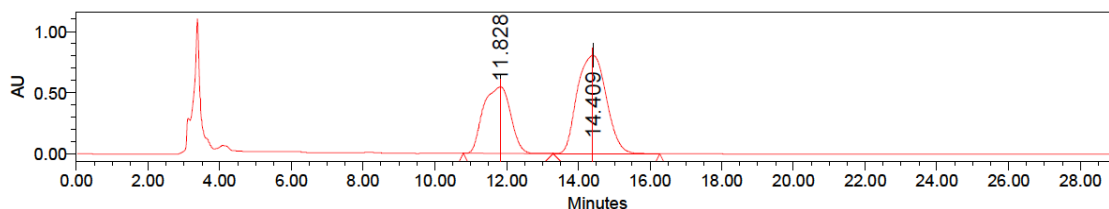
**Spectrum Index Fraction Plot**



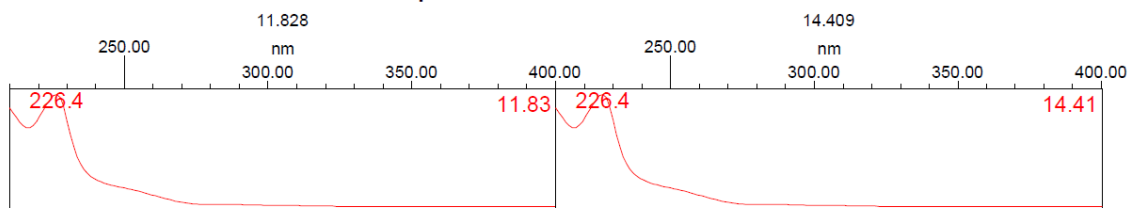
**Peak Results**

	Name	RT	Area	% Area
1		11.792	55128133	58.30
2		14.418	39428689	41.70

**3. taula, 3. sarrera: CRL, EtOAc, 96 h**



**Spectrum Index Fraction Plot**



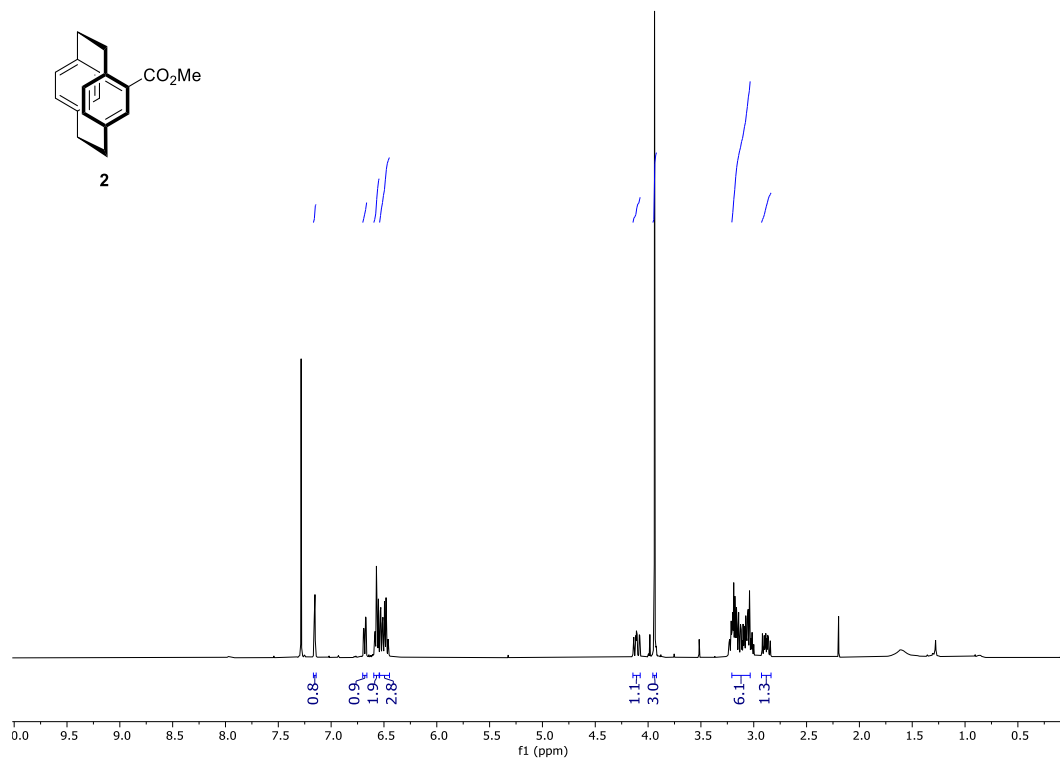
**Peak Results**

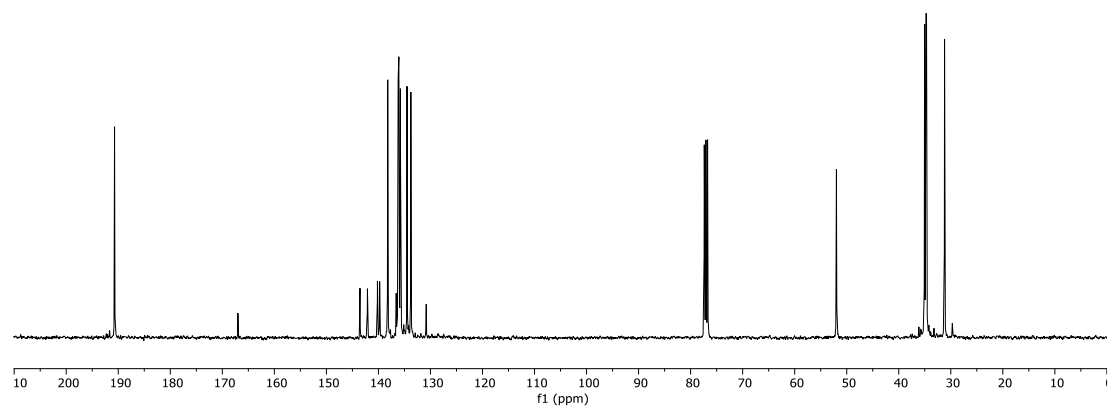
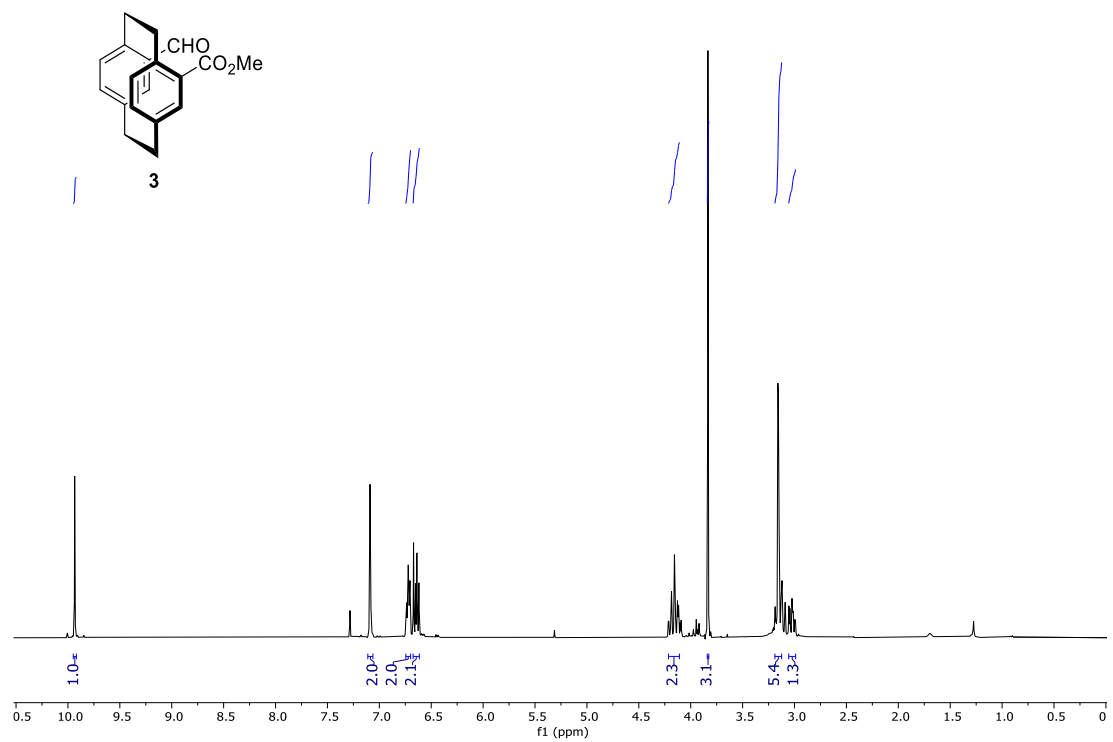
	Name	RT	Area	% Area
1		11.828	28987320	38.94
2		14.409	45457185	61.06

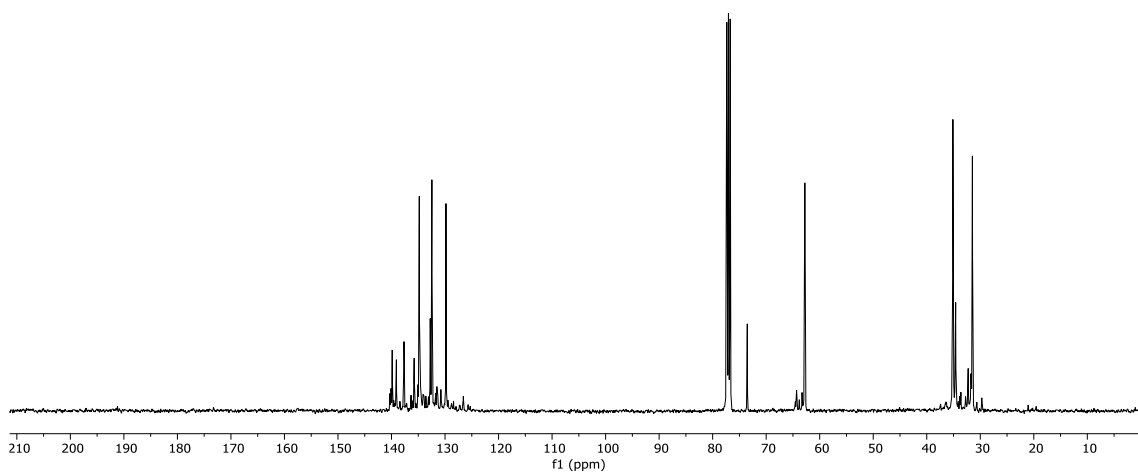
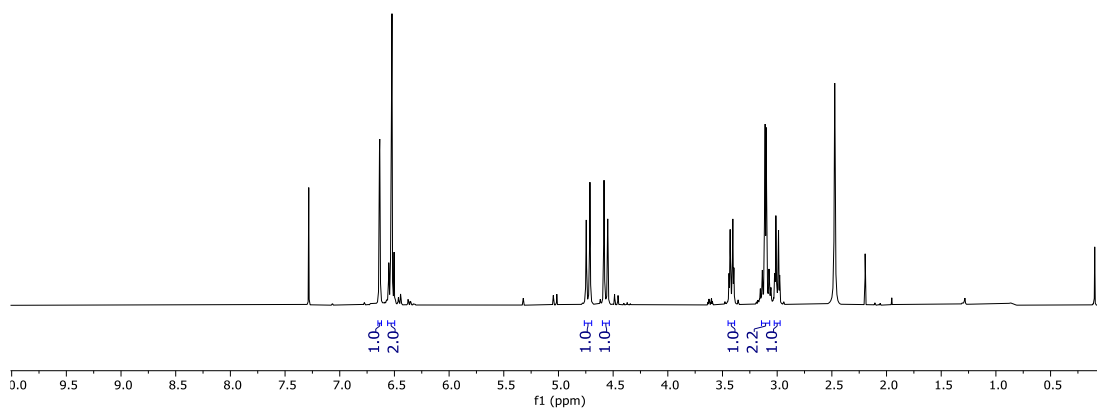
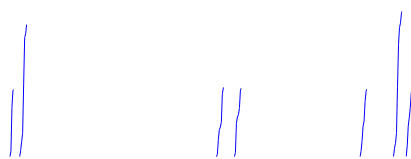
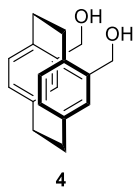


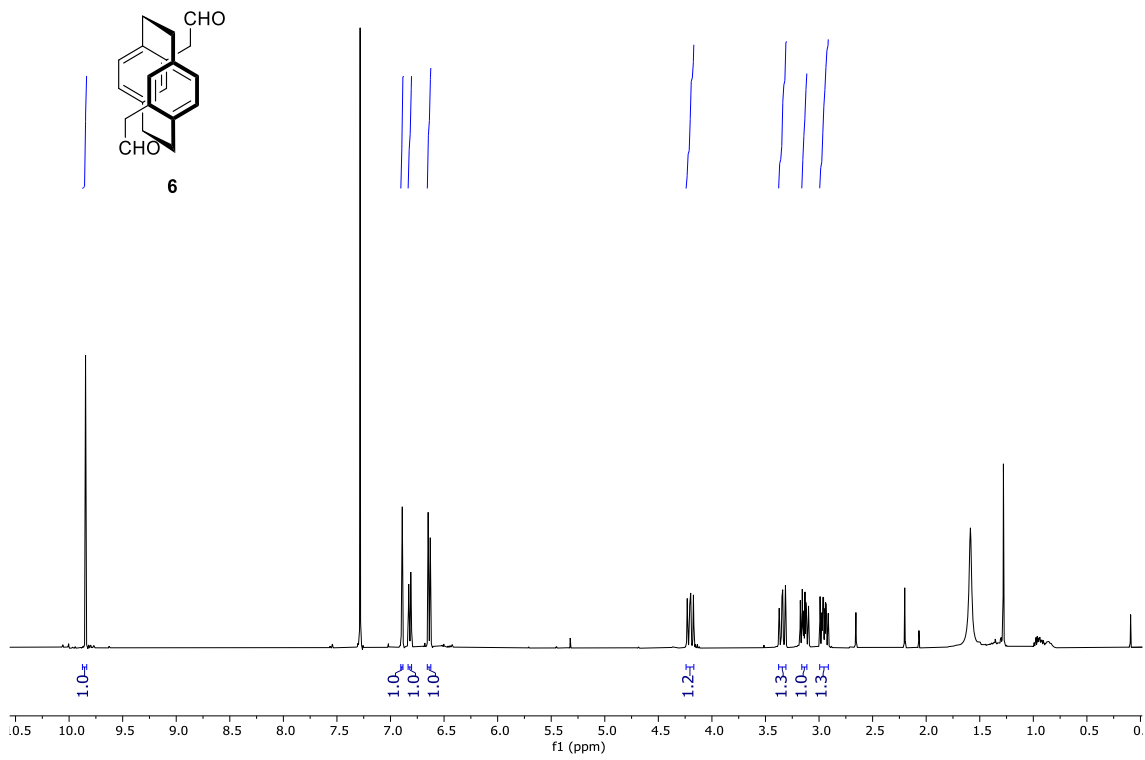


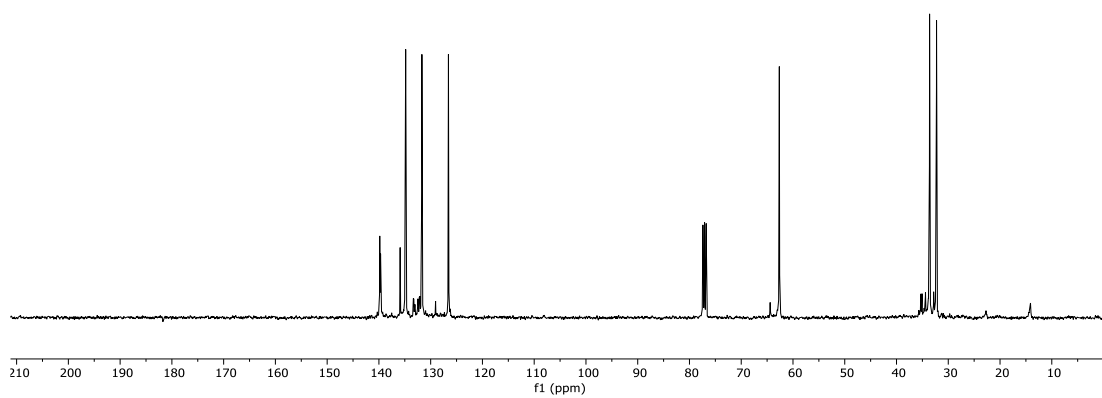
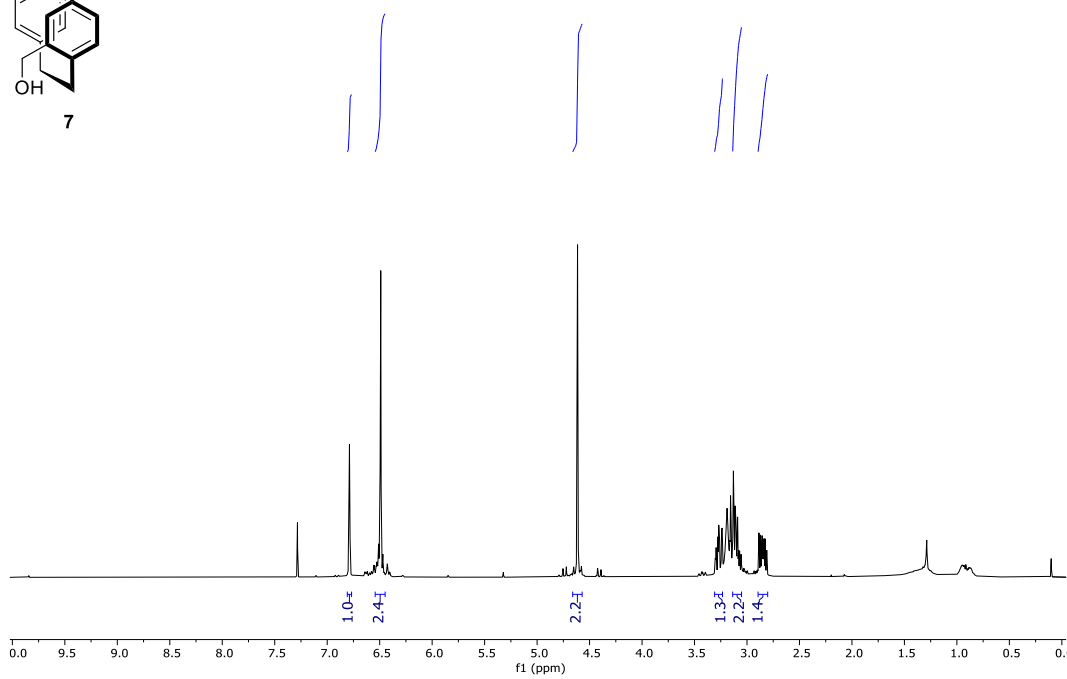
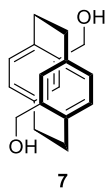
# ERANSKINAK 2: <sup>1</sup>H-EMN ETA <sup>13</sup>C-EMN

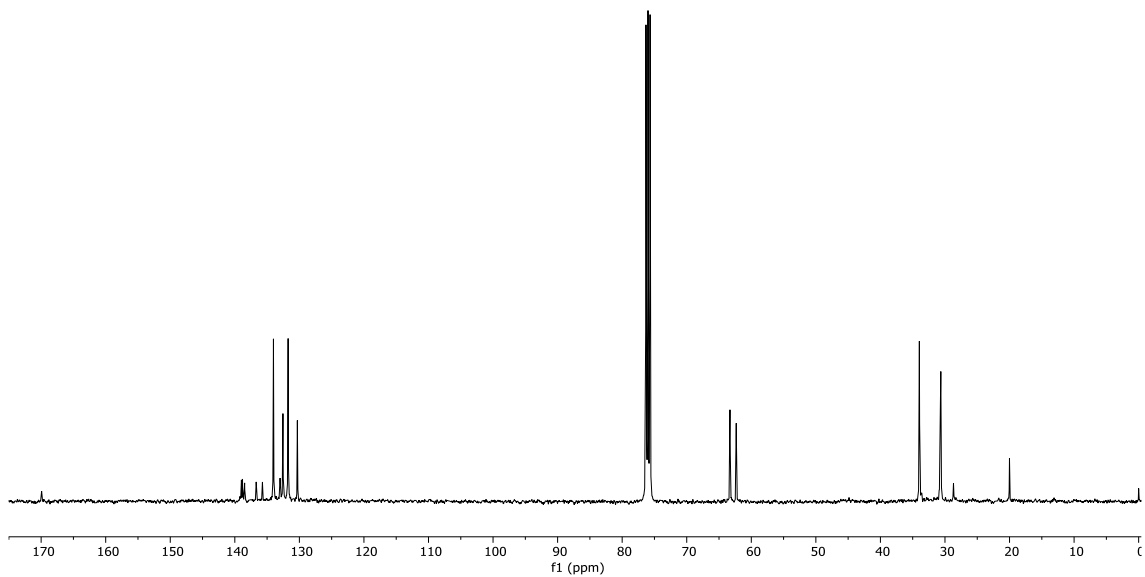
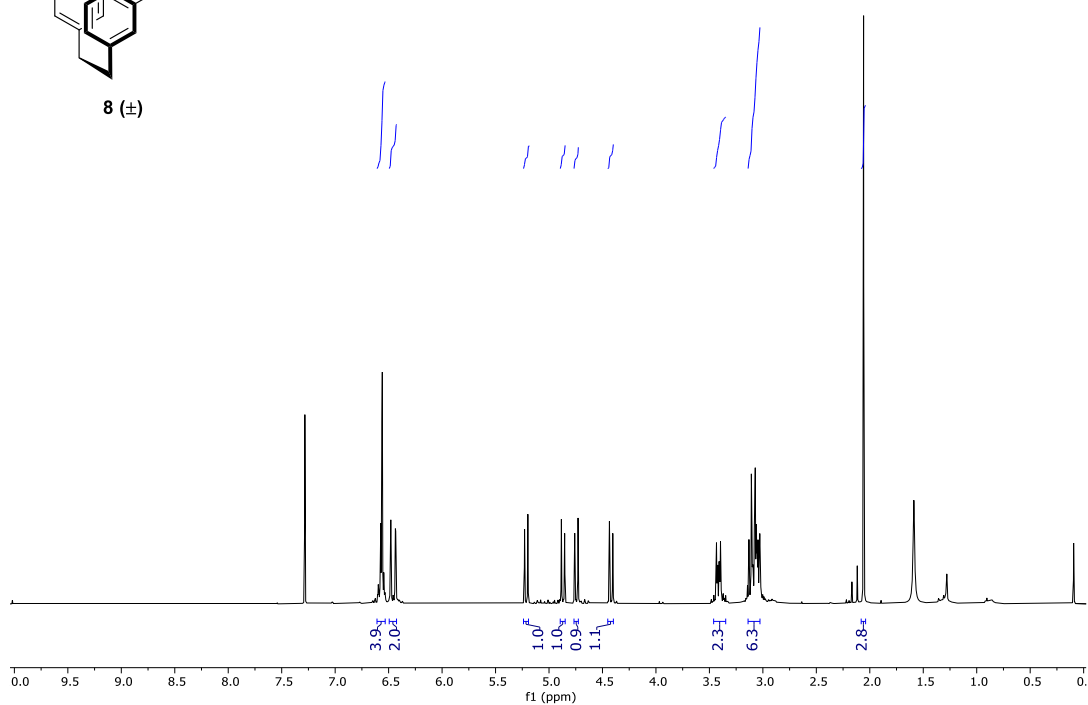
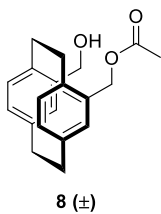


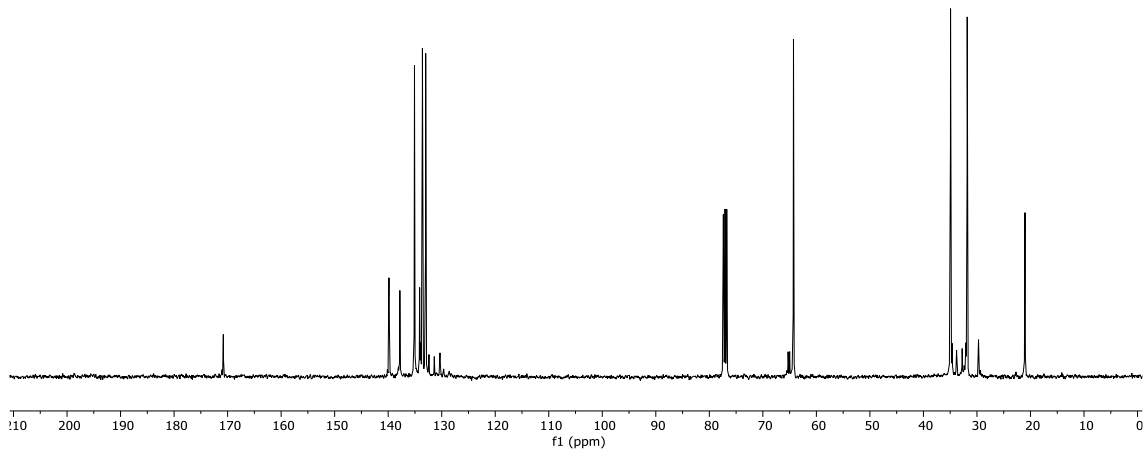
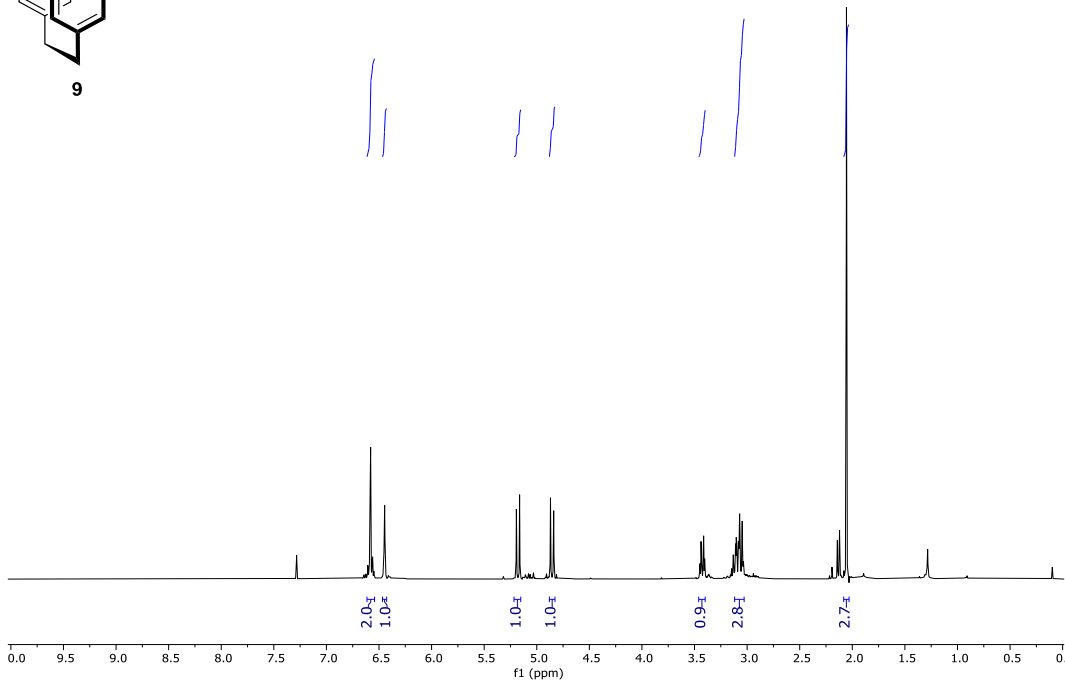
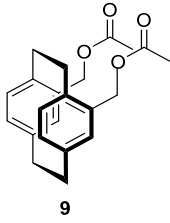


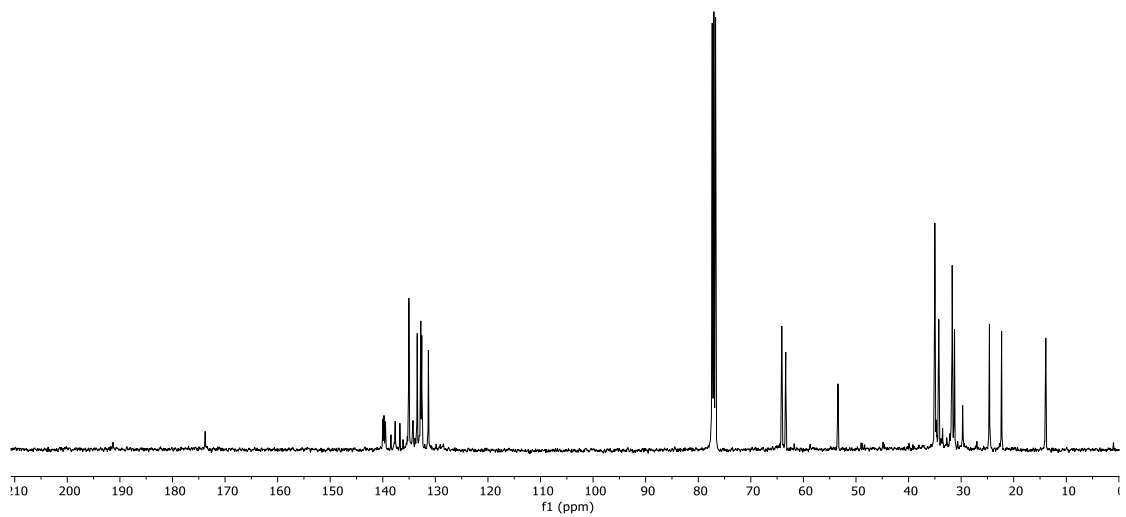
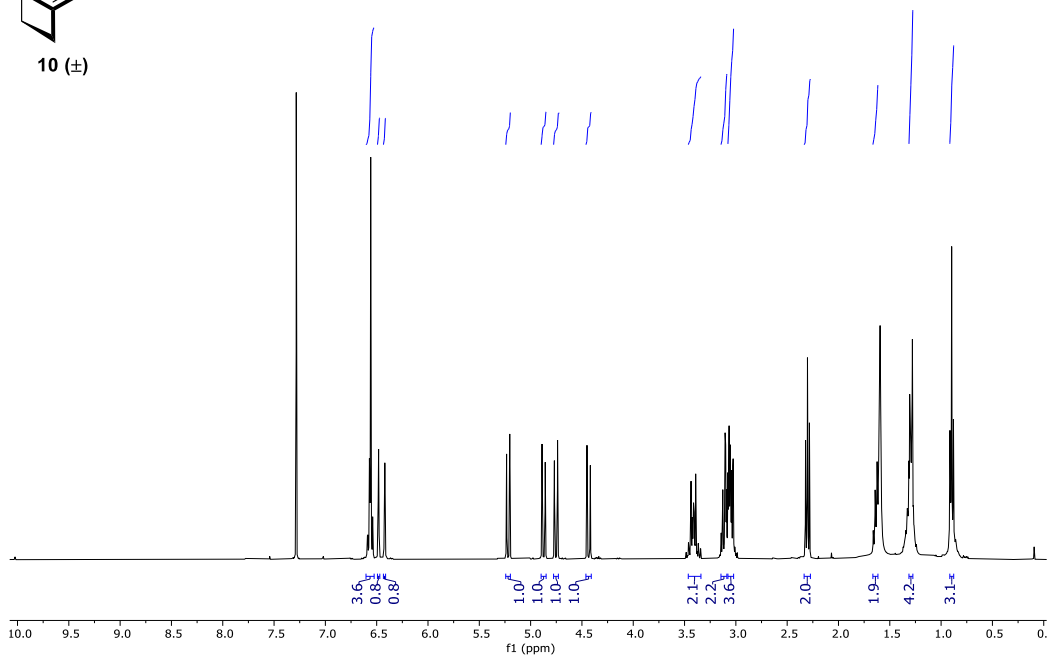
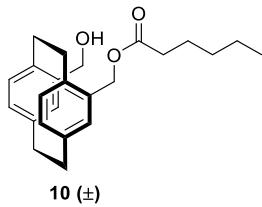




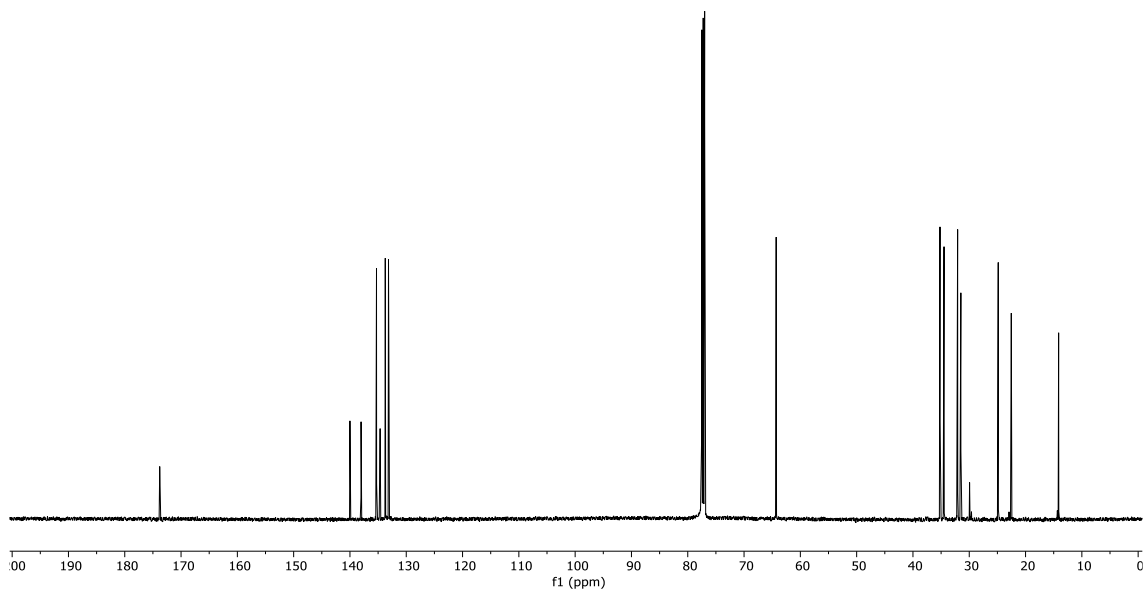
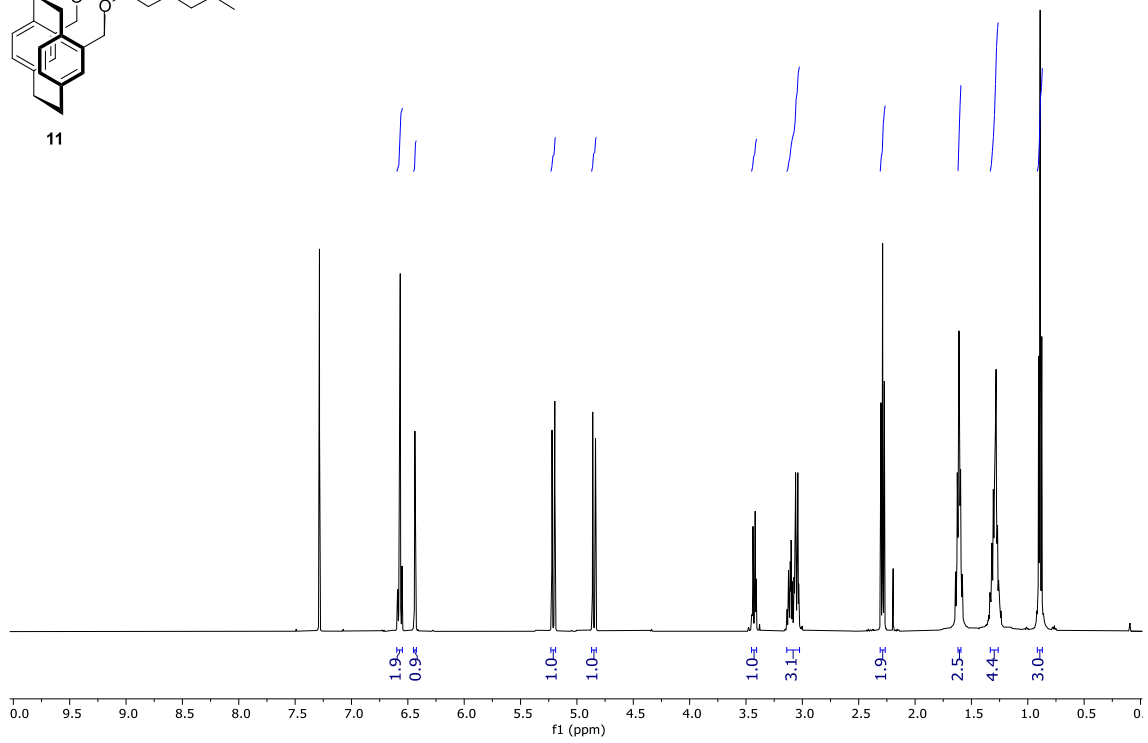
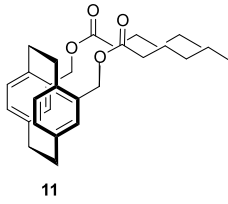


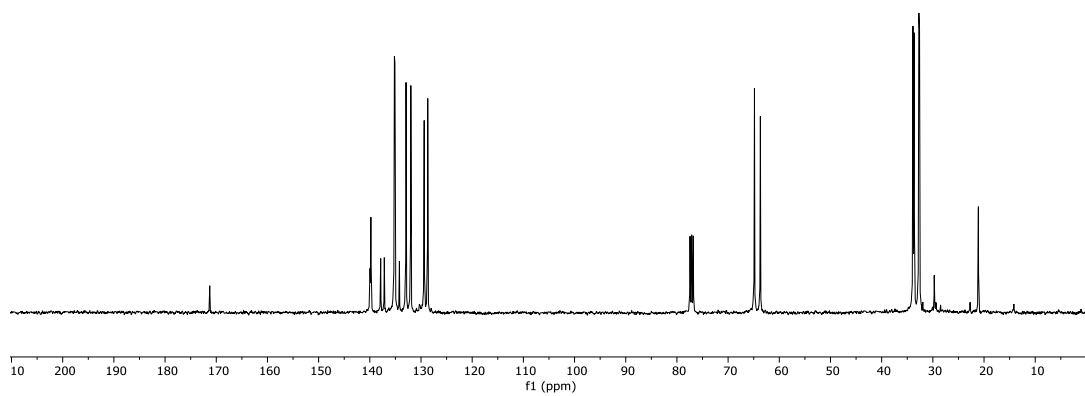
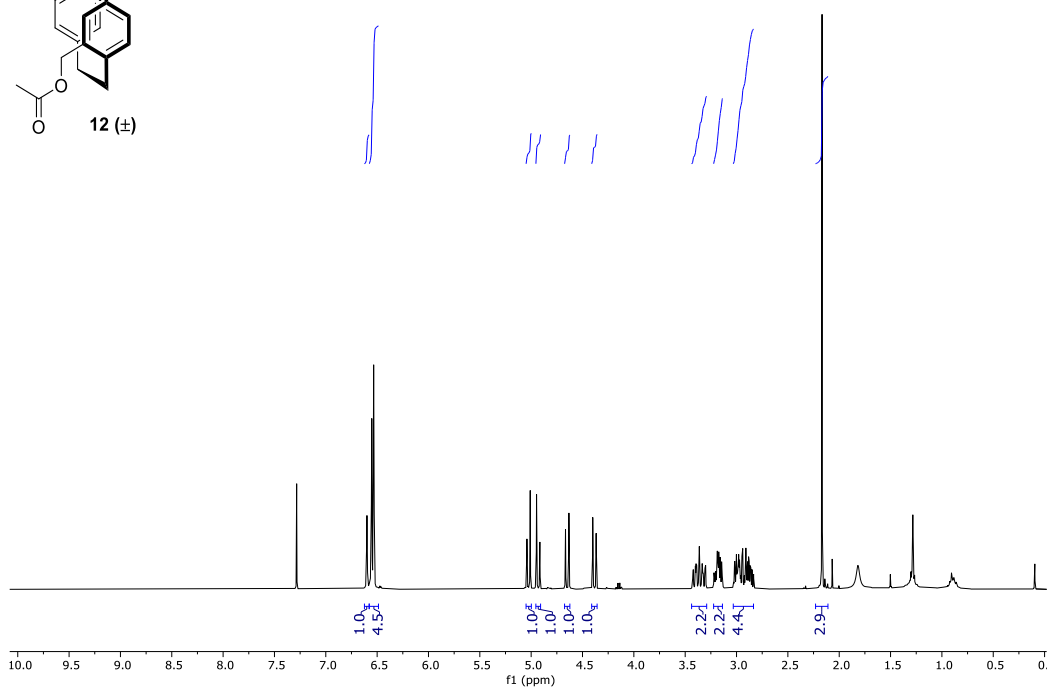
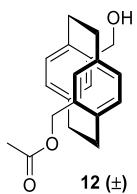


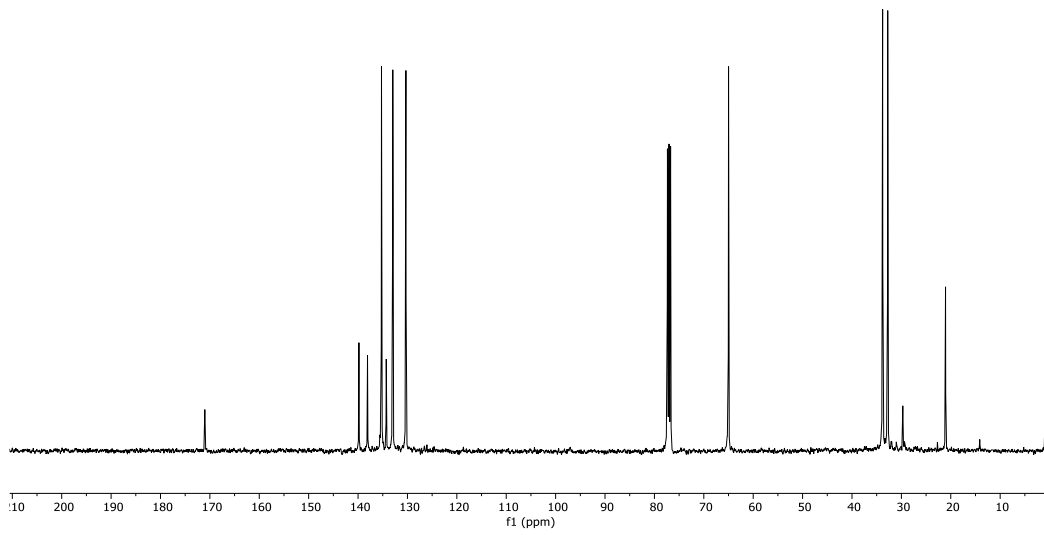
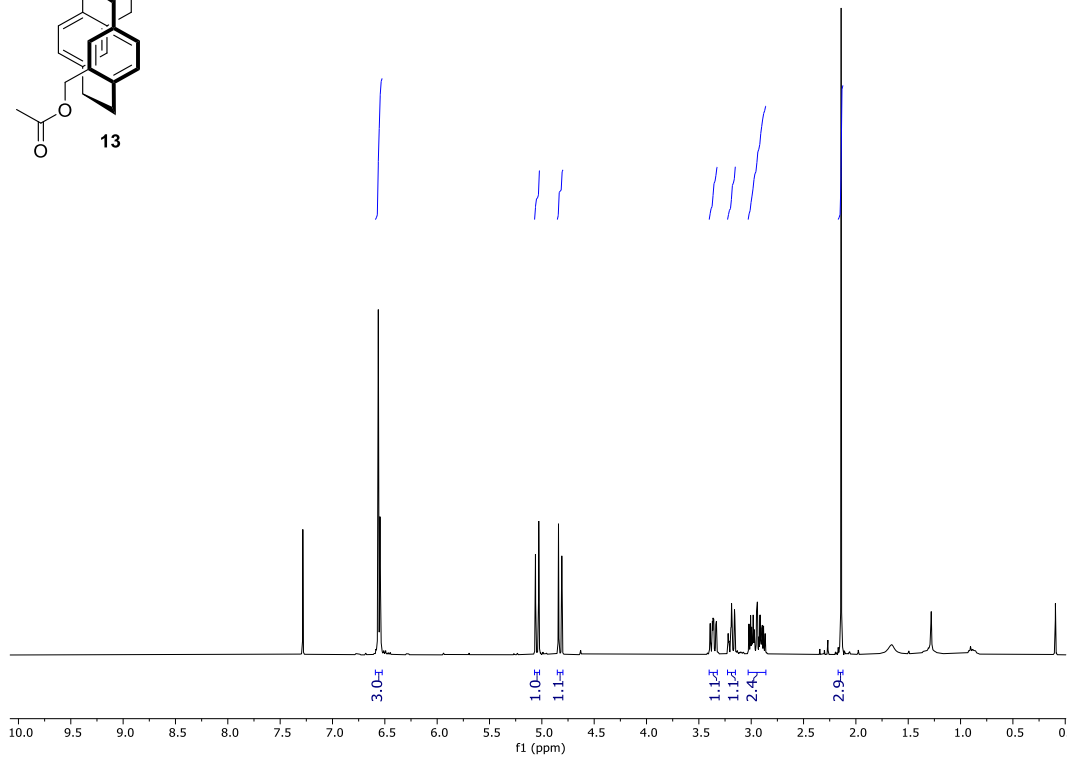
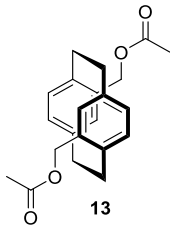














# ERANSKINAK 3: IG

