



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE AMBIENTALI (XXI CICLO)**

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA:

Preparazione di antiossidanti a struttura catecolica e di prodotti di interesse biologico di ossifunzionalizzazione benzilica da sostanze fenoliche naturali con sistemi biomimetici (IBX) ed enzimatici (laccasi/HBT).

Sigla del settore scientifico-disciplinare: CHIM/06

Coordinatore: Prof. Maurizio Petruccioli

Tutor: Dott.ssa Roberta Bernini

Dottoranda: Fernanda Crisante

*A tutti i miei compagni di viaggio
A coloro che conservano una parte di me nel loro cuore
e che io custodisco nel mio.*

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 LE SOSTANZE ORGANICHE NATURALI.....	1
1.1.1 I metaboliti secondari.....	1
1.1.2 I composti fenolici.....	2
1.1.3 Ruolo dei fenoli in natura.....	10
1.2 FENOLI NATURALI E SCARTI AGROALIMENTARI.....	12
1.2.1 Scarti provenienti dalla lavorazione delle olive.....	12
1.2.2 Scarti provenienti dalla lavorazione del vino.....	13
1.3 ATTIVITÀ BIOLOGICA DI POLIFENOLI NATURALI.....	15
1.3.1 L'attività antiossidante.....	17
1.4 LA FUNZIONE CATECOLICA.....	20
1.5 ANTIOSSIDANTI SINTETICI.....	23
1.6 UTILIZZO DI METODOLOGIE CHIMICHE OSSIDATIVE NELLA SINTESI DI MOLECOLE FENOLICHE BIOATTIVE	24
1.6.1 Reazioni di ossidrilazione di composti aromatici: sintesi di catecoli.....	24
1.7 REATTIVI DELLO IODIO IPERVALENTE: IBX E DMP	26
1.7.1 Sintesi e proprietà.....	26
1.7.2 Reattività.....	28
1.8 REAZIONI DI OSSIDAZIONE PER VIA ENZIMATICA.....	32
1.9 LACCASI	32
1.9.1 Reattività.....	34
1.9.2 Sistema Laccasi/Mediatore.....	35
2. SCOPO DELLA RICERCA	39
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	41
3.1 METILAZIONE DEI FLAVONI.....	41
3.1.1 Flavoni metilati: attività biologiche.....	41
3.1.2 Metilazione dei flavonoidi.....	42
3.1.3 Il dimetil carbonato (DMC).....	43
3.1.4 Metilazione di flavoni con DMC	44
3.2 PROTEZIONI SELETTIVE DI FUNZIONI ALCOLICHE	46
3.2.1 Generalità.....	46
3.2.2 Carbossimetilazione selettiva con DMC.....	46
3.2.3 Esterificazioni selettive di ossidril alcolici in DMC.....	53
3.3 MESSA A PUNTO DI PROCESSI OSSIDATIVI CHIMICI CON IBX E DMP: SINTESI DI IDROSSITIROSOLO E DERIVATI A PARTIRE DA TIROSOLO O ALCOL OMOVANILLICO.....	59
3.3.1 L'idrossitirosolo.....	59
3.3.2 Stato dell'arte della produzione di idrossitirosolo.....	60
3.3.3 Sintesi di Idrossitirosolo e derivati lipofili con IBX e DMP	63
3.3.4 SINTESI DI IDROSSITIROSOLO E IDROSSITIROSOLO CARBOSSIMETILATO CON IBX SUPPORTATO SU MATRICE POLIMERICA.	67

3.4 SINTESI DI PICEATANNOLO E DERIVATI LIPOFILI.....	71
3.4.1 Piceatannolo e resveratrol.....	71
3.4.2 Sintesi del piceatannolo e derivati lipofili con IBX.....	72
3.5 REAZIONI DI OSSIDAZIONE SUI FLAVONOIDI.....	75
3.5.1 Relazioni struttura attività nei flavonoidi.....	75
3.5.2 Stato dell'arte sulla sintesi di flavonoidi con struttura catecolica e formazione del doppio legame in posizione 2-3.....	76
3.5.3 Sintesi di flavoni a struttura catecolica con IBX	76
3.5.4 Sintesi di flavoni da flavanoni con IBX.....	79
3.6 ISOCROMANI: SINTESI, OSSIDRILAZIONE E APERTURA D'ANELLO.	83
3.6.1 Generalità.....	83
3.6.2 Stato dell'arte sulla sintesi degli isocromani.....	83
3.6.3 Ossidazioni di isocromani con l'IBX.....	84
3.6.4 Apertura d'anello di 1-arilisocromani con IBX.....	93
3.6.5 Reazione di apertura d'anello con il sistema O ₂ /Laccasi/Mediatore (HBT).....	94
3.7 OSSIDAZIONE ENZIMATICA DI CATECHINE CON IL SISTEMA CATALITICO O ₂ /LACCASI/HBT	98
4. CONCLUSIONI.....	106
5. PARTE SPERIMENTALE.....	108
5.1 STRUMENTI E MATERIALI UTILIZZATI.....	108
5.2 PROCEDURA GENERALE DI METILAZIONE DI FLAVONI E FLAVONOLI CON IL SISTEMA DMC/DBU.....	109
5.3 PROCEDURA GENERALE DI CARBOSSIMETILAZIONE DI OSSIDRILI ALCOLICI.....	109
5.4 MISURE DI ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE CON IL METODO DELLA DPPH.....	110
5.5 PROCEDURA DI SINTESI DEL 3-(2-IDROSSIFENIL)-1-PROPANOLO 33 ¹²⁵	110
5.6 PROCEDURA DI ACETILAZIONE SELETTIVA, CON ANIDRIDE ACETICA E TRICLORURO DI RUTENIO, DI OSSIDRILI ALCOLICI.....	111
5.7 PROCEDURA GENERALE DI ESTERIFICAZIONE SELETTIVA, CON CLORURI ACILICI, DI OSSIDRILI ALCOLICI....	111
5.8 PROCEDURA GENERALE DI IDROLISI BASICA O ACIDA DI GRUPPI ESTEREI O CARBOSSIMETILICI	111
5.9 RIDUZIONE CON SODIOBORIDRURIO.....	112
5.10 OSSIDAZIONE DELL'ACIDO O-IODOBENZOICO AD IBX	112
5.11 REAZIONE DI INSERZIONE OSSIDRILICA DI COMPOSTI FENOLICI CON IBX	112
5.12 REAZIONE DI INSERZIONE OSSIDRILICA DI COMPOSTI FENOLICI CON DMP	113
5.13 REAZIONE DI DEMETILAZIONE OSSIDATIVA DI COMPOSTI FENOLICI CON IBX	113
5.14 REAZIONE DI DEMETILAZIONE OSSIDATIVA DI COMPOSTI FENOLICI CON DMP.....	114
5.15 SINTESI ONE-POT DI IDROSSITIROSOLO CARBOSSIMETILATO.....	114
5.16 REAZIONE DI INSERZIONE OSSIDRILICA DI COMPOSTI FENOLICI CON IBX SUPPORTATO SU POLISTIRENE...114	
5.17 REAZIONE DI DEMETILAZIONE OSSIDATIVA DI COMPOSTI FENOLICI CON IBX SUPPORTATO SU POLISTIRENE	115
5.18 REAZIONE DI RIGENERAZIONE DELL'IBX SUPPORTATO SU POLISTIRENE	115
5.19 SINTESI DI DERIVATI LIPOFILI DI PICEATANNOLO CON IBX	116

5.20 PROCEDURA GENERALE DI INSERZIONE OSSIDRILICA E DEMETILAZIONE OSSIDATIVA DI FLAVONOIDI CON IBX.....	116
5.21 PROCEDURA GENERALE DI METILAZIONE DI OSSIDRILI FENOLICI, ALCOLICI E ACIDI CARBOSSILICI.....	116
5.22 PROCEDURA GENERALE DI ACETILAZIONE DI OSSIDRILI FENOLICI ED ALCOLICI.....	117
5.23 PROCEDURA GENERALE DI DEIDROGENAZIONE DI FLAVANONI CON IBX	117
5.24 PROCEDURA GENERALE DI SINTESI DI ISOCROMANI (OXA-PICTET SPENGLER) DA ACETALDEIDE.....	118
5.25 PROCEDURA GENERALE DI SINTESI DI ISOCROMANI (OXA-PICTET SPENGLER) DA ACETONE.....	118
5.26 PROCEDURA GENERALE DI SINTESI DI ISOCROMANI (OXA-PICTET SPENGLER).....	118
5.27 PROCEDURA GENERALE DI INSERZIONE OSSIDRILICA DI ISOCROMANI CON IBX	119
5.28 PROCEDURA GENERALE DI DEMETILAZIONE OSSIDATIVA DI ISOCROMANI	119
5.29 PROCEDURA GENERALE DI DETERMINAZIONE QUANTITATIVA HPLC DI RESE E CONVERSIONI MEDIANTE IL METODO DELLO STANDARD INTERNO.....	119
5.30 PROCEDURA GENERALE DELL' OSSIDAZIONE DELLA POSIZIONE BENZILETEREA DI 1-ARILISOCROMANI CON IBX.....	120
5.31 PROCEDURA GENERALE DI PROTEZIONE DELLA FUNZIONE CATECOLICA VIA ACETONIDE ¹⁶⁰	121
5.32 <i>Procedura generale di ossidazione con il sistema O₂/Laccasi/HBT</i>	121
6. DATI SPETTROSCOPICI E SPETTRI NMR DI INTERESSE.....	122
7. BIBLIOGRAFIA.....	188

1. INTRODUZIONE

1.1 Le sostanze organiche naturali

La natura è da sempre un'affascinante fonte d'interesse per gli studiosi alla continua ricerca di nuove sostanze. Fin dai tempi più remoti, infatti, l'uomo ha imparato a conoscere, poco a poco, le proprietà medicinali di molte piante e ad utilizzarne foglie, semi, rizomi ed essenze a scopo curativo.

Con il termine "composti naturali" si intende tutte quelle sostanze prodotte da organismi viventi. Esse sono generalmente suddivise in tre ampie categorie:

- metaboliti primari: composti presenti in tutte le cellule che giocano un ruolo fondamentale nel metabolismo e riproduzione. A questa classe appartengono gli acidi nucleici, gli zuccheri e gli aminoacidi.
- metaboliti secondari: composti presenti solo in specifici organismi o gruppi di organismi; sono espressione dell'individualità della specie.
- composti polimerici: esempi sono la cellulosa, la lignina, le proteine che formano la struttura cellulare.

I metaboliti primari esercitano il loro effetto biologico principalmente all'interno della cellula o dell'organismo responsabile della loro produzione.¹ Per i metaboliti secondari nella grande maggioranza dei casi non erano ancora noti né la funzione né i vantaggi apportati all'organismo che li produce; purtroppo vi è attualmente un grande interesse nella loro estrazione da fonti naturali, modificazioni strutturali e studio delle attività biologiche in quanto si è osservato che essi hanno spesso un ruolo ecologico nella regolazione delle interazioni fra piante, microrganismi, insetti e animali. Alcuni, infatti, sono composti tossici prodotti per la difesa dalla predazione; altri sono composti volatili che fungono da attrattori. In genere si assume che i metaboliti secondari svolgono un ruolo vitale che concorre al benessere dell'organismo che li produce.²

1.1.1 I metaboliti secondari

I metaboliti secondari sono caratterizzati da un'enorme variabilità strutturale, presentano centri chirali e diversi gruppi funzionali che ne determinano la specifica attività. Tuttavia, la maggior parte di questi composti appartiene ad un numero limitato di famiglie, ognuna delle quali con particolari caratteristiche strutturali derivanti dalla loro biosintesi.¹

Tali composti derivano dai metaboliti primari. Infatti, le sostanze provenienti da processi fondamentali quali la fotosintesi, la glicolisi ed il ciclo di Krebs possono originare intermedi

biosintetici denominati “mattoni biosintetici”. Il numero di mattoni biosintetici necessari a costruire una grande varietà di composti è sorprendentemente piccolo; quelli di gran lunga più importanti nella biosintesi di metaboliti secondari derivano da acetil coenzima A (acetil CoA), acido shikimico e mevalonico le cui formule di struttura sono riportate in **Figura 1**.



Figura 1. Struttura chimica dei principali “mattoni biosintetici”.

La via biosintetica dell’acetil-CoA conduce alla formazione di alcuni fenoli, prostaglandine e antibiotici macrolidi, oltre a una gamma di acidi grassi e loro derivati. La via dello shikimato genera un’ampia gamma di fenoli derivati dell’acido cinnamico, lignani e alcaloidi. La via del mevalonato infine, è responsabile della biosintesi di metaboliti terpenici e steroidici.

E’ importante notare che i metaboliti secondari possono essere sintetizzati anche combinando mattoni biosintetici dello stesso tipo o diversi; questo ne accresce la varietà strutturale.

Tutte le sequenze di reazioni delle vie biosintetiche, tranne pochissime eccezioni, sono catalizzate da enzimi, molecole proteiche che facilitano la modificazione chimica dei substrati grazie alla loro capacità di legarli specificamente.²

Le principali classi di metaboliti secondari sono :

- polichetidi e acidi grassi
- fenoli
- terpeni e steroidi
- fenil propanoidi
- alcaloidi
- aminoacidi e peptidi specializzati
- carboidrati specializzati.¹

In questo lavoro di tesi, l’attenzione è stata rivolta in particolare ai composti fenolici.

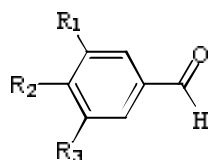
1.1.2 I composti fenolici

Il termine “composti fenolici” comprende un elevato numero di metaboliti secondari caratterizzati dalla presenza, nella loro struttura chimica, di un anello aromatico con uno o più

sostituenti ossidrilici. In alcuni casi la funzione ossidrilica è metilata o glicosilata. Inoltre, possono essere presenti altri gruppi funzionali che influenzano le loro proprietà chimico-fisiche. Come già detto, tali composti derivano dalla via biosintetica dell'Acetil-CoA o dell'acido shikimico. Una caratteristica distintiva di un sistema aromatico derivante dall'acetato è che i sostituenti ossigenati si trovano legati in maniera alternata ad atomi di carbonio del ciclo. La presenza di sostituenti in *meta* distingue, dunque, questi composti da quelli derivanti dell'acido shikimico. Sebbene un cospicuo numero di sostanze fenoliche sia stato ritrovato in organismi animali, la presenza della componente fenolica è una caratteristica peculiare dei tessuti vegetali. Alcune migliaia di molecole aventi struttura polifenolica, infatti, sono state identificate in piante superiori, e alcune centinaia in piante commestibili. Queste molecole sono generalmente coinvolte nella difesa dell'organismo da radiazioni ultraviolette o da aggressioni da parte di agenti patogeni. I composti fenolici potrebbero essere divisi in 10 classi generali in funzione del numero di anelli fenolici che essi contengono e degli elementi strutturali che legano questi anelli gli uni agli altri, e ne sono stati descritti più di 8000. Quelli più abbondanti nel regno vegetale sono gli acidi fenolici, i lignani, gli stilbeni e i flavonoidi; tra questi composti, gli acidi fenolici e i flavonoidi rappresentano rispettivamente il 30% e il 60% dei polifenoli totali assunti con la dieta mediterranea.^{3,4}

Gli acidi fenolici comprendono due classi: quelli derivanti dall'acido benzoico e quelli derivanti dall'acido cinnamico (**Figura 2**).

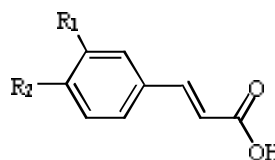
Acidi idrossibenzoici



$R_1=R_2=OH, R_3=H$: **Acidoprotocatechico**

$R_1=R_2=R_3=OH$: **Acidogallico**

Acidi idrossicinnamici



$R_1=OH, R_2=H$: **Acidocumarico**

$R_1=R_2=OH$: **Acido α -lipoico**

$R_1=OCH_3, R_2=OH$: **Acidoferulico**

Figura 2. Strutture chimiche degli acidi fenolici più abbondanti in natura.

Il contenuto di acido benzoico nelle piante commestibili è generalmente molto basso ad eccezione di alcune specie (frutti rossi, ravanella nera e cipolle) che ne contengono concentrazioni di alcune decine di milligrammi per chilogrammo di peso fresco.⁵ Il tè è un'importante fonte di acido gallico (più di 4.5 g/Kg di peso fresco).⁶ Gli acidi idrossibenzoici sono monomeri di composti a struttura più complessa quali i tannini idrolizzabili; i

gallotannini, per esempio, sono ritrovati nel mango, gli ellagitannini in alcuni frutti rossi come fragole, lamponi, e more.⁷ Nelle piante, l'acido 4-idrossibenzoico si forma attraverso la degradazione della catena laterale dell'acido cinnamico il quale è invece formato dalla deamminazione della fenilalanina. Altri acidi cinnamici sono ottenuti da ulteriori reazioni di ossidrilazione e metilazione che, in sequenza, costruiscono la disposizione dei sostituenti tipica della via dello shikimato, cioè l'ossigenazione in posizione *orto*.² I più comuni sono: acido *p*-cumarico, caffeico, ferulico e sinapico (**Figura 2**). Possono esistere sia in forma *cis* sia in forma *trans*, interconvertibili per effetto della luce UV. Essi si ritrovano nelle piante d'olivo,⁸ nell'orzo,⁹ nella crusca,¹⁰ nei semi di girasole,¹¹ nella farina di colza.¹² Raramente si trovano in forma libera; infatti, sono per lo più derivati glicosilati o esteri di acido chinico, shikimico o tartarico. Gli acidi caffeico e chinico si combinano a formare l'acido clorogenico (**Figura 3**) presente in molti tipi di frutti ed in alte concentrazioni nel caffè (70-350 mg per singola tazza).¹³ L'acido caffeico, in entrambe le forme libera ed esterificata, è generalmente il più abbondante acido fenolico e rappresenta tra il 75% e il 100% del contenuto totale di acidi idrossicinnamici di molti frutti.

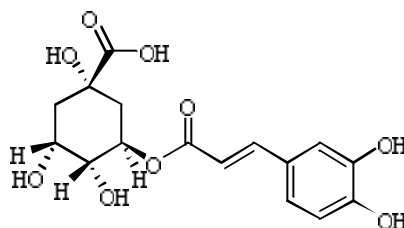


Figura 3. Struttura chimica dell'acido clorogenico.

I lignani sono formati da due unità di 2-fenil propano (**Figura 4**); costituiscono i monomeri della lignina, un materiale polimerico che rinforza le pareti delle cellule vegetali fungendo da matrice per le microfibre di cellulosa. La formazione dei lignani e la biosintesi della lignina sono catalizzati da enzimi differenti, e una conseguenza di questo è che i lignani naturali sono enantiomericamente puri perché sono prodotti da un accoppiamento controllato stereochimicamente, mentre le perossidasi che formano la lignina generano prodotti racemici attraverso un processo d'accoppiamento casuale. La maggiore fonte di lignani nella dieta è il seme di lino che contiene in prevalenza secoisolariciresinolo (> 3.7 g/kg di peso secco) e minori quantità di matairesinolo. Tracce di tali lignani si riscontrano anche in altri cereali, frutta e alcuni ortaggi.¹⁴

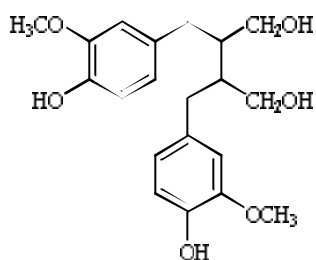
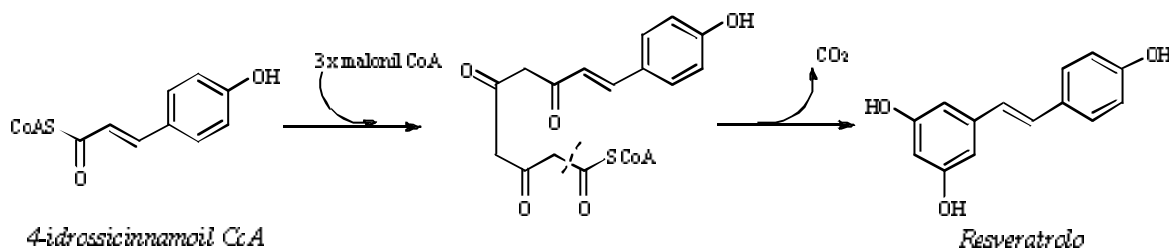


Figura 4. Struttura chimica del secoisolariciresinolo.

Gli stilbeni sono prodotti biogeneticamente dalla combinazione della via dell'acetato e dello shikimato come, ad esempio, riportato nello **Schema 1** per il resveratrolo,² un composto presente in natura nelle due forme isomeriche *cis* e *trans*, con la forma *trans* più comune e con maggiore attività biologica.¹⁵ Fu identificato per la prima volta nell'uva da vino *Vitis vinifera* nel 1976, ed oggi è stato ritrovato in più di 70 specie di piante. Tra le maggiori fonti di resveratrolo si ricorda la *Polygonum cuspidatum*, un'erba usata nelle medicine tradizionali cinese e giapponese. Le fonti primarie nella dieta umana sono le arachidi, l'uva, e il vino.¹⁶



Schema 1. Esempio di via biogenetica di stilbeni: il resveratrolo.

I flavonoidi (**Figura 5**) sono la più ampia classe di polifenoli presenti in natura, ne sono stati descritti più di 5000. Essi hanno una struttura comune costituita da due anelli aromatici A e B e da un anello benzopiranic C, possono a loro volta essere divisi in 6 sottoclassi in funzione del tipo di eterociclo coinvolto: flavonoli, flavoni, isoflavoni, antocianidine e flavanoli (catechine e proantocianidine).

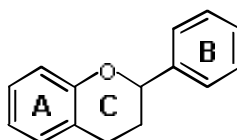
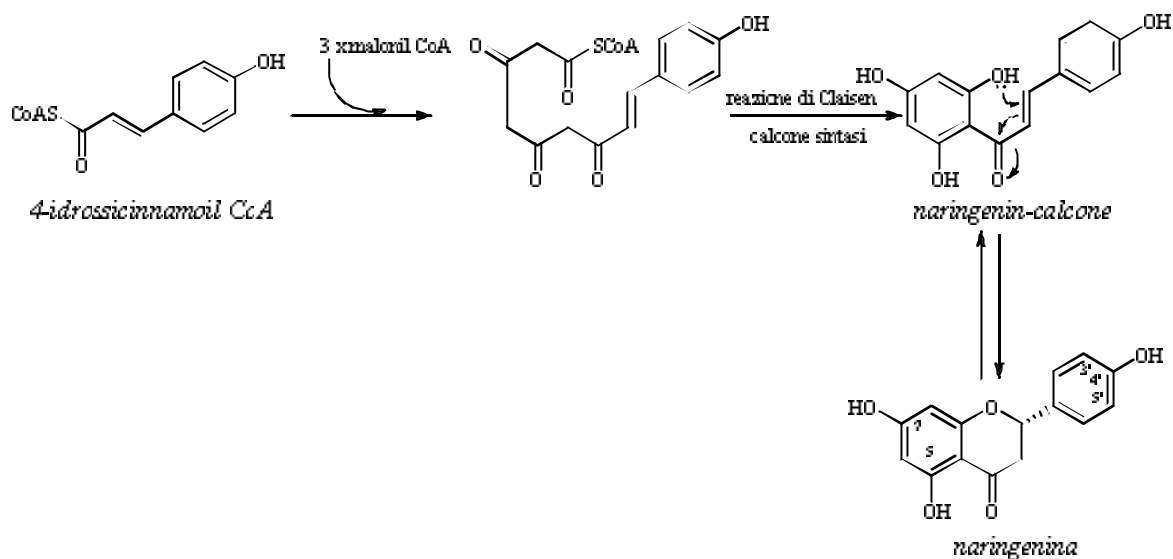


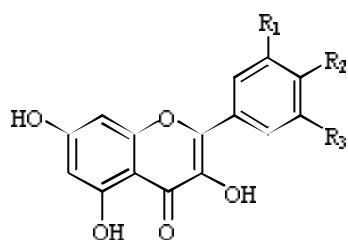
Figura 5. Struttura chimica base di flavonoidi.

Analogamente agli stilbeni, anche i flavonoidi sono un esempio di vie biogenetiche miste. I loro precursori sono i calconi; l'anello A deriva da una molecola di resorcinolo o floroglucinolo sintetizzati dalla via dell'acetato e possiede, infatti, i sostituenti ossigenati nelle caratteristiche posizioni 5 e 7. Per attacco nucleofilo tipo Michael dell'OH sul chetone α,β -insaturo si ottiene l'anello B, a sua volta derivante dalla via dello shikimato, normalmente ossidrilato, infatti, nelle posizioni adiacenti 3', 4', 5' (**Schema 2**).



Schema 2. Esempio di biosintesi di un flavonoide.

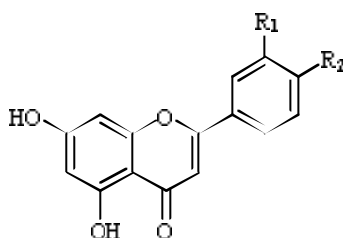
I flavonoidi più abbondanti nel regno vegetale sono i flavonoli (anello C: 3-idrossi piran-4-one **Figura 6**).¹⁷ Tra questi il più rappresentativo è la quercetina presente in molti frutti, ortaggi e bevande. E' particolarmente abbondante nelle cipolle (0.3 mg/g di peso fresco) e nel tè (10-15 mg/l). E' solitamente presente sottoforma di *O*-glicoside; pertanto sono stati identificati più di 170 differenti quercetina-glicoside, anche se il D-glucosio è il residuo zuccherino più frequente.¹⁸ I flavonoli si accumulano nei tessuti esterni, poiché la loro biosintesi è stimolata dalla luce.



$R_2=OH, R_1=R_3=H$; **Kaempferolo**
 $R_1=R_2=OH, R_3=H$; **Quercetina**
 $R_1=R_2=R_3=OH$; **Miricetina**

Figura 6. Struttura chimica di alcuni flavanoli.

I flavoni (**Figura 7**) sono molto meno comuni, rispetto ai flavanoli, nella frutta e verdura. Si ritrovano soprattutto come glucosidi di luteolina e apigenina. Le uniche fonti commestibili importanti identificate sono il prezzemolo e il sedano. Cereali come miglio e frumento contengono C-glucosidi di flavoni.



$R_1=H, R_2=OH$; **Apigenina**
 $R_1=R_2=OH$; **Luteolina**

Figura 7. Struttura chimica di alcuni flavoni.

La buccia di agrumi contiene grandi quantità di flavoni polimetossilati: tangeretina, nobiletina e sinensetina (> 6.5 g/l di olio essenziale di mandarino), che risultano essere i flavonoidi con maggior carattere idrofobico (**Figura 8**).

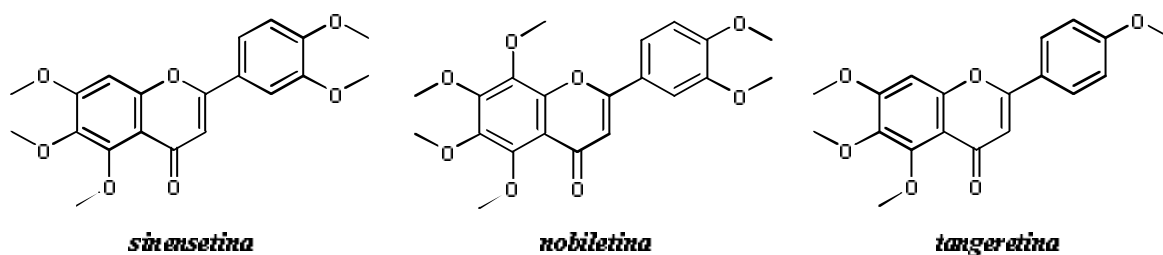


Figura 8. Struttura chimica di alcuni flavoni polimetossilati.

I flavanoni (**Figura 9**), sono presenti nei pomodori, in alcune piante aromatiche come la menta, e ad alte concentrazioni negli agrumi. I principali agliconi sono la naringenina nei pompelmi, l'esperetina nelle arance e l'eriodictiolo nei limoni. I flavanoni sono generalmente glicosilati da un disaccaride in posizione 7, o un neoesperidosio che conferisce il sapore amaro (esempio: con la naringenina nei pompelmi), o un rutinosio che è insapore.³ Un bicchiere di succo d'arancia contiene tra i 40 e i 140 mg di flavanoni glicosilati.¹⁹

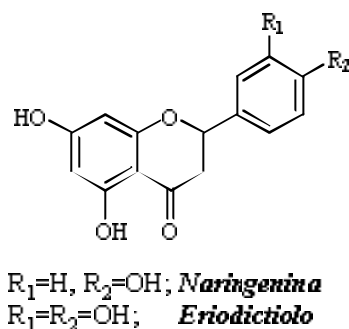


Figura 9. Struttura di flavanoni.

Gli isoflavoni (**Figura 10**) sono composti simili strutturalmente agli estrogeni. Sebbene non siano steroidi, hanno gruppi ossidrilici in posizione 7 e 4' in una configurazione spaziale analoga a quelli presenti nell'estradiolo. Questa caratteristica conferisce proprietà pseudo-ormonali agli isoflavoni, inclusa la capacità di legarsi ai recettori degli estrogeni; per questa ragione sono classificati come fitoestrogeni. Gli isoflavoni si ritrovano quasi esclusivamente nelle piante leguminose quali la soia.³

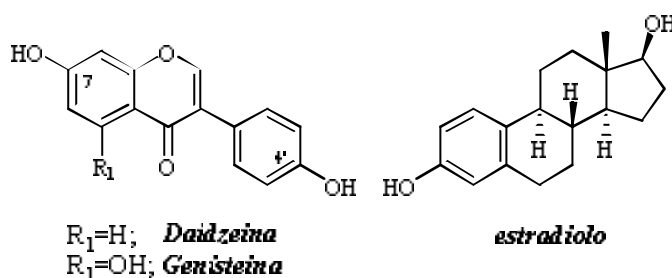
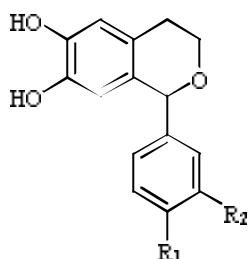


Figura 10. Struttura chimica di alcuni isoflavoni ed estradiolo.

I flavanoli possono essere in forma monomerica (catechine) o polimerica (proantocianidine). Essendo presenti due centri chirali (C2 e C3), sono possibili quattro stereoisomeri. Tra questi,

Infine, è nata una classe di polifenoli di nuova generazione dalla bio-genetica del

Recentemente, è stata identificata un'altra classe di fenoli naturali nell'olio extra-vergine d'oliva, gli idrossisocromani (**Figura 13**).²¹ Isocromani e derivati sono composti presenti in natura come parti di complesse molecole costituenti ad esempio la lignina di pino (*Pinus taeda* L.).²²



$R_1=R_2=H$: **1-fenil-6,7-diidrossisocromano**

$R_1=OH$, $R_2=OCH_3$: **1-(4'-idrossi-3'-metossi)fenil-6,7-diidrossisocromano**

Figura 13. Struttura chimica di idrossisocromani naturali.

1.1.3 Ruolo dei fenoli in natura

L'organismo vegetale nel corso della sua evoluzione è riuscito ad instaurare relazioni dinamiche con animali, altre piante e microrganismi. Esso, infatti, non essendo dotato di mobilità, in quanto sessile, non può sfuggire fisicamente da condizioni sfavorevoli al suo sviluppo e dai suoi predatori; per questo motivo ha dovuto sviluppare nel corso della sua evoluzione difese chimiche che sono svolte essenzialmente dai metaboliti secondari.

La classe dei composti fenolici non è distribuita uniformemente tra le diverse famiglie vegetali e all'interno di una stessa famiglia essi presentano, inoltre, una notevole variabilità di struttura. Queste caratteristiche indicano che i composti fenolici non hanno un unico ruolo fisiologico; presentano, infatti, molteplici attività biologiche che sono influenzate dal numero e dalla natura dei gruppi sostituenti presenti sulla struttura base. Per esempio, la presenza di ossidrili fa sì che i composti fenolici possano reagire con specifici gruppi recettori principalmente per mezzo di legami idrogeno, o partecipare a reazioni di ossidazione che permettono loro di svolgere precise funzioni fisiologiche all'interno della pianta che vanno ben al di là di una semplice azione di detossificazione e di accumulo nel vacuolo. I pigmenti fenolici, oltre a contribuire al colore di fiori e frutti, possono fungere da odori che attirano sui fiori gli impollinatori. I fiori, infatti, sono il sito della riproduzione sessuale nelle piante da fiore, ed esplicano la loro attrazione sugli impollinatori anche ricorrendo a segnali odorosi che molto spesso sono costituiti da una complessa miscela di composti appartenenti a diverse

classi chimiche. E' stato dimostrato che alcuni composti fenolici svolgono un ruolo determinante nel processo di crescita della pianta agendo, ad esempio, da cofattori enzimatici. Si è osservato, ad esempio, che semi di *Melilotus alba* non in grado di germinare contengono quantità elevate di cumarina libera: l'allontanamento o la degradazione di tale molecola fa scomparire l'effetto inibitore. Acidi *p*-idrossicinnamici, in particolare acido ferulico ed acido *p*-cumarico, sono costituenti delle pareti cellulari di molte angiosperme e oltre a fornire i precursori per la sintesi della lignina, influenzano il processo di crescita cellulare. Ricerche mirate all'isolamento ed all'identificazione di composti che attivano i pulvini delle foglie, hanno dimostrato che nell'*Acacia*, due dei cosiddetti fattori di movimento periodico delle foglie sono i β -glicosidi dell'acido gallico; in un'altra specie, l'*Oxalis stricta*, accanto ad un derivato dell'acido gallico è stato identificato un derivato dell'acido 3,4-diidrossi benzoico. Nella *Mimosa pudica* è stato identificato un glicoside (5-O- β -L-apio-L-furanoside) dell'acido gentisico, il quale è il responsabile della chiusura e del successivo ripiegamento verso il basso delle foglie per risposta ad uno stimolo esterno. Infine, numerosi dati sperimentali dimostrano che i composti fenolici svolgono un ruolo importante nelle interazioni tra la pianta e l'ambiente circostante e che spesso il loro significato debba, quindi, essere visto in relazione ad altri organismi presenti nello stesso habitat. Ad esempio, è stato recentemente osservato che i flavonoidi svolgono un ruolo importante nel processo di azotofissazione nelle piante superiori. Infatti, i batteri appartenenti ai generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ed *Azorhizobium*, mostrano una forte specificità nei confronti di alcuni flavonoidi rilasciati dalle radici delle leguminose. Alcune classi di sostanze fenoliche presentano un'attività antimicrobica in grado di contrastare efficacemente infezioni fungine, batteriche o virali.²³ Tale attività è manifestata sia da fenoli preesistenti che da loro metaboliti che si formano nei tessuti vegetali in seguito all'instaurarsi del processo infettivo (fitoalessine).

In conseguenza della loro ubiquitarietà nel regno vegetale, in particolare nelle piante edibili, i derivati fenolici si ritrovano naturalmente nella composizione dei prodotti di scarto, sia liquidi sia solidi, di numerosi impianti di lavorazione agro-alimentare.

1.2 Fenoli naturali e scarti agroalimentari

Il settore agroalimentare costituisce uno dei comparti produttivi a cui sono attribuite elevate produzioni di rifiuti speciali, in massima parte non pericolosi, solitamente avviati ad operazioni di recupero ai sensi dell'art. 7 del D. Lgs. 22/97. A livello europeo gli scarti agricoli, stimati nell'ordine di 250 milioni di ton/anno, rappresentano un significativo potenziale per lo sviluppo dell'industria bioenergetica.²⁴ Nell'area del Mediterraneo, quelli di maggiore rilevanza sono legati alla lavorazione dei cereali, della vite e delle olive. Il problema del loro recupero e dello smaltimento si propone sia a livello economico che ambientale; è quindi necessaria un'attenta politica di gestione integrata ed interdisciplinare, indispensabile a garantire la sostenibilità dello smaltimento attraverso varie forme di recuperi successivi ed esaustivi.

1.2.1 Scarti provenienti dalla lavorazione delle olive

Il settore oleario è molto sviluppato nei paesi dell'area del Mediterraneo, i quali producono circa il 98% del quantitativo mondiale di olio.²⁵ In Italia, negli ultimi decenni, l'industria di prima trasformazione delle olive ha avuto una grande espansione, soprattutto nel meridione, nelle regioni del centro e in Liguria. Ogni anno, nel nostro paese, durante la stagione produttiva, circa 6000 frantoi lavorano in media una quantità di 25 milioni di quintali di olive con una resa media in olio del 20%. Dalla lavorazione delle olive, finalizzata alla produzione di olio, si ottengono sottoprodotti quali sanse e acque di vegetazione (AV). Dalle sanse si recupera, mediante estrazione con solventi, l'olio residuo (olio di sansa). Le sanse disoleate sono utilizzate come fertilizzante o combustibile alternativo.²⁶ Le AV, invece, costituiscono un rilevante problema economico per la loro composizione chimica, per l'enorme massa globale di reflu prodotta ogni anno ($3 \times 10^7 \text{ m}^3$) e per le difficoltà organizzative correlate al numero e alla distribuzione geografica dei frantoi.²⁷ Inoltre, la loro composizione chimica presenta un'ampia variabilità dipendente dalle condizioni climatiche, geografiche, dalla varietà delle olive, dall'impiego e dal tipo di fertilizzanti, dal grado di maturazione e conservazione delle drupe, dall'età della pianta e dal sistema di estrazione dell'olio. Essa, inoltre, può essere modificata anche dalla miscelazione con le acque di lavaggio dell'impianto oleario che possono contenere saponi e detergenti. Mediamente, le AV contengono l'83% di acqua, il 15% di sostanza secca e il 2% di sali minerali.²⁸ Fra i componenti organici, prevalgono i carboidrati, sia come zuccheri semplici (glucosio, fruttosio, raffinosio, mannosio e xilosio) che complessi (cellulosa e pectine); gli acidi organici (acetico, tartarico, lattico e malico) che rendono il pH delle AV leggermente acido ($\text{pH}=4.9\text{-}6.5$); le sostanze azotate, tra

le quali numerosi aminoacidi (in particolar modo acido glutammico e prolina) che conferiscono alle AV un notevole potere tamponante verso gli acidi e le basi. Inoltre, nelle AV sono presenti anche composti mono e polifenolici, sostanze in grado di inibire i processi metabolici di alcune specie di microrganismi e responsabili della tossicità del refluo. Tra questi, vi sono fenoli semplici, flavonoidi, catechine (nelle olive scure anche antocianosidi e antocianine)²⁹ e polimeri originati dall'accoppiamento ossidativo dei fenoli semplici (pigmenti catecolmelaninici). I componenti fenolici più importanti delle AV sono idrossitirosolo, tirosolo, acido 3,4-diidrossifenilacetico, acido 4-idrossifenilacetico, acido caffeico, acido *p*-cumarico e acido ferulico (**Tabella 1**).³⁰

Fenoli contenuti nelle AV	Concentrazione (mg/l)
Idrossitirosolo	1433.4
Tirosolo	851.0
Acido 3,4-diidrossifenil acetico	87.9
Acido 4-idrossifenil acetico	274.0
Acido caffeico	321.0
Acido <i>p</i> -cumarico	298.0
Acido ferulico	95.0

Tabella 1. Principali composti fenolici a basso P.M. contenuti nelle AV.

1.2.2 Scarti provenienti dalla lavorazione del vino

Secondo l'“Office International de la Vigne et du Vin”, un organismo intergovernativo di tipo tecnico e scientifico fondato nel 2004, la produzione globale di vino risulta essere di circa 267 milioni di ettolitri; quella italiana costituisce il 20% di quella mondiale e il 33% di quella europea pari a circa 155 milioni di ettolitri.

Gli scarti derivanti dalla produzione del vino sono principalmente costituiti da vinacce e fecce. Con il termine vinaccia si intende per lo più la parte solida derivante dalla pigiatura dell'uva, in particolar modo le bucce. Indicativamente per 100 Kg di uva si ricavano 80-85 Kg di mosto, 9-10 Kg di vinaccia (intesa come bucce), 3-4 Kg di raspi e 3-4 Kg di vinaccioli. Nell'uva, e quindi nei suoi scarti, sono presenti sostanze polifenoliche per lo più localizzate nelle frazioni solide. Poiché, anche in questo caso, la formazione dei polifenoli è strettamente collegata alle condizioni climatiche, il contenuto di biofenoli nell'uva può variare sensibilmente. In generale, composti chimici che costituiscono la vinaccia sono più di 300 e

sono più numerosi di quelli del vino. Le sostanze polifenoliche delle uve sono derivati del flavone e dell'acido gallico o acido protocatechico,³¹ gli antociani, i tannini e il *trans*-resveratrolo. Un'utilizzazione di notevole interesse per le vinacce rosse è l'estrazione degli antociani, coloranti naturali particolarmente richiesti dall'industria alimentare e da quella cosmetica dopo il divieto dell'impiego dei coloranti rossi di origine sintetica (Direttiva 94/36/EC del 30/06/1994). I tannini sono molecole polifenoliche che hanno la tendenza a combinarsi con proteine, enzimi ed altri polimeri e si ritrovano in particolare nei raspi, nelle bucce (quelli ad alto peso molecolare) e nei vinaccioli (quelli a basso peso molecolare). Anche questa tipologia di scarti, visti i volumi prodotti, sono preziose fonti di biofenoli. Il recupero dei biofenoli è il primo step per i successivi stadi fermentativi di trattamento della biomassa per la produzione di biogas. I processi anaerobici sono generalmente inibiti dalla presenza di polifenoli ed in particolare i batteri acetogenici e metanogenici sono sensibili a concentrazioni di acido caffeico >0.25 g/l e di acido cumarico >0.12 g/l.³²

Studi relativi ai potenziali benefici dei fenoli naturali sulla salute umana, valorizzano il loro recupero dai reflui agroindustriali poiché essi rappresentano una fonte di intermedi utilizzabili come chemicals ad alto valore aggiunto. Tali prodotti possono essere impiegati in vari settori industriali che includono la plastica e gli elastomeri, i lubrificanti, gli oli e gli additivi per i combustibili, e l'alimentare. Particolare interesse è legato, inoltre, alla loro utilizzazione nel mercato dei prodotti per la salute dell'uomo sia come nutraceutici che come cosmeceutici. L'attuale mercato è stimato a livello mondiale in circa 1.4 miliardi di dollari USA.

1.3 Attività biologica di polifenoli naturali

Prima del XX° secolo, estratti grezzi e semi-puri di piante, animali, microbi e minerali rappresentavano gli unici preparati di medicazione utilizzabili per la cura di persone e animali domestici. Con la formulazione della teoria di azione dei farmaci nel corpo umano mediante interazioni con macromolecole biologiche (proteine e acidi nucleici nella maggior parte dei casi) si rivoluzionò il pensiero nell'uso dei farmaci. Gli estratti naturali non erano più “polveri di vita”, ma si chiarì il concetto che specifici composti all'interno dell'estratto erano i responsabili dell'attività farmacologica. Pertanto, vennero isolati molti principi attivi, fu studiata la loro struttura e chiarito il loro meccanismo di azione.

Negli ultimi 15 anni si è sviluppata notevolmente la ricerca riguardante gli effetti sulla salute umana dei polifenoli naturali assunti nella dieta. Fino alla metà degli anni '90, i composti della dieta di maggiore interesse erano soprattutto vitamine, carotenoidi e minerali. La ricerca sui flavonoidi e altri polifenoli in relazione ai loro effetti sulla prevenzione di alcune patologie ha avuto grande sviluppo solo in seguito. I principali fattori che hanno ritardato la ricerca su tali molecole risiedono soprattutto nella loro grande diversità e nella complessità delle loro strutture chimiche.

La ricerca attuale ha evidenziato il forte contributo dei polifenoli nella prevenzione di patologie cardiovascolari, cancro, osteoporosi, diabete mellito e di disturbi neurodegenerativi quali il morbo di Parkinson e di Alzheimer.³³

I composti fenolici assumono una grande importanza anche per il ruolo che svolgono negli alimenti soprattutto a livello nutrizionale. Essi contribuiscono all'aroma ed al sapore di molti cibi e bevande; sono coloranti naturali, direttamente presenti negli alimenti o usati come additivi dall'industria alimentare; esplicano attività antimicrobica ed antiossidante favorendone la conservazione.³⁴ D'altra parte, se a basse concentrazioni proteggono gli alimenti dal deterioramento ossidativo e microbiologico, ad alte concentrazioni possono interagire con proteine, carboidrati, minerali contribuendone al sapore amaro ed astringente.³⁵

L'attività biologica dei polifenoli è determinata da diversi fattori; i più importanti sono:

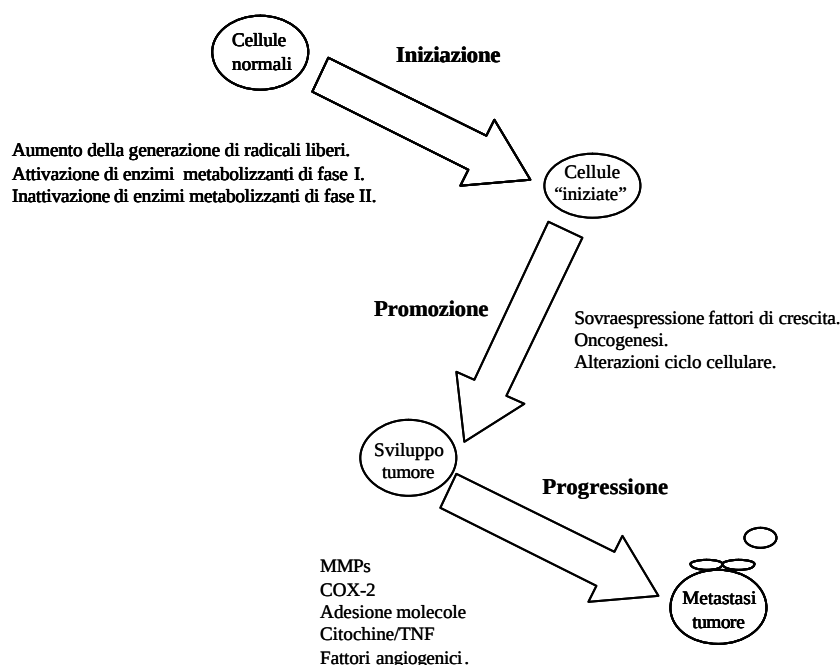
- la diretta interazione con recettori e enzimi coinvolti nella trasduzione del segnale che può modificare lo stato redox delle cellule e dare il via a una serie di reazioni redox-dipendenti;³⁶
- le interazioni con recettori estrogenici con conseguenti effetti nelle funzioni endocrine. Uno dei principali esempi è rappresentato dall'interazione degli isoflavoni della soia con i recettori degli estrogeni che spiega il loro ruolo nella prevenzione delle principali manifestazioni della menopausa;³⁷

- la ben nota attività antiossidante e di scavenger di radicali liberi con le quali vengono protette le cellule da danni ossidativi;
- l'attività pro-ossidante che può indurre l'apoptosi di cellule tumorali e prevenire lo sviluppo di tumori.³⁸

Un interessante esempio delle numerose attività dei polifenoli è descritto in una recente review sul loro ruolo nella prevenzione e terapia del cancro.

La carcinogenesi è generalmente riconosciuta come un complesso processo in cui si verificano alterazioni molecolari e cellulari. Semplificando, si possono considerare tre fasi fondamentali nello sviluppo e progressione della malattia (**Schema 3**):

- 1) *iniziazione*: è una fase rapida che comprende l'esposizione o l'assorbimento e l'interazione di cellule (specialmente il DNA), con un agente carcinogenico.
- 2) *promozione*: è una fase relativamente lunga; le cellule anomale persistono, si replicano. In questa fase si può originare una colonia di cellule pre-neoplastiche.
- 3) *progressione*: è la fase finale in cui si ha una incontrollata crescita delle cellule che comporta la graduale conversione di cellule "pre-maligne" a neoplastiche, un aumento del potenziale di invasività e metastasi e la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi).



Schema 3. Fasi di sviluppo della carcinogenesi.

Durante queste fasi vengono prodotte proteine chiave relative alla difesa antiossidante delle cellule, alla proliferazione cellulare, alla sopravvivenza delle vie di trasduzione etc. I

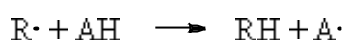
polifenoli possono intervenire su tutti gli stadi della carcinogenesi con vari meccanismi di azione. Possono, infatti, agire come scavenger per bloccare gli agenti carcinogenici (soprattutto radicali liberi) o arrestare il ciclo cellulare mediante l'azione che alcuni di essi esplicano sulla produzione di proteine chiave o indurre l'apoptosi delle cellule tumorali o esplicare azione angiogenica. Il potenziale effetto anti-carcinogenico dei composti polifenolici sembra inoltre essere molto specifico; la citotossicità dei fenoli è maggiore per le linee cellulari cancerogene rispetto a quelle normali.³⁹ Di particolare interesse è l'attività antiossidante dei composti fenolici.

1.3.1 L'attività antiossidante

In ogni cellula dell'organismo umano avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per la produzione di energia. Tuttavia, da tali processi di ossidazione, vitali per la cellula, si producono dei prodotti "di scarto" potenzialmente dannosi: i radicali liberi, ossia molecole o frammenti molecolari contenenti uno o più elettroni spaiati nell'orbitale atomico o molecolare più esterno.⁴⁰ L'energia corrispondente a questa configurazione conferisce a tali specie un'elevata instabilità e reattività, a causa delle quali si innescano reazioni autocatalitiche che si propagano a catena. I radicali liberi sono continuamente prodotti nell'organismo umano e sono controllati da enzimi endogeni (superossido dismutasi, glutazione per ossidasi, catalasi, etc.). Quando si verifica un'elevata produzione di queste specie, per effetto di un'esposizione a sostanze ossidanti esterne o per un'alterazione ai meccanismi di difesa, biomolecole preziose (DNA, lipidi e proteine) possono subire gravi danni.⁴¹ Sono considerati "antiossidanti" gli agenti con un potenziale di riduzione negativo in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi ripristinando l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. Presupposto per fungere da antiossidanti è che, una volta ossidati, la loro forma radicalica sia non reattiva o poco reattiva nei confronti delle altre molecole. Gli antiossidanti esplicano la loro azione a livelli di concentrazione piuttosto bassi; quando tali concentrazioni aumentano, alcuni di essi possono diventare pro-ossidanti e favorire la formazione di radicali.⁴² In relazione al meccanismo d'azione, gli antiossidanti si possono distinguere nelle seguenti tipologie:

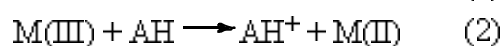
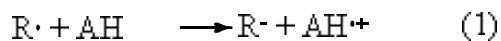
Tipo I: "chain breaker". Agiscono da inattivatori di radicali liberi tramite due tecniche fondamentali: per trasferimento di un atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer: HAT) o per trasferimento di un singolo elettrone (Single Electron Transfer: SET) alle specie radicaliche. Il risultato finale è lo stesso, ma le cinetiche e il potenziale delle reazioni sono diversi.⁴³ La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano;

pertanto, più efficiente è la delocalizzazione degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante. In realtà questi meccanismi possono aver luogo anche contemporaneamente, ma è la struttura chimica dell'antiossidante, unitamente alla sua solubilità, al suo coefficiente di partizione e al solvente, a determinare il meccanismo di azione prevalente. L'energia di dissociazione dei legami e il potenziale di ionizzazione sono i due principali fattori che influiscono sul meccanismo e sull'efficienza dell'antiossidante.⁴⁴ Gli antiossidanti donatori di un atomo di idrogeno, agiscono secondo lo **Schema 4**. Le reazioni HAT sono indipendenti dal solvente e dal pH del mezzo e, generalmente, avvengono abbastanza rapidamente, concludendosi nel giro di qualche minuto.



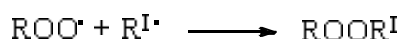
Schema 4. Antiossidanti di Tipo I per reazioni HAT.

Viceversa, le reazioni SET avvengono più lentamente. In questo processo il potenziale antiossidante trasferisce un elettrone per ridurre composti quali radicali, metalli e carbonili (**Schema 5**).⁴⁵



Schema 5. Antiossidanti di Tipo I per reazioni SET.

Tipo II: “scavenger”. Prevengono la formazione di radicali liberi, soprattutto per accoppiamento con un altro radicale (**Schema 6**). Tale reazione ha un'energia di attivazione quasi nulla e quindi avviene con una velocità prossima alla diffusione.⁴⁶ L'azione di scavenger comprende anche la chelazione dei metalli; tracce di metalli presenti negli alimenti riducono l'energia di attivazione delle reazioni nella fase di iniziazione di ossidazione lipidica.



Schema 6. Antiossidanti di Tipo II.

Tuttavia, in natura, i limiti tra tali classi di antiossidanti non sono così netti sia perché ancora alcuni meccanismi d'azione con cui agiscono certe sostanze antiossidanti non sono stati ben definiti sia perché esistono sostanze, quali i composti fenolici, che possono comportarsi contemporaneamente come antiossidanti di primo e di secondo tipo.

1.4 La funzione catecolica

I principali antiossidanti naturali sono caratterizzati dalla presenza, nella loro struttura chimica, di gruppi fenolici, in particolare, catecolici, idrochinonici o gallolici (**Figura 14**). Tali composti possiedono un'elevata tossicità ed è proprio grazie a questa caratteristica che sono efficaci nella protezione delle piante contro gli insetti.⁴⁷

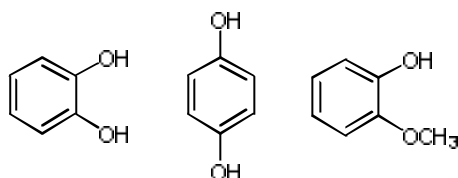
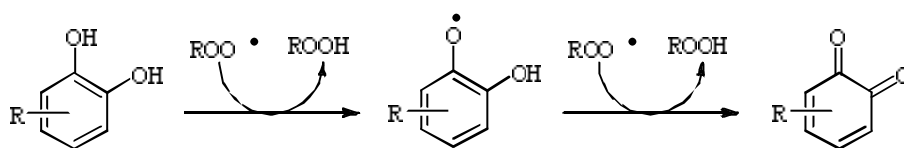


Figura 14. Strutture chimiche base di antiossidanti.

La peculiare attività antiossidante di tali fenoli, in particolare dei sistemi a struttura catecolica, viene spiegata considerando che il semichinone che si forma nel primo stadio della reazione può inattivare un secondo radicale convertendosi in chinone (**Schema 7**).⁴⁸



Schema 7. Meccanismo di azione antiossidante di sistemi catecolici.

L'esame eseguito su più di 8000 molecole raccolte in un database (denominato Comprehensive Medicinal Chemistry "CMC") ha identificato 78 composti farmacologicamente attivi contenenti una o più funzioni catecoliche. Tra questi, 12 sono broncodilatatori, 9 adrenergici, 7 antiparkinsoniani e 7 antiipertensivi. Quasi l'1% dei farmaci possiede una o più strutture catecoliche, e questo suggerisce che la tossicità del gruppo sia, dunque, controllabile. Molto rigorosa è stata la ricerca eseguita nel data base dell'U.S. Food and Drug Administration (FDA) in cui compaiono 17 farmaci approvati e tuttora prescrivibili. Sebbene le loro strutture siano diverse, è possibile classificarli in 5 gruppi in relazione ai sostituenti (I-V in differenti colori, **Figura 15**). Le molecole di Tipo I consistono di una funzione catecolica e una catena carboniosa in posizione *para* al gruppo ossidrilico. Molecole di Tipo II e III presentano rispettivamente un anello a 7 e 6 termini legato a quello catecolico. Poiché queste catene o anelli hanno deboli proprietà elettron-donatore, essi influenzano

leggermente le proprietà elettroniche del catecolo. Per contro, molecole Tipo IV e V hanno una catena in posizione *para* e l' NO_2 , un forte elettron-attrattore, in posizione *orto* al gruppo ossidrilico che influenza fortemente l'intorno elettronico dei catecoli. E' interessante notare che in nessun farmaco sono presenti gruppi fortemente elettron-donatori poiché studi di relazione struttura-attività eseguiti sui fenoli hanno mostrato che tali gruppi tendono ad aumentare la loro citotossicità. Inoltre, dati raccolti sulla idrofilicità dei farmaci catecolici stimata calcolando il logaritmo del loro coefficiente di ripartizione *n*-ottanolo/ acqua ($\log P$), applicando il metodo di Hansch e Leo,⁴⁹ mostrano che nella quasi totalità dei casi, tale parametro, è sempre inferiore a tre in accordo con la corrente idea che l'idrofilicità sia un parametro determinante per la bassa tossicità dei fenoli (**Figura 15**). Calcoli chimico-fisici hanno, inoltre, recentemente mostrato che la tossicità dei composti catecolici è legata alla loro capacità di formare il chinone; in particolare, tanto maggiore è l'entalpia di dissociazione del secondo O-H tanto minore è la loro tossicità. Ovviamente ridurre la tossicità dei polifenoli agendo su questo aspetto spesso comporta una riduzione dell'attività di radical-scavenger; quindi, è spesso necessario cercare un buon compromesso.

Dai risultati ottenuti in conclusione si evince che la tossicità del catecolo è sostenibile e che esso è un promettente punto di partenza per lo sviluppo di nuovi efficaci farmaci.

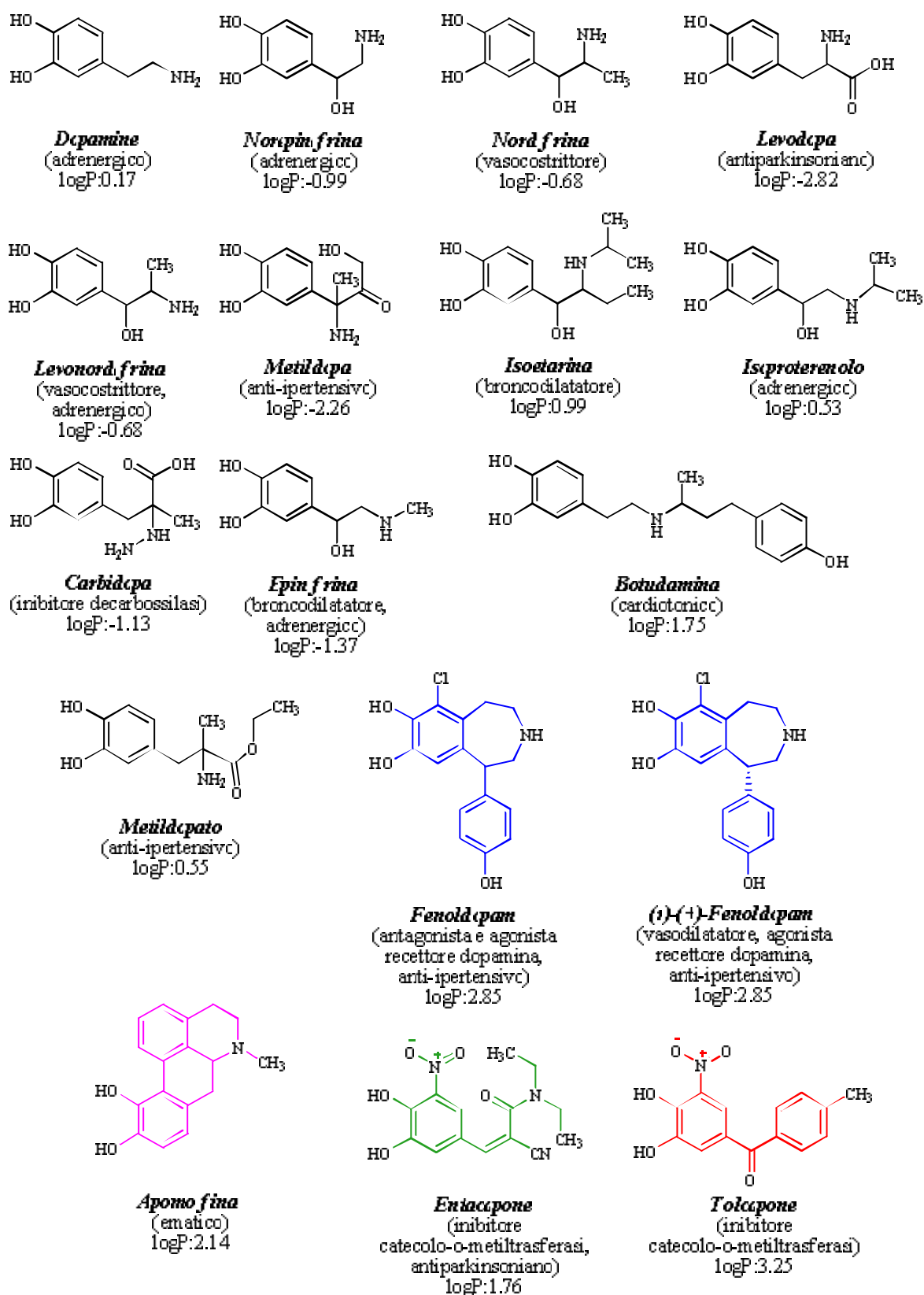


Figura 15. Farmaci a struttura catecolica approvati FDA (Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V).

1.5 Antiossidanti sintetici

Negli ultimi 50 anni una notevole attenzione è stata rivolta allo studio di nuovi antiossidanti per prevenire e curare varie patologie. Essi sono maggiormente di origine naturale; infatti i composti naturali sono preferiti dai consumatori perchè ritenuti più sani. Soprattutto nel settore nutraceutico vengono spesso impiegati in miscela con altri composti presenti nella matrice naturale; studi *in vivo* hanno rivelato che meccanismi di azione sinergici spesso esaltano l'attività biologica dei singoli polifenoli.

Una seconda via per rendere disponibili nuovi antiossidanti è quella sintetica. Contrariamente a quelli naturali, gli antiossidanti sintetici vengono sviluppati e prodotti a beneficio esclusivo del genere umano; la loro sicurezza viene testata con procedure standardizzate per proteggere il consumatore contro eventuali rischi sulla salute. Tali procedure non sono sempre applicabili agli antiossidanti naturali perché presenti in miscele complesse,

Il terzo gruppo di sostanze comprende antiossidanti aventi strutture chimiche che mimano quelle naturali ma sintetizzati chimicamente. Rispetto agli antiossidanti naturali sono sostanze pure, relativamente economiche, facilmente accessibili e con proprietà (inclusa quella antiossidante) riproducibili.⁴⁷

1.6 Utilizzo di metodologie chimiche ossidative nella sintesi di molecole fenoliche bioattive

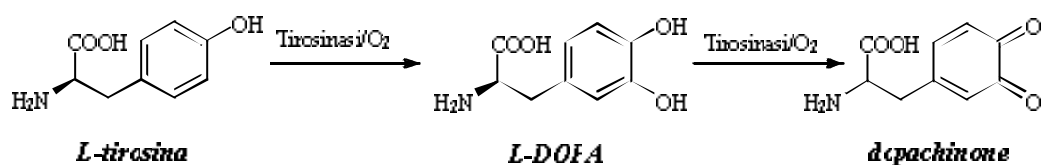
Nello sviluppo di sintesi di nuovi polifenoli sintetici o identici ai naturali, una delle principali reazioni a cui spesso il chimico sintetico ricorre è l'ossidazione di composti aromatici. Di particolare interesse, vista l'importanza dei prodotti, è la reazione di ossidrilazione fenolica per l'ottenimento di molecole a struttura catecolica.

1.6.1 Reazioni di ossidrilazione di composti aromatici: sintesi di catecoli

La diretta e selettiva ossidrilazione di composti aromatici, soprattutto dei fenoli, è una delle principali trasformazioni in chimica organica ed ha attirato una particolare attenzione negli ultimi anni perché, come detto precedentemente, i composti aromatici ossidrilati sono importanti precursori di molecole di interesse farmaceutico.⁵⁰ Tuttavia, le metodologie per condurre l'ossidrilazione diretta e selettiva sono ancora limitate. I metodi tradizionali impiegano sali di manganese e cromo in presenza di ossigeno o aria, oppure complessi di metalli di transizione per reazioni in fase omogenea.⁵¹ Le principali limitazioni dell'applicazione di queste metodologie sono l'elevato impatto ambientale dei reagenti ossidanti, le difficoltà nel recupero dei prodotti dall'ambiente di reazione e lo scarso tempo di vita dei complessi. La sintesi di catecoli sostituiti, in particolare, è spesso complessa e molte volte richiede condizioni drastiche di reazione ottenendo basse rese e miscele complesse di sottoprodotti. Queste difficoltà hanno stimolato la ricerca verso lo sviluppo di strategie chimiche semplici e di applicabilità generale. In natura i composti catecolici giocano un ruolo importante in diverse vie metaboliche, rappresentando, infatti, il primo step della degradazione fenolica.⁵² Negli organismi eucarioti esistono tre tipi di enzimi che ossidano i fenoli:

- le monoossigenasi localizzate nella membrana del reticolo endoplasmatico;
- le fenolo idrossilasi NADPH-dipendenti presenti nel citosol;
- le perossidasi solubili o legate alla membrana.⁵³

Un esempio di biotrasformazione naturale è fornito dall'enzima tirosinasi (*o*-difenolo diossigeno ossidoreduttasi), responsabile dell'ossidrilazione dell'aminoacido L-tirosina a L-DOPA e della successiva trasformazione a dopachinone (**Schema 8**).



Schema 8. Formazione del dopachinone per azione dell'enzima tirosinasi sull'amminoacido L-tirosina.

Prendendo come modello i sistemi naturali, sono state messe a punto alcune metodologie ossidative che impiegano enzimi isolati o cellule microbiche. La prima risale al 1952 quando, impiegando il fungo zigomiceto *Rhizopus arrhizus*, furono convertiti steroidi, come il progesterone, nei corrispondenti 11a-idrossi-derivati.⁵⁴

L'ossidazione chimica invece ha stentato ad affermarsi come alternativa ai metodi enzimatici; ossidanti come i radicali di Fremy, il sistema catalitico metiltriosorenio (MeReO₃)/H₂O₂,⁵⁵ il dimetildiossirano⁵⁶ non discriminano o addirittura favoriscono l'ossidazione della posizione *para* se non è bloccata con un sostituyente. Tuttavia, recentemente, sono stati riportati alcuni esempi di sintesi chimica one-pot di catecoli sostituiti a partire da fenoli basati sull'impiego di ossidanti appartenenti alla famiglia dello iodio ipervalente (V).⁵⁷ Questi reattivi rappresentano dei validi sostituti ai più comuni agenti ossidanti perchè semplificano notevolmente i processi ossidativi essendo estremamente attivi ma selettivi al tempo stesso, versatili, economici e facili da preparare in laboratorio.⁵⁸

1.7 Reattivi dello iodio ipervalente: IBX e DMP

Nell'ultimo decennio la chimica dei composti dello iodio ipervalente (V) ha mostrato un intenso sviluppo. In letteratura sono riportate alcune applicazioni sintetiche basate sull'uso di tali composti. I principali reattivi appartenenti a questa famiglia sono l'acido 2-iodossibenzoico (IBX) e il reattivo di Dess-Martin (DMP) (**Figura 16**).

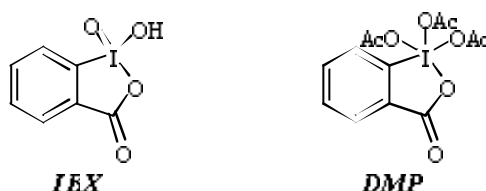
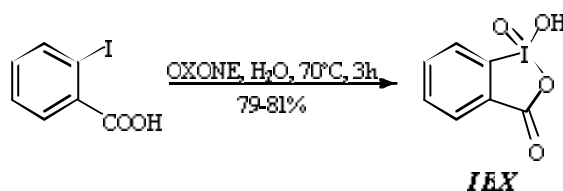


Figura 16. Strutture chimiche di IBX e DMP.

1.7.1 Sintesi e proprietà

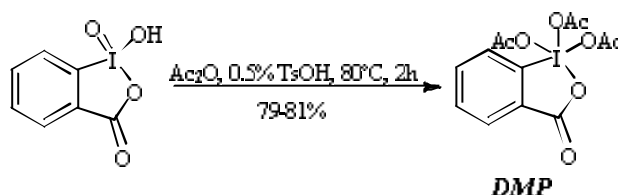
L'IBX ha la struttura del benzoiodossolo ossido ciclico, come determinato dall'analisi ai Raggi X.⁵⁹ Fu preparato per la prima volta da Hartmann e Mayer nel 1893 ma per molto tempo la sua applicabilità è stata limitata dalla scarsa solubilità nella maggior parte dei solventi organici. La sintesi si basava sull'ossidazione dell'acido 2-iodobenzoico con bromato di potassio (KBrO_3) in soluzione acquosa di acido solforico.⁶⁰ Tale procedura risultava però molto rischiosa poiché, secondo la classificazione internazionale delle sostanze tossiche, il KBrO_3 è ritenuto un agente cancerogeno (R45) e la reazione produceva vapori di bromo con conseguente rischio di contaminazione personale e ambientale. Inoltre, la presenza di bromato e altre impurezze provenienti dalla sintesi, conferivano all'IBX che ne derivava caratteristiche di esplosività ad alte temperature ($>200^\circ\text{C}$) o per impatto. Pertanto, in seguito sono stati utilizzati altri ossidanti quali l'acido peracetico⁶¹ e l'ipoclorito di sodio in soluzione acquosa.⁵⁸ Più recentemente è stata messa a punto da Santagostino e collaboratori, l'ossidazione con oxone, utilizzando acqua come solvente (**Schema 9**). Questa metodologia presenta numerosi vantaggi quali, l'impiego di reagenti non tossici, lo sviluppo di solfati come unici sottoprodotti di reazione, l'elevata resa e un alto grado di purezza (=99% NMR) del prodotto finale.⁶²



Schema 9. Sintesi di IBX.

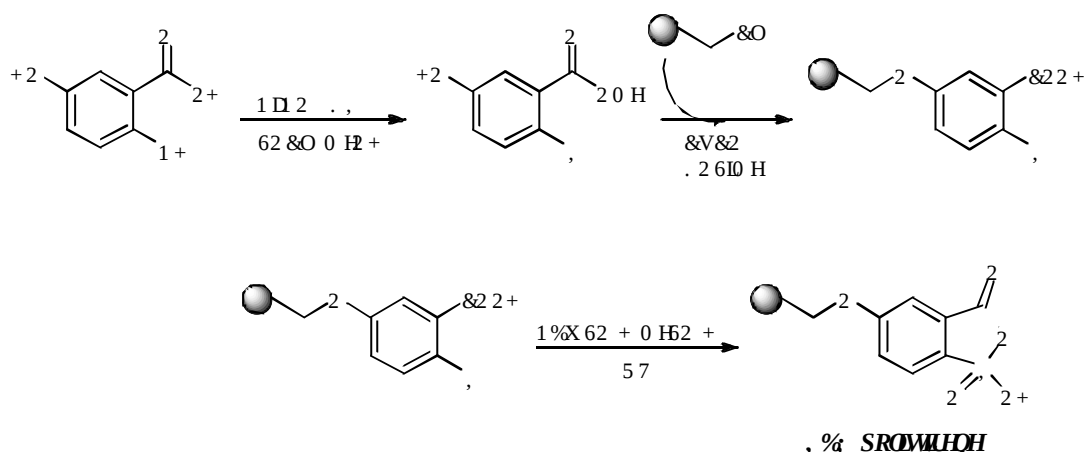
Attualmente, in commercio è disponibile anche una formulazione stabilizzata di IBX, denominata SIBX, costituita da una miscela di acido benzoico (22%), isoftalico (29%) e 2-iodossibenzoico (49%).⁵⁷

Nel 1983 è stata descritta la preparazione del Reattivo di Dess-Martin (DMP), dal nome degli autori. Tale ossidante è stato preparato trattando, a 100°C, l'IBX con la miscela anidride acetica/acido acetico.⁶³ Un miglioramento della procedura è stato ottenuto acetilando l'IBX con anidride acetica in presenza di acido *p*-toluenosolfonico (TsOH) (**Schema 10**).⁵⁸



Schema 10. Preparazione di DMP.

Il DMP negli anni seguenti emerse come l'ossidante di scelta rispetto all'IBX perchè più solubile nella maggiorparte dei solventi organici e al tempo stesso reattivo. Le ossidazioni recentemente condotte nei principali solventi organici hanno però mostrato un'elevata reattività dell'IBX anche in sospensione, rivalutandone il vasto campo di applicabilità.⁵⁷ Ulteriori sviluppi nell'applicazione di tale composto includono l'impiego di IBX (o di suoi derivati) su supporti solidi in modo da ottenere ossidanti eterogenei. Con essi si semplifica notevolmente il work-up di reazione potendo recuperare il reagente ridotto, dalla miscela di reazione, per semplice filtrazione con un conseguente miglioramento delle rese e della purezza dei prodotti. Inoltre, il reagente può essere rigenerato e riutilizzato come ossidante, migliorando l'economicità e l'ecocompatibilità del processo ossidativo.⁶⁴ Un esempio di preparazione sintetica di IBX supportato su polistirene è riportato nello **Schema 11**.⁶⁵

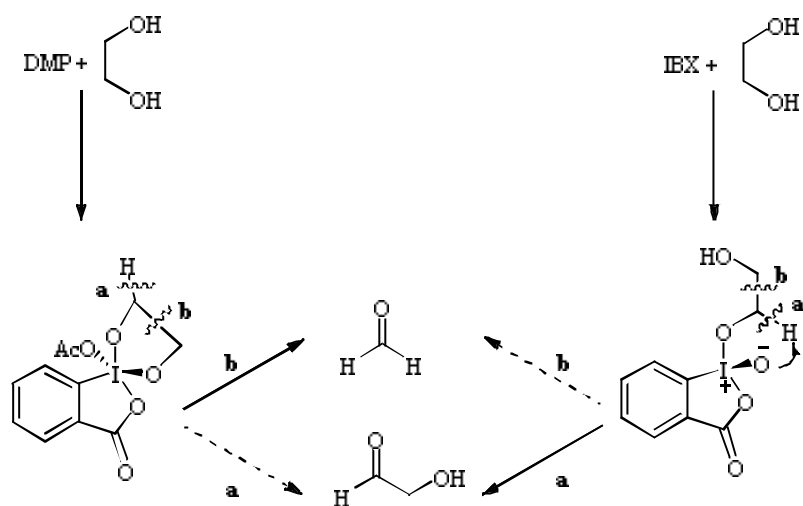


Schema 11. Preparazione di IBX polimerico.

In questa sintesi, il 5-idrossi-2 iodobenzoato di metile è stato ottenuto in due steps dall'acido 2-amino-5-idrossibenzoico mediante una reazione di Sandmeyer seguita da esterificazione con cloruro di tionile in metanolo. L'estere dell'acido 4-idrossi-2-iodobenzoico è stato successivamente immobilizzato sul clorometil polistirene usando cesio carbonato come base. Dopo reazione di saponificazione con potassio trimetilsilanossido in THF è stata ripristinata la funzione acida. Infine, l'ossidazione con tetrabutylammonio oxone con acido metilsolforico ha portato all'IBX supportato con una resa pari al 94%. Tale polimero è caratterizzato da un fattore di loading (mmoli di iodio per grammo di resina) pari a 0.8 mmol/g.

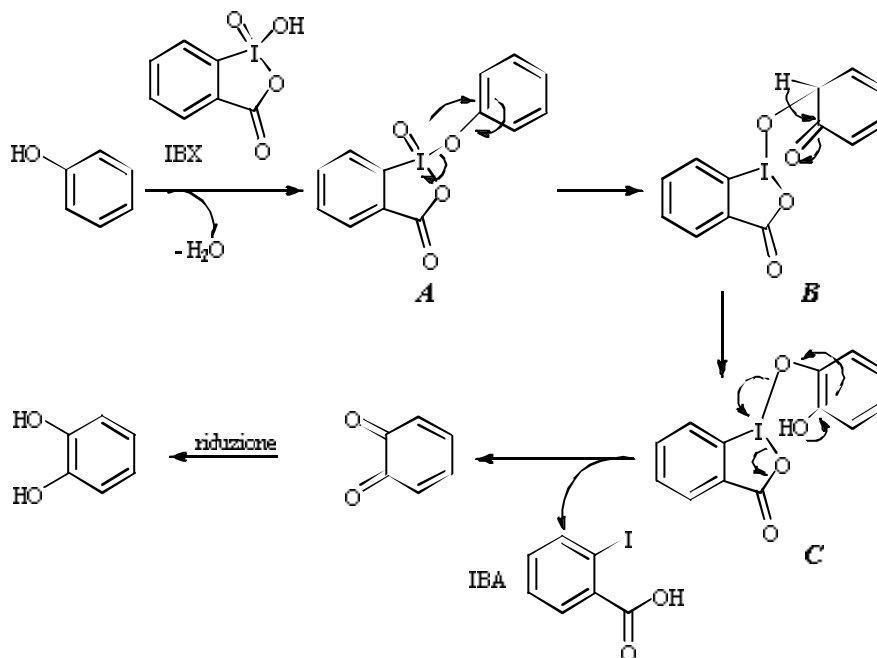
1.7.2 Reattività

Le prime applicazioni dell'IBX e del DMP hanno riguardato l'ossidazione di alcoli ad aldeidi e chetoni. Essi hanno mostrato alcune differenze, in termini di reattività, nella sintesi eterociclica⁶⁶ e nell'ossidazione di 1,2-dioli. Ad esempio, l'IBX ossida i dioli formando i corrispondenti 1,2-dichetoni; il DMP porta a prodotti di rottura del legame C-C. Studi NMR hanno rivelato che la differenza di reattività risiede nella capacità di coordinazione di ciascun reattivo con l'alcol, substrato di ossidazione. In particolare, il DMP potendo coordinare l'alcol sia in posizione assiale che equatoriale è in grado di chelare il diolo portando alla rottura del legame C-C; l'IBX, invece, coordinando l'alcol solo in posizione assiale, ossida la funzione diolica senza provocare la rottura del legame (**Schema 12**).⁶⁷



Schema 12. Reazione di ossidazione di 1,2-diolo con IBX e DMP.

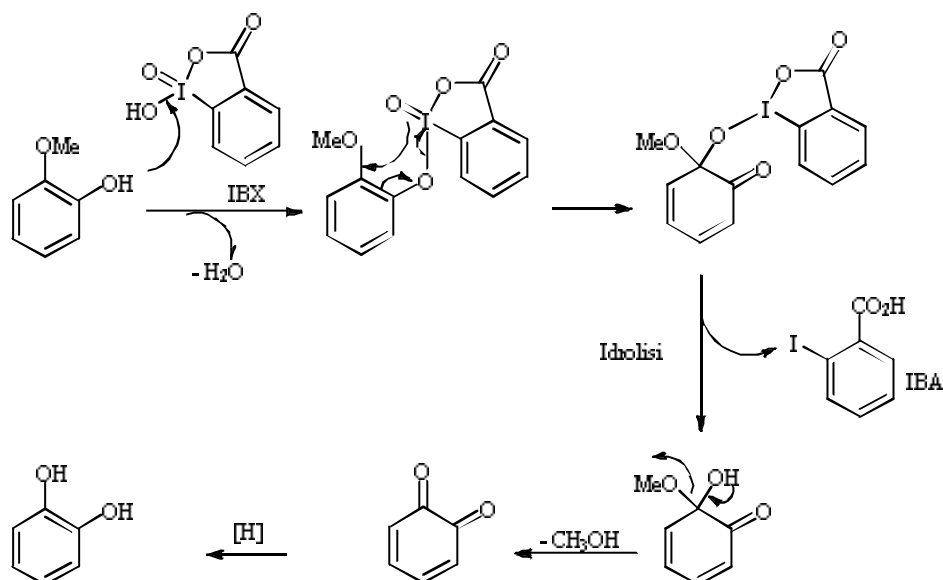
Con il progredire della ricerca su questi reagenti, sono state sempre più rivelate altre potenzialità ossidative dell'IBX. Un esempio di interesse per questa tesi è stata l'ossidrilazione in *orto* di fenoli. Il meccanismo di reazione, descritto in letteratura è riportato nello **Schema 13**.



Schema 13. Ossidrilazione enzimatica di fenoli con IBX.

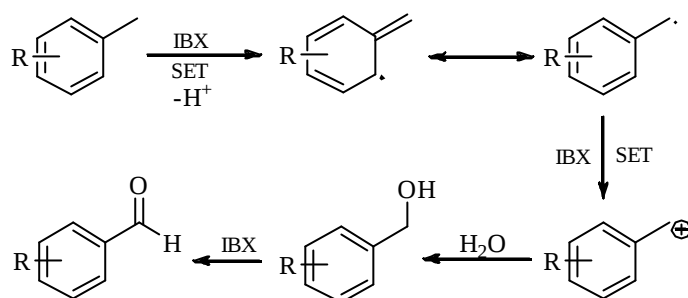
Inizialmente, si ha una coordinazione tra il substrato e l'IBX con formazione di un intermedio **A** con lo iodio pentavalente che favorisce lo spostamento intramolecolare dell'ossigeno alla più nucleofila e meno ingombrata posizione *orto* del fenolo iniziale (intermedio **B**). Durante questo passaggio lo iodio viene ridotto da V a III con successiva tautomerizzazione (intermedio **C**). Successivamente avviene l'ossidazione del catecolo a *orto*-chinone con riduzione dello iodio a valenza I. Per blanda riduzione one-pot si ottiene il catecolo.⁵⁷

Con un analogo meccanismo, l'IBX è in grado di effettuare la demetilazione ossidativa di 2-metossi fenoli (**Schema 14**). In tal caso, ha un ruolo fondamentale la presenza di acqua nell'ambiente di reazione che favorisce l'idrolisi del complesso e la formazione dell'*orto* chinone.⁵⁷



Schema 14. Demetilazione ossidativa di 2- metossi fenoli con IBX.

Nicolau e collaboratori hanno dimostrato che, a differenza del DMP, l'IBX oltre al meccanismo ionico descritto, può reagire anche con un processo radicalico di trasferimento di un singolo elettrone (SET). Questi dati hanno indirizzato gli studi verso altri tipi di reazioni, quali la deidrogenazione di aldeidi e chetoni⁶⁸ e l'ossidazione di sistemi benilici.⁶⁹ Un esempio di meccanismo è riportato nello **Schema 15**.



Schema 15. Meccanismo SET di ossidazione benzilica.

La reattività dell'IBX è inoltre influenzata dalla temperatura e dai solventi con i quali può coordinarsi. Anche in questo caso la coordinazione gioca un ruolo fondamentale. Infatti, non solo modula la reattività dei reagenti ma, quando sono possibili più vie di reazione, può influenzarne il decorso. In **Tabella 2** è riportata la reattività dell'IBX in funzione del ligando presente nell'ambiente di reazione.⁷⁰

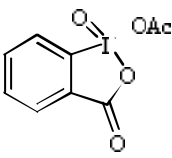
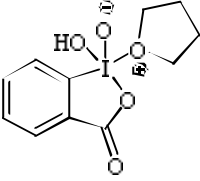
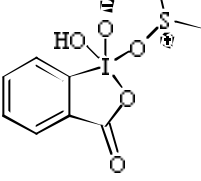
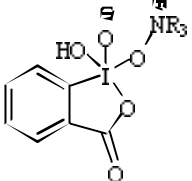
 Ac-IBX	 IBX·THF	 IBX·DMSO	 IBX·N-ossido
Ossidazione di alcoli Sintesi di eterocicli contenenti N Epossidazione di dieni	Sintesi di d-lattami e carbamati Sintesi di amino-zuccheri	Deidrogenazione di chetoni e aldeidi Ossidazione benzilica	Deidrogenazione di chetoni e aldeidi a temperatura ambiente

Tabella 2. Reattività di IBX complessato.

1.8 Reazioni di ossidazione per via enzimatica.

L'uso degli enzimi in chimica organica presenta alcune specifiche caratteristiche; essi, ad esempio, sono in grado di controllare la regio e la stereoselettività di una reazione e di rendere ecocompatibili i processi. Negli ultimi anni gli enzimi rappresentano una nuova frontiera nella sintesi e utili strumenti per la produzione di nuovi derivati ad attività farmacologica. Nello specifico, le laccasi, utilizzate per processi ossidativi, presentano particolari peculiarità: sono facilmente prodotte in laboratorio per fermentazione e al tempo stesso sono commercialmente disponibili e generalmente stabili nelle comuni condizioni di reazione.^{71,72}

1.9 Laccasi

Le laccasi (EC 1.10.3.2, *p*-difenolo: ossigeno ossidoreduttasi) appartengono alla famiglia delle ossidasi multirame blu; sono ubiquitarie in natura e sono state descritte per la prima volta nel 1883.⁷³ Generalmente vengono suddivise in due gruppi principali: quelle derivanti da piante superiori e quelle da funghi. Recentemente sono state ritrovate anche in batteri ed insetti. Le laccasi vegetali svolgono ruoli sostanzialmente diversi da quelle fungine. Un esempio è rappresentato dalla lignina, uno dei polimeri che costituiscono il legno; mentre le laccasi da pianta intervengono nel processo biosintetico, quelle fungine prendono parte al processo degradativo. Esse hanno una massa molecolare di circa 70000 Da.⁷⁴ Dal punto di vista strutturale, le laccasi presentano un sito catalitico costituito da quattro ioni rameici, distinti in base alle loro proprietà elettroniche. Tali siti sono divisi in tre classi sulla base delle loro caratteristiche spettroscopiche che rispecchiano la geometria del sito attivo e la struttura elettronica dei leganti:

- Cu⁺² tipo 1 (T1) o rame blu;
- Cu⁺² tipo 2 (T2) o rame normale;
- Cu⁺² tipo 3 (T3) o centro rameico binucleare.

Di recente è stato incluso il cluster rameico trinucleare (comprensivo del centro T2 e del centro T3).⁷⁵

In **Figura 17** è riportata la prima struttura cristallografica di una laccasi attiva, ottenuta dal fungo *Trametes versicolor*, contenente i quattro ioni rameici oltre alla catena polipeptidica completa e a sette unità di *N*-acetil glucosammina, legate a cinque distinti siti di *N*-glicosilazione.⁷⁶

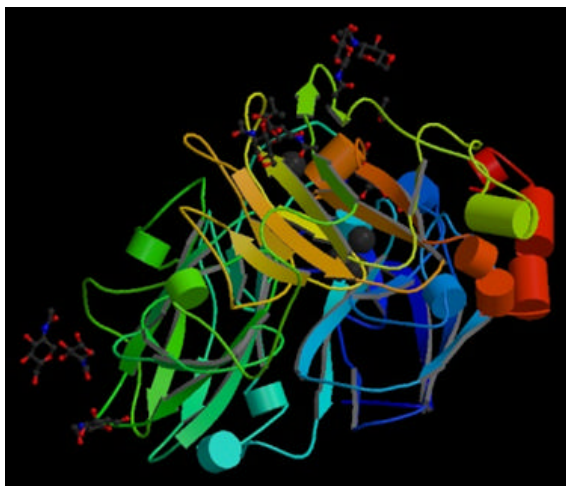


Figura 17. Struttura cristallografica di laccasi da *Trametes versicolor*.

La superficie della laccasi da *Trametes versicolor* rivela una prevalenza di cariche negative. La struttura cristallina di un complesso enzima/substrato ha fornito ulteriori informazioni ed oggi è noto che il substrato si lega in una piccola cavità carica negativamente e prossima al sito rameico T1. Le cariche negative localizzate in questo sito possono avere una significativa funzione; infatti, stabilizzano il catione radicale prodotto durante il ciclo catalitico della laccasi. Le molecole di solvente hanno accesso al sito di riduzione dell'ossigeno molecolare (cluster trinucleare T2/T3) (**Figura 18**).

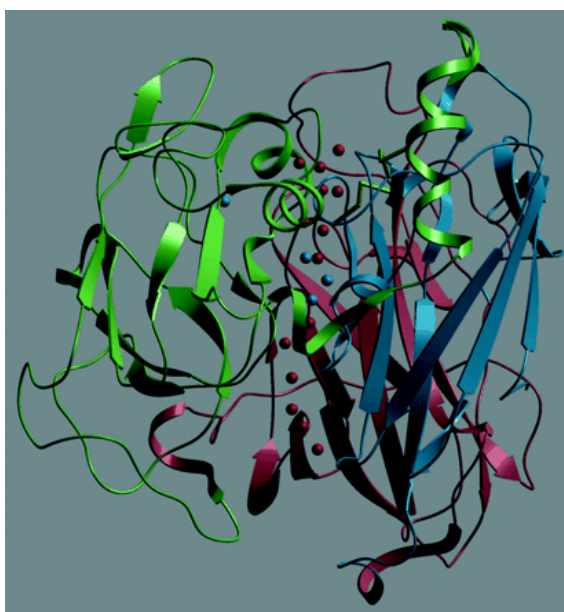
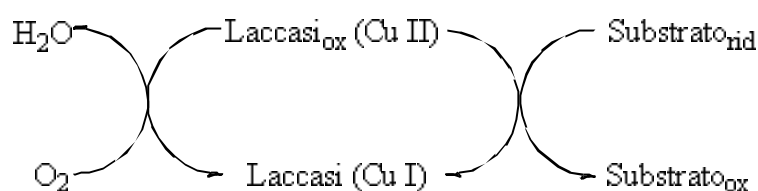


Figura 18. Cluster trinucleare T2/T3 e molecole di solvente.

1.9.1 Reattività

Le laccasi hanno un basso potenziale redox ($\sim 0.7-0.8$ V/NHE);⁷⁴ per questa proprietà reagiscono con substrati aventi caratteristiche simili a un *p*-difenolo; alcune laccasi provenienti da funghi ossidano monofenoli ma anche l'acido ascorbico.⁷⁷ In letteratura sono riportate anche reazioni di ossidazione con ammine alifatiche o aromatiche.⁷⁸ Con tali substrati il processo di ossidoriduzione catalitico si basa sulla riduzione con quattro elettroni di un equivalente di ossigeno a due equivalenti di acqua e la concomitante ossidazione per trasferimento di un singolo elettrone del substrato (**Schema 16**).^{79,80}



Schema 16. Ciclo catalitico ossigeno/laccasi.

In particolare tale meccanismo consta di tre fasi:

1. riduzione del rame T1 e ossidazione del substrato;
2. trasferimento elettronico interno tra i differenti tipi di rame;
3. riduzione di O_2 ad acqua nei siti rameici T2 e T3.

Il primo intermedio di reazione è un radicale catione⁸¹ che una volta formatosi è coinvolto in numerose reazioni legate alla sua reattività nel mezzo di reazione quali: idratazioni, disproporzioni, e cross-coupling.⁸² Proprio per la grande varietà di queste reazioni ossidative, le laccasi sono ampiamente utilizzate in campo industriale soprattutto nel settore tessile, nel biorisanamento e anche in alcune selettive sintesi organiche.⁸³

Tuttavia, in molti casi i substrati non possono essere ossidati dalle laccasi sia perché essi sono troppo grandi per penetrare nel sito attivo dell'enzima che perché dotati di un potenziale redox elevato. Pertanto, per estenderne le potenzialità applicative, è stato introdotto l'impiego di mediatori chimici.

1.9.2 Sistema Laccasi/Mediatore

Come già detto spesso, l'osservazione della natura offre al chimico indicazioni utili a migliorare la propria ricerca. Il processo di degradazione ossidativa della lignina, che avviene ad opera di enzimi specializzati prodotti da funghi basidiomiceti, è mediata da una classe di molecole chimiche dette “mediatori”.

Il legno è un materiale complesso costituito da cellulosa e lignina interconnessi dall'emicellulosa. La cellulosa è la fonte di energia per il metabolismo dei funghi. Per raggiungerla, essi hanno bisogno di eliminare la lignina attraverso la produzione di enzimi capaci di degradarla. La lignina è un polimero tridimensionale che, per le sue elevate dimensioni, non entra nella tasca reattiva della lignina perossidasi. Per risolvere questo problema di “comunicazione”, sono stati prodotti spontaneamente dal fungo *Pycnoporus cinnabarinus*, alcune molecole, quali il 3,4-dimetossibenzil alcol (VA) e l'acido 3-idrossiantranilico (HAA)⁸⁴ che hanno svolto l'azione di mediatori (Figura 19).⁸⁵

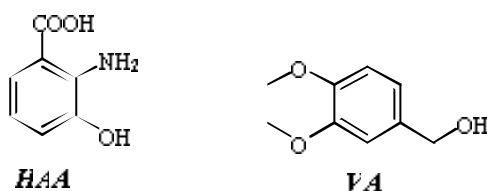
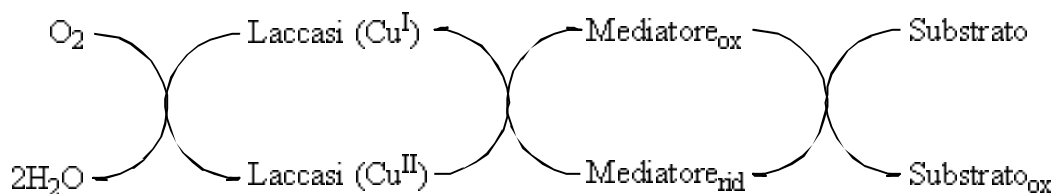


Figura 19. Struttura chimica di alcuni mediatori naturali.

Il meccanismo di ossidazione laccasi/mediatore ipotizzato è riportato nello **Schema 17**. Il mediatore, ossidato dalla laccasi attivata dall'ossigeno, reagisce con il substrato non attivo per l'enzima; successivamente l'ossigeno ossida la laccasi chiudendo il ciclo catalitico.^{86,74}



Schema 17. Ciclo catalitico ossigeno/laccasi/mediatore.

Il meccanismo di azione dei mediatori naturali è stato sfruttato in laboratorio per consentire alle laccasi di ossidare substrati non fenolici. Mediatori chimici di uso comune sono rappresentati in **Figura 20** e comprendono il 2,2'-azinobis-(3-etiltiazolinio-6-solfonato) (**ABTS**);⁸⁷ l'1-idrossibenzotriazolo (**HBT**);⁸⁸ la *N*-idrossiftalimide (**HPI**);⁸⁹ la *N*-idrossi-acetanilide (**NHA**);⁹⁰ la *N*-osso-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina (**TEMPO**).⁹¹

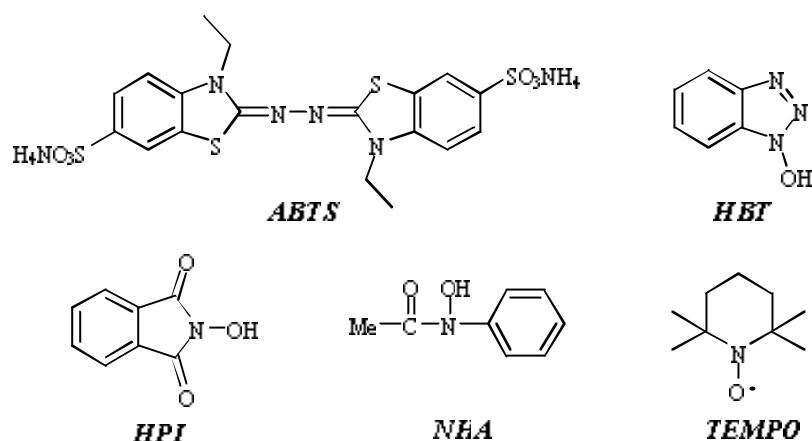
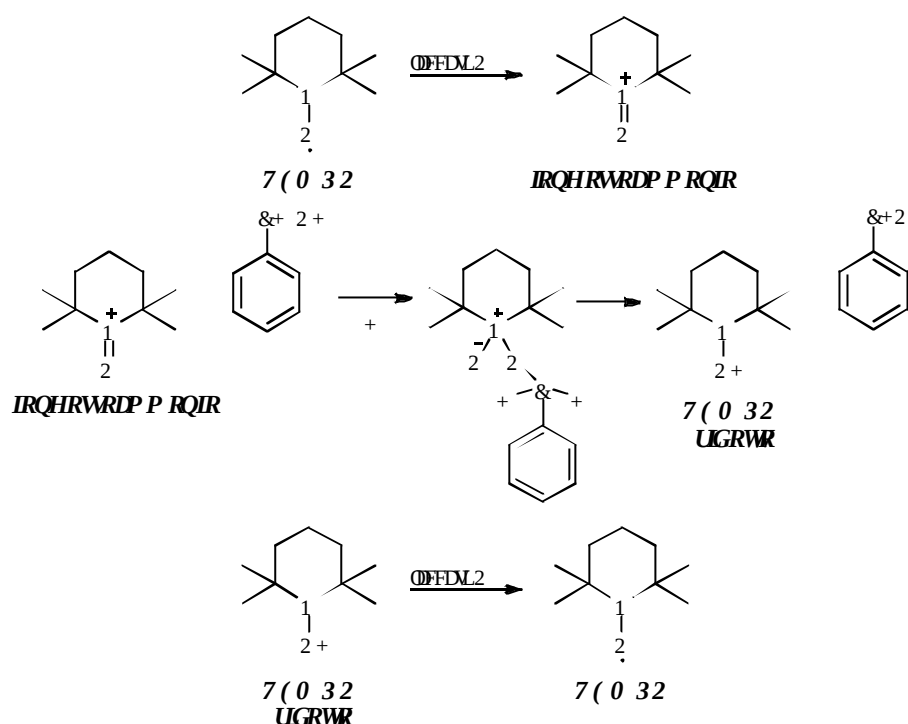


Figura 20. Strutture chimiche dei principali mediatori.

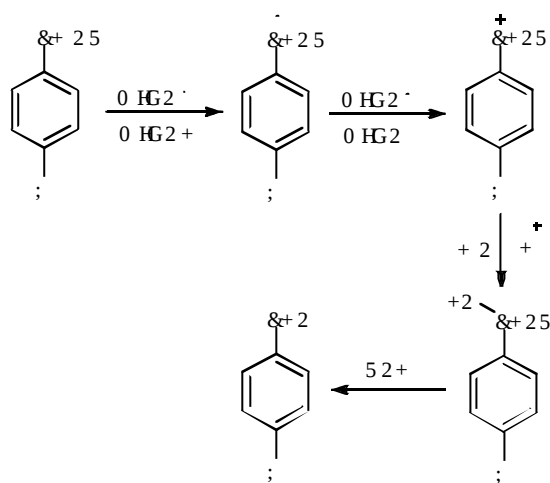
Per le ossidazioni condotte con i sistemi ossigeno/laccasi/mediatore, sono ipotizzabili tre meccanismi di reazione.⁸⁹

1) meccanismo ionico: è il caso del mediatore **TEMPO** (**Schema 18**). L'ossidante è lo ione ossoammonio, facilmente generato per ossidazione con laccasi; segue la formazione di un addotto per attacco nucleofilo del lone-pair dell'alcol allo ione ossoammonio. La successiva deprotonazione dell'addotto alla posizione benzilica porta al prodotto carbonilico e alla forma ridotta del **TEMPO** che viene rigenerata per azione della laccasi.⁸⁸



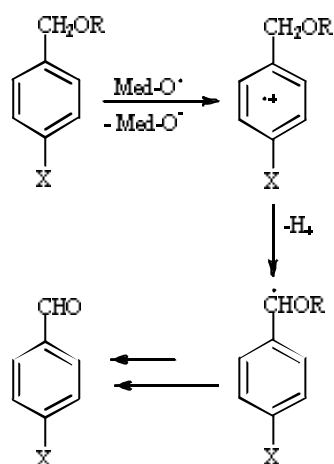
Schema 18. Meccanismo di ossidazione ionico.

2) meccanismo a Trasferimento di Atomo di Idrogeno (HAT). E' seguito, per lo più, dai mediatori a struttura >N-OH (**HBT**, **HPI**, **NHA**). Nel primo stadio la laccasi ossida il mediatore che rappresenta l'intermedio reattivo. Segue lo strappo di un atomo di idrogeno al substrato da parte del radicale. Quest'ultimo può essere ossidato a carbocatione o dal radicale ossidato o dalla laccasi stessa. L'aggiunta di acqua al carbocatione porta alla formazione di un emiacetale che, per eliminazione di una molecola di alcol, genera l'aldeide o il chetone (Schema 19).⁷⁴



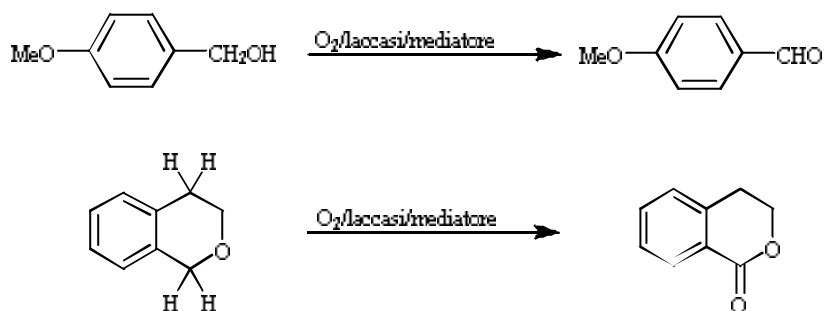
Schema 19. Meccanismo di ossidazione a trasferimento di atomo di idrogeno.

3) meccanismo a Trasferimento di Elettrone (ET). E' seguito principalmente dal mediatore **ABTS**. Nel primo stadio la laccasi ossida il mediatore che strappa un elettrone al substrato (ossidazione monoelettronica) con formazione del radicale catione. Segue una veloce deprotonazione e la successiva ossidazione del radicale ad aldeide (**Schema 20**).^{74, 89}



Schema 20. Meccanismo di ossidazione a trasferimento di elettrone.

Il sistema O_2 /Laccasi/Mediatore è stato applicato per le ossidazioni benziliche e benzileteree di substrati modello (**Schema 21**)⁹² portando a risultati soddisfacenti in condizioni di reazione blande (tampone acquoso, temperatura ambiente).



Schema 21 Ossidazioni di posizioni benziliche o benzileteree promosse dal sistema laccasi/mediatore/ O_2 .

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'attività sperimentale condotta durante il triennio di dottorato si è inserita in una tematica di ricerca, a carattere interdisciplinare, sviluppata ormai da alcuni anni presso il Laboratorio di Chimica Organica e delle Sostanze Organiche Naturali dell'Università della Tuscia di Viterbo, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica: la valorizzazione dei prodotti di scarto presenti nei reflui agroindustriali, tramite modificazioni ossidative ecocompatibili, per l'ottenimento di composti biologicamente attivi. Tali scarti, infatti, rappresentano una fonte di molecole di pregio, quali i biofenoli, di cui si è parlato, le cui attività biologiche ne hanno promosso l'utilizzazione in campo nutraceutico, cosmetico e farmaceutico e che possono essere, a loro volta, utilizzati come materiali di partenza per l'ottenimento di nuovi prodotti di interesse industriale. Le metodologie di estrazione ed isolamento di tali fenoli sono già note e ne permettono l'ottenimento per alcuni di essi anche in notevoli quantità.

L'attività svolta può essere divisa in tre parti:

1) Utilizzazione del dimetil carbonato (DMC).

Inizialmente è stato condotto uno studio volto allo sviluppo di nuove procedure di protezioni chemoselettive dei composti fenolici utilizzati, per evitare eventuali reazioni competitive negli steps successivi. In particolare, impiegando il dimetil carbonato (DMC), un reagente/solvente ecocompatibile e non tossico, sono state messe a punto metodologie di metilazione di flavonoidi naturali (flavoni) e di carbossimetilazione selettiva di funzioni alcoliche presenti in composti fenolici. Alcuni dei composti ottenuti dalla protezione con DMC presentano un'importanza biologica per la loro attività antiossidante unitamente ad un'elevata stabilità metabolica. Il sistema di carbossimetilazione selettiva con DMC è stato esteso anche ad altri composti contenenti più gruppi funzionali.

Lo studio delle protezioni selettive è proseguito con l'esterificazione di molecole fenoliche, impiegando il DMC come solvente, per l'ottenimento di derivati lipofili di interesse cosmetico e farmaceutico.

2) Messa a punto dei processi ossidativi chimici con IBX e DMP.

L'attenzione è stata rivolta alla messa a punto delle condizioni sperimentali per l'impiego di reagenti chimici biomimetici appartenenti alla famiglia dello iodio ipervalente (V), in particolare l'acido 2-iodossibenzoico (IBX) e il reattivo di Dess-Martin (DMP), per l'ottenimento di derivati catecolici dotati di attività antiossidante, quali l'idrossitirosolo e suoi derivati lipofili; il piceatannolo e derivati lipofili; i flavoni e flavanoni; gli 1-arilsocromani.

Sono stati condotti anche studi sull'impiego dell'IBX supportato su polistirene, per coniugare la chimica ossidativa dell'IBX con i vantaggi delle reazioni in fase eterogenea quali la possibilità di semplificare il work-up di reazione e di riciclare il reattivo e migliorare l'economicità e l'ecocompatibilità del processo.

3) Reazioni di ossidazione con il sistema O₂/Laccasi/HBT.

Il sistema O₂/laccasi/mediatore (HBT) è stato impiegato per l'ossidazione della posizione benzeleterea degli 1-arilsocromani e benzilica delle catechine ottenendo fine-chemicals e composti ad attività chemopreventiva, quali i derivati della taxifolina e i precursori delle proantocianidine.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Metilazione dei flavoni

3.1.1 Flavoni metilati: attività biologiche

Studi *in vitro* riportati in letteratura mostrano che flavonoidi e altri polifenoli presenti negli alimenti di origine vegetale prevengono la carcinogenesi intervenendo sia nella fase di iniziazione che in quella di promozione del tumore. Tuttavia, studi *in vivo* condotti su animali e specialmente sull'uomo, impiegando dosi tollerabili di polifenoli, hanno disatteso queste speranze. Ciò è da imputare alla scarsa biodisponibilità dei polifenoli assunti per via orale, nello specifico alla loro incapacità di passare nel sistema circolatorio attraversando inalterati la barriera epatica ed intestinale. Nell'uomo, l'assenza di biodisponibilità dopo somministrazioni orali è stata verificata direttamente per alcune sostanze fenoliche, quali crisina, quercetina, curcumina e resveratrolo. I flavonoidi del té, gli isoflavonoidi, la genisteina mostrano invece, biodisponibilità orale anche se bassa. La presenza di ossidrili liberi nella struttura dei polifenoli, infatti, aumenta la rapida coniugazione epatica/intestinale mediante reazioni di solfatazione e glucuronilazione, causandone l'escrezione.⁹³ Recentemente è stata studiata l'elevata stabilità metabolica e il trasporto intestinale di flavoni totalmente metossilati.⁹⁴ E' stato anche dimostrato che composti contenenti solo uno o due gruppi metossilici sono molto più stabili metabolicamente dei corrispondenti composti polimetossilati. Anche se alcuni di questi fenoli protetti sono presenti nelle piante, finora hanno attratto un modesto interesse come potenziali agenti chemopreventivi. Una ragione è la loro scarsa attività antiossidante che, in generale, è associata ai gruppi ossidrilici liberi. Tuttavia, come detto già precedentemente, non è questo l'unico requisito con cui i polifenoli esplicano la loro azione. Studi *in vitro* hanno mostrato, ad esempio che il 5,7-dimetossi flavone, uno dei principali costituenti delle foglie di *Piper caninum* e *Leptospermum scoparium* e il 3',4'-dimetossi flavone, presente nelle foglie di *Primula veris* L., inibiscono la fase di iniziazione del cancro ai polmoni evitando la bioattivazione del benzo-[a]-pirene (BaP) alla forma che lega il DNA, attivata da enzimi quali il citocromo P450 (CYP) 1A1, 1B1, e l'epossido idrolasi microsomiale (mEH). Questi flavonoidi prevengono l'attivazione di CYP1A1, forma principalmente espressa per esposizione al BaP nelle cellule epiteliali

bronchiali umane con un'efficienza paragonabile al *trans*-resveratrolo, con il vantaggio principale che essi mostrano una maggiore biodisponibilità.⁹⁵

Ulteriori ricerche hanno mostrato che i fenoli metossilati agiscono anche nella fase di promozione del cancro inibendo la proliferazione cellulare. Il 5,7,4'-trimetossiflavone, ad esempio, è otto volte più potente del corrispondente composto ossidrilato (apigenina) nell'azione antiproliferativa di cellule tumorali. Analoghi risultati sono stati ottenuti per il 5,7-dimetossiflavone per confronto con la crisina. Il 7-metossiflavone e il 7,4'-dimetossiflavone sono, invece, attivi contro i tumori legati all'attività ormonale. Essi inibiscono l'aromatasi, l'enzima responsabile della conversione di testosterone a estradiolo.⁹⁶ Il 3,6-dimetossiflavone possiede una spiccata attività contro il tumore al seno a concentrazioni in cui non sono riscontrabili effetti citotossici.⁹⁷ Altri flavoni metossilati hanno proprietà antifungine.⁹⁸ Questi dati evidenziano l'importanza dei flavoni metossilati e inducono i chimici a mettere a punto nuove sintesi o modificazioni chimiche di tali composti.

3.1.2 Metilazione dei flavonoidi

La *O*-metilazione dei flavonoidi è una comune trasformazione xenobiotica che avviene nelle piante, nei microbi e nei mammiferi a carico di alcuni enzimi tra cui le *O*-metil trasferasi (OMTs), dotati di elevata.^{99,100} Chimicamente, la *O*-metilazione può essere condotta con reagenti quali il dimetil solfato¹⁰¹ o lo ioduro di metile¹⁰² che danno risultati quantitativi in termini di conversione e resa ma che sono altamente tossici o addirittura cancerogeni. Recentemente l'attenzione è stata rivolta allo sviluppo di metodologie di metilazione alternative, efficienti e al tempo stesso a basso impatto ambientale. Tra queste emergono quelle che impiegano il dimetil carbonato (DMC, **Figura 21**) come reagente metilante.

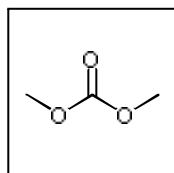
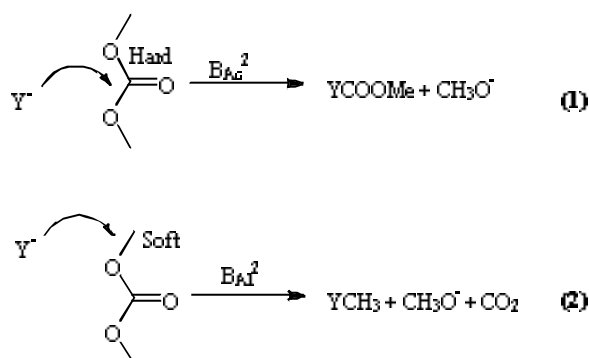


Figura 21. Struttura chimica del DMC.

3.1.3 Il dimetil carbonato (DMC)

I primi lavori che descrivono l'uso del DMC risalgono agli anni '50 e sono relativi alla sintesi del difenil carbonato, utilizzato per la produzione di policarbonati aromatici. Inizialmente il DMC veniva prodotto per reazione tra il fosgene, un reagente altamente tossico, ed il metanolo. Successivamente, per ridurre l'impatto ambientale del processo sintetico, Enichem ha sviluppato una tecnologia basata sulla ossicarbonilazione del metanolo, impiegando cloruro rameoso come catalizzatore.¹⁰³

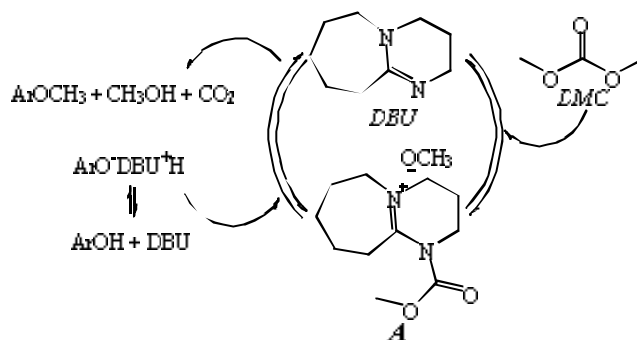
Il DMC presenta alcune peculiari caratteristiche che lo rendono ecocompatibile. Infatti è biodegradabile, non tossico e non presenta effetti irritanti o mutageni nè per contatto nè per inalazione. La maggior parte della letteratura disponibile attualmente sul DMC lo vede impiegato come agente metilante in sostituzione dello ioduro di metile e del dimetil solfato e come agente carbonilante, in alternativa al fosgene. Tuttavia, a causa della presenza di centri reattivi elettrofili rappresentati dai due gruppi metilici e dal gruppo carbonilico è possibile condurre, oltre a reazioni di metilazione, anche reazioni di carbossimetilazione in presenza di un nucleofilo (**Schema 22**).¹⁰⁴



Schema 22. Attacco nucleofilo al DMC.

Il verificarsi di una o dell'altra reazione dipende dalle condizioni sperimentali e dal tipo di nucleofilo. Generalmente, la reazione di carbossimetilazione **(1)** avviene con un meccanismo bimolecolare base catalizzato, con rottura del gruppo acilico, alla temperatura di riflusso del DMC ($T=90^\circ\text{C}$). La metilazione **(2)**, invece, avviene a temperature più elevate, con un meccanismo del tutto analogo e con rottura del gruppo alchilico. Proprio per il fatto che la metilazione avviene a temperature più elevate di quella di ebollizione del DMC, è necessario condurla in autoclave o con la tecnologia Gas Liquid Phase Transfer Catalysis (GL-PTC),¹⁰⁵ oppure in presenza di carbonati asimmetrici aventi una maggiore temperatura di

ebollizione.¹⁰⁶ La ricerca di condizioni di reazione meno drastiche ha introdotto l'impiego della 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), un catalizzatore basico. Si riporta nello **Schema 23** il meccanismo di metilazione di fenoli che avviene alla temperatura di riflusso del DMC.¹⁰⁷



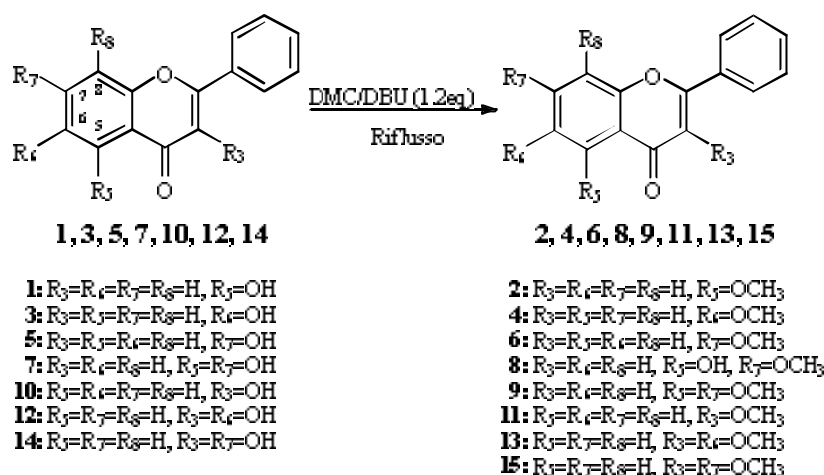
Schema 23. Ciclo catalitico di metilazione di fenoli con DMC e DBU.

In questo ciclo catalitico, la DBU reagisce con il DMC generando l'agente metilante più attivo **A** che presumibilmente riduce l'energia di attivazione richiesta per la metilazione.¹⁰⁸ Purtroppo, l'impiego di quantità catalitiche di DBU allunga i tempi di reazione perchè i substrati fenolici consumano la base formando i corrispondenti fenolati e riducendo la quantità di DBU libera in grado di formare l'intermedio catalitico. Il miglior compromesso tra il requisito di "atom economy" e quello della massima efficienza del processo si raggiunge utilizzando quantità stechiometriche di DBU.¹⁰⁶

3.1.4 Metilazione di flavoni con DMC

Considerata l'esperienza maturata dal gruppo di ricerca sulla chimica ossidativa dei flavonoidi,^{56, 109} che spesso richiedeva la protezione degli ossidrili liberi, e l'elevato valore aggiunto dei prodotti metilati, si è pensato di mettere a punto una metodologia di metilazione efficiente e soprattutto ecocompatibile, impiegando il DMC. Risultati soddisfacenti sono stati ottenuti con i flavoni e i flavonoli (**Schema 24**).

Le reazioni sono state condotte impiegando il DMC come reagente/solvente in presenza di un leggero eccesso di DBU, alla temperatura di riflusso. Le condizioni sperimentali sono riportate nella **Tabella 3**.



Schema 24. Reazione di metilazione di flavoni e flavonoli con DMC/DBU.

Substrato	Tempo (h)	Conversione (%)	Resa (%)
1	48	> 98	2: > 98
3	48	> 98	4: > 98
5	10	> 98	6: > 98
7	48	> 98	8: 30 9: 70
7	54	> 98	9: > 98
10	30	> 98	11: > 98
12	24	> 98	13: > 98
14	24	> 98	15: > 98

Tabella 3. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 24**.

Per tutti i substrati le conversioni e le rese sono risultate quantitative. Si è notata una discreta selettività nel caso del 5,7-diidrossiflavone **7** tra le due posizioni ossidrilate per effetto del legame idrogeno che rende meno reattiva la posizione 5, come del resto evidenziato per il 5-idrossiflavone **1** che ha richiesto tempi lunghi (48 h). Dopo 54 h è stato possibile, però ottenere il composto totalmente metilato **9**. L'analisi dei tempi di reazione ha mostrato che il flavone più reattivo è il 7-idrossiflavone **5**. Per i flavonoli (substrati **10**, **12**, **14**) non è stata osservata selettività tra gli ossidrili, fenolico ed enolico. Gli unici prodotti osservati sono stati quelli di completa metilazione.

3.2 Protezioni selettive di funzioni alcoliche

3.2.1 Generalità

L'appropriata introduzione e rimozione di gruppi protettori è una importante trasformazione in chimica organica sintetica. Tali protezioni, per essere utili, devono procedere con rese e selettività elevate; inoltre, il gruppo introdotto deve essere stabile ma all'occorrenza facilmente rimovibile. I gruppi protettori non solo bloccano temporaneamente i siti reattivi ma possono anche modificare la reattività intrinseca dei substrati e le loro caratteristiche chimico-fisiche.¹¹⁰

La letteratura ci offre numerose metodologie di protezione per i diversi gruppi funzionali, tuttavia, quando si lavora con molecole polifunzionali, solo alcune di queste procedono chemoselettivamente su un determinato gruppo funzionale.¹¹¹ Spesso si ricorre agli enzimi che presentano proprietà intrinseche di chemoselettività, regioselettività e stereoselettività; essi però richiedono ambienti di reazione controllati che ostacolano la loro applicabilità ad intere categorie di composti.

Per i gruppi ossidrilici, le reazioni di protezione più impiegate si basano sull'esterificazione, la formazione di silileteri, di alchil eteri,¹¹² ma sono riportati solo pochi esempi di trasformazioni in grado di discriminare gli ossidrili alcolici da quelli fenolici.^{113,114}

Una parte del presente lavoro di tesi ha riguardato la messa a punto di metodologie di protezione selettiva di questi gruppi funzionali con il duplice scopo di derivatizzare la funzione alcolica spesso competitiva con quella fenolica nei processi sintetici, e aumentare la lipofilità e di conseguenza la biodisponibilità di alcune molecole di interesse biologico, estendendo il loro campo di applicabilità.

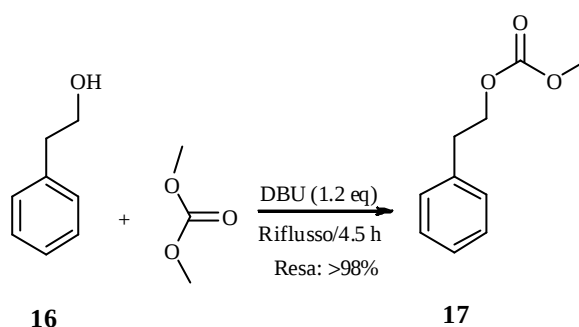
3.2.2 Carbossimetilazione selettiva con DMC

Gli alchil carbonati sono i principali gruppi protettori delle funzionalità alcoliche, solitamente introdotti via aloformati impiegando le condizioni di Schotten-Bauman.¹¹⁵ I carbonati hanno dimostrato una elevata selettività nella regioselettiva monoprotezione di dioli e polioli. La nostra attenzione si è rivolta al dimetil carbonato le cui caratteristiche reattive sono già state rese note (cap. 3, par. 1.3).

In letteratura è riportato che gli alcoli reagiscono con il DMC dando prodotti di transesterificazione anche a 180°C;¹¹⁶ solo in presenza di ammine terziarie (dimetilamminopiridina, 1,4-diazobicyclo[2,2,2]ottano) sono descritte reazioni di metilazione.¹¹⁷ I gruppi fenolici invece, sono facilmente metilati alla temperatura di riflusso in

presenza di DBU.¹⁰⁷ Si è, dunque, pensato di impiegare il sistema DMC/DBU per mettere a punto una metodologia di protezione selettiva della funzione alcolica rispetto a quella fenolica.^{118, 119, 120, 121}

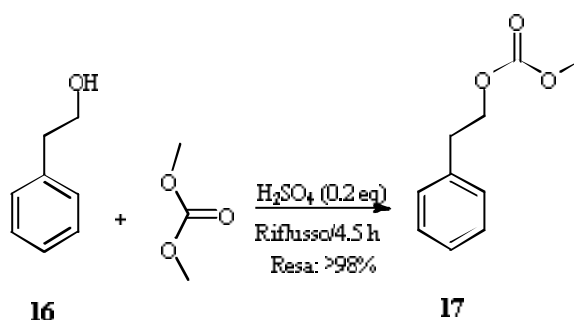
Inizialmente è stata provata l'efficienza del sistema DMC/DBU nelle carbossimetilazioni della funzione alcolica impiegando come substrato il 2-feniletanolo **16** (**Schema 25**).



Schema 25. Reazione di carbossimetilazione del 2-feniletanolo in ambiente basico.

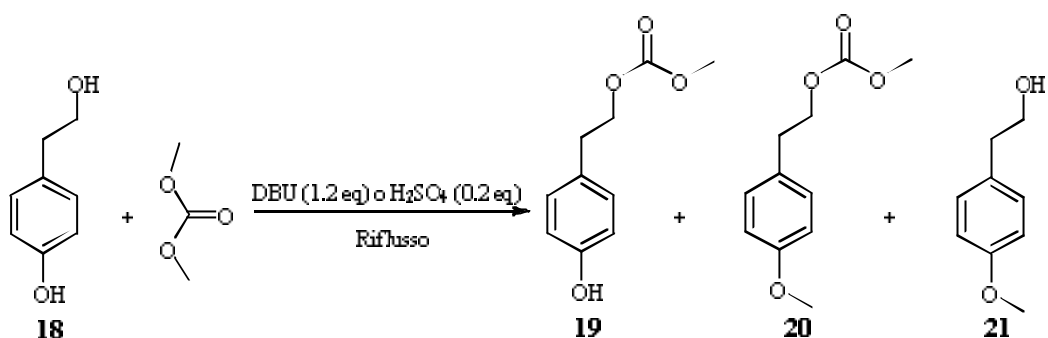
I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti; la reazione è risultata quantitativa in termini di conversione e resa in tempi brevi (4.5 h).

In letteratura è riportato solamente un esempio di reazione di transesterificazione tra alchil carbonati e dioli con catalisi acida.¹²² Si è pensato dunque di applicare la metodologia anche in ambiente acido per acido solforico. I risultati ottenuti sono stati analoghi a quelli della reazione condotta in ambiente basico (**Schema 26**).



Schema 26. Reazione di carbossimetilazione del 2-feniletanolo in ambiente acido.

Vista l'efficienza del metodo, abbiamo pensato di testare la chemoselettività della metodologia di protezione, prendendo come substrato modello il tirosolo **18** che presenta entrambe le funzionalità reattive, quella fenolica e quella alcolica (**Schema 27, Tabella 4**).



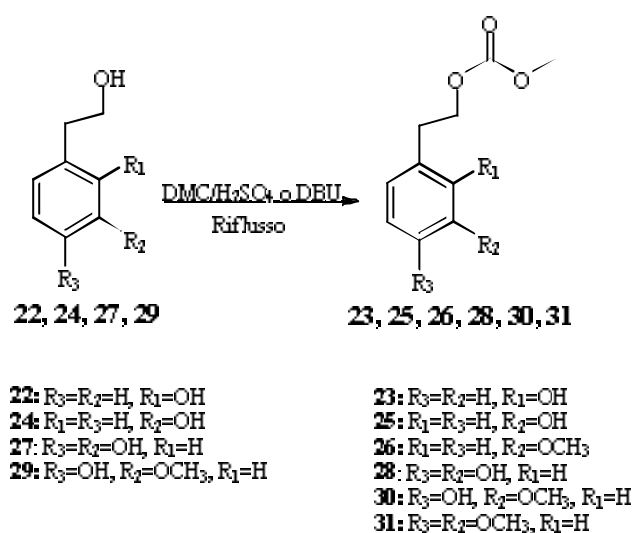
Schema 27. Reazione di carbossimetilazione del tirosolo **18**.

Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
H ₂ SO ₄ (0.2 eq), 7h	> 98	19 : >98
H ₂ SO ₄ (0.2 eq), 24h	> 98	19 : >98
DBU (1.2 eq), 7.5h	> 98	19 : >98
DBU (1.2 eq), 16h	> 98	20 : >98
DBU (1.2 eq), 24h	> 98	20 : 80, 21 : 20
DBU (0.1 eq), 12h	> 98	19 : >98

Tabella 4. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 27**.

Dalle prove sperimentali è emerso che, in ambiente acido, anche allungando i tempi di reazione, è stata ottenuta solo la protezione selettiva della funzione alcolica a dare il prodotto di carbossimetilazione **19**. Più interessante è, invece, risultata la reazione condotta in ambiente basico. Infatti, agendo sui tempi di reazione, è stato possibile modulare la reattività del sistema. Dopo 7 h, si è osservata la protezione dell'ossidrile alcolico (prodotto **19**); allungando i tempi a 16 h la reazione è proceduta verso l'ossidrile fenolico, portando al composto **20**; infine, a 24 h, si è ottenuto anche il prodotto **21**, derivante dalla deprotezione selettiva della funzione alcolica. E' stata condotta anche una reazione con quantità catalitiche di DBU. In tal caso, è stato ottenuto il prodotto **19** in tempi di reazione più lunghi (12 h). E' interessante notare, inoltre, che, in nessuno dei casi analizzati, l'ossidrile fenolico è stato carbossimetilato. A differenza dell'acido, la DBU, è responsabile anche della deprotezione del gruppo alcolico.

Considerando gli interessanti risultati ottenuti, l'originalità e la semplicità della metodologia sviluppata, questo studio è stato esteso ad una serie di composti caratterizzati dalla presenza, nella loro struttura, di centri reattivi alcolici e fenolici (**Schema 28**, **Tabella 5**).



Schema 28. Reazioni di carbossimetilazione di fenoli con DMC.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
22	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/1,5 h	>98	23: 90
22	DBU (1.2 eq)/2h	>98	23: >98
22	DBU (1.2 eq)/24h	>98	---
24	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/4,5h	>98	25: >98
24	DBU (1.2 eq)/4.5h	>98	25: >98
24	DBU (1.2 eq)/20h	>98	26: >98
27	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/6,5h	>98	28: >98
27	DBU (1.2 eq)/1h	>98	28: >98
27	DBU (1.2 eq)/24h	>98	---
29	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/7h	>98	30: >98
29	DBU (1.2 eq)/7.5h	>98	30: >98
29	DBU (1.2 eq)/41h	>98	31: 75

Tabella 5. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 28**.

I risultati sperimentali hanno mostrato che le reazioni di carbossimetilazione e/o metilazione sono procedute con risultati paragonabili a quelli ottenuti con il substrato modello, sia in ambiente acido che basico. Eccezioni sono risultati il 2-idrossifenetil alcol **22** e l'idrossitirosolo **27** dai quali, dopo reazione di carbossimetilazione, sono state ottenute miscele complesse di prodotti.

Tra i substrati utilizzati, di particolare interesse sono l'idrossitirosolo **27** e l'alcol omovanillico **29**, sostanze naturali presenti negli scarti della lavorazione delle olive, dotati di

attività antiossidante e di scavenger di radicali liberi. Considerando che i composti carbossimetilati **28** e **30** sono molecole nuove, è stata misurata l'attività di radical scavenger per un confronto con i substrati di partenza **27** e **29** (**Tabella 6**). E' stato utilizzato il metodo spettrofotometrico Uv-Vis della 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH, **Figura 22**),¹²³ un radicale libero che in metanolo forma una soluzione colorata di viola, mentre la sua forma ridotta è incolore. Questo metodo sfrutta la capacità dei composti dotati di attività antiossidante di neutralizzare i radicali liberi reattivi, convertendoli in radicali liberi stabili o composti neutri. Per via spettrofotometrica si misura il decremento di assorbanza della DPPH, a intervalli di tempo fino al raggiungimento del plateau, a concentrazioni fisse di antiossidante. Il parametro indicativo dell'attività del campione è l'EC₅₀ che esprime la quantità di antiossidante necessaria a ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH.

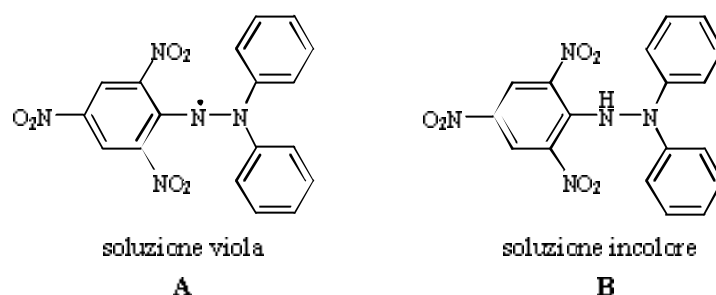


Figura 22. Strutture della DPPH (A) e della DPPH ridotta (B).

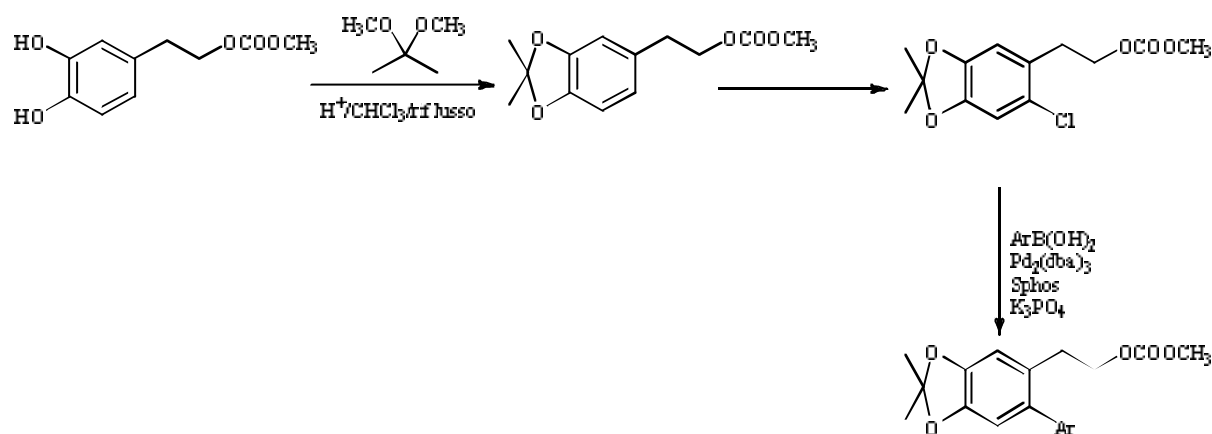
Composto	EC ₅₀ (lineare) (mmol composto/mmol di DPPH)	EC ₅₀ Lineare (μM)
Idrossitirosolo 27	0.15	9.0±0.58
Idrossitirosolo carbossimetilato 28	0.11	6.6±0.30
Alcol omovanillico 29	0.22	13±0.60
Alcol omovanillico carbossimetilato 30	0.22	14±0.70

Tabella 6. Dati di attività antiossidante con il metodo della DPPH.

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'introduzione del gruppo carbossimetilico non ha variato in maniera significativa l'attività antiossidante dei prodotti di partenza. I nuovi composti **28** e **30**, per effetto del gruppo protettore introdotto, presentano, però, una maggiore lipofilità, proprietà che aumenta la biodisponibilità e che può consentire un possibile impiego in campo alimentare e cosmetico. Sull'idrossitirosolo carbossimetilato **28** sono stati inoltre condotti, saggi di attività antitumorale, impiegando cellule di carcinoma polmonare e

di melanoma, presso l'Istituto di Neurobiologia del CNR di Roma. Risultati preliminari hanno mostrato che tale prodotto inibisce la crescita cellulare in maniera significativamente più sensibile dell'idrossitirosolo **27**.

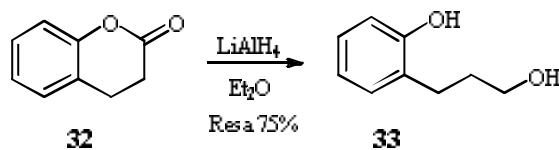
Nell'ambito di una collaborazione scientifica in atto tra il nostro gruppo di ricerca e quello dei Prof.ri S. Cacchi e G. Fabrizi del Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive della Sapienza Università di Roma, tale composto è stato impiegato come materiale di partenza nelle reazioni di cross-coupling Suzuki-Miyaura per la preparazione di un ampio numero di nuovi derivati dell'idrossitirosolo caratterizzati dalla presenza di una funzionalità arilica sull'anello aromatico. Un esempio è riportato nello **Schema 29**¹²⁴



Schema 29. Reazione di cross-coupling dell'idrossitirosolo tramite reazioni Pd-catalizzate.

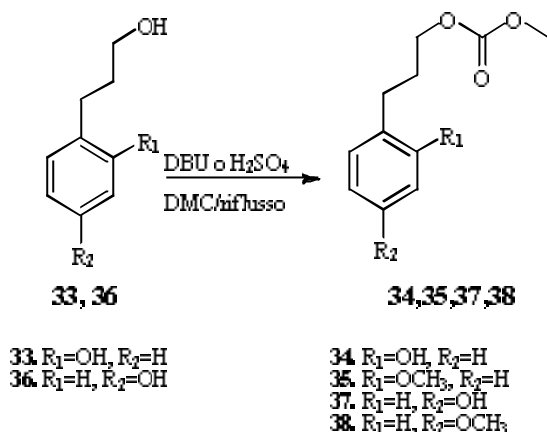
La metodologia di carbossimetilazione selettiva della funzione alcolica è stata applicata anche a fenoli con catena alcolica più lunga.

Non essendo disponibile in commercio, è stato necessario sintetizzare il 3-(2-idrossifenil)-1-propanolo **33** per riduzione della 3,4-diidrocumarina **32**, seguendo una procedura riportata in letteratura (**Schema 30**).¹²⁵



Schema 30. Sintesi del 3-(2-idrossifenil)-1-propanolo.

I risultati delle reazioni di carbossimetilazione sono riportati nello **Schema 31**, **Tabella 7**.



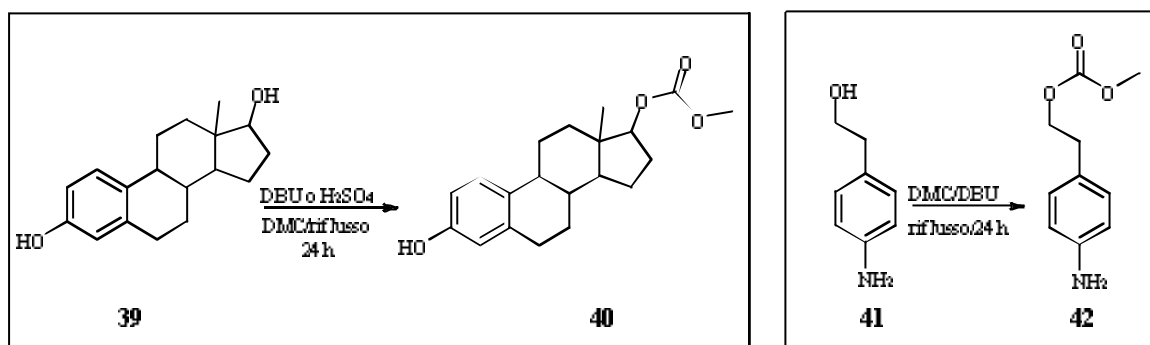
Schema 31. Reazione di carbossimetilazione di idrossifenil-1-propanoli con DMC.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
33	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/4h	>98	34: >98
33	DBU (1.2 eq)/4h	>98	34: >98
33	DBU (1.2 eq)/20h	>98	35: >98
36	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/5,5h	>98	37: >98
36	DBU (1.2 eq)/5,5h	>98	37: >98
36	DBU (1.2 eq)/90°C/21h	>98	38: >98

Tabella 7. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 31**.

Anche in questo ultimo caso le reazioni hanno portato a rese quantitative dei prodotti carbossimetilati. Come già descritto per il tirosolo **18**, l'idrolisi basica, condotta con KOH (1 M) in THF a temperatura ambiente, ha consentito la rimozione quantitativa del gruppo protettore introdotto. Inefficace, è risultata l'idrolisi acida per HCl o H₂SO₄.

E' stato iniziato anche uno studio sulla selettività di protezione del DMC verso altre classi di composti contenenti vari gruppi funzionali. A questo proposito sono stati presi come substrati l'estradiolo **39** e il 2-(4-aminofenil) etanolo **41** (**Schema 32**, **Tabella 8**), ottenendo risultati soddisfacenti.



Schema 32. Reazioni di carbossimetilazione.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
39	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)	>98	40: >98
39	DBU (1.2 eq)	>98	40: >98
41	DBU (1.2 eq)	>98	42: >98

Tabella 8. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 32**.

Con il substrato **41** non è stato possibile condurre la reazione in ambiente acido, per formazione di un sale insolubile con il gruppo aminico.

Per concludere, questi risultati hanno evidenziato una nuova procedura, semplice ed ecocompatibile, per la protezione chemoselettiva di gruppi alcolici in molecole polifunzionali. La maggior parte delle reazioni è proceduta in maniera quantitativa consentendo il recupero del prodotto puro senza ricorrere a purificazioni cromatografiche.

3.2.3 Esterificazioni selettive di ossidrili alcolici in DMC

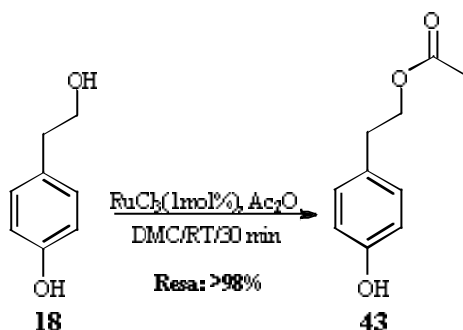
L'esterificazione è una delle reazioni più usate per la protezione di ossidrili. In letteratura sono riportate numerose applicazioni estese anche a livello industriale. Tuttavia, se le molecole organiche presentano altri gruppi funzionali in grado di competere con le funzioni ossidriliche, la reazione tende a dare miscele di prodotti di mono e poli-esterificazione.¹¹³ Alcuni esempi di esterificazione selettiva sono basati sull'impiego di enzimi, soprattutto lipasi ed esterasi,¹²⁶ sia per reazioni chemoselettive dirette, che come agenti di rimozione selettiva delle protezioni.^{127, 128}

I più comuni reagenti chimici usati per le acilazioni sono gli alogenuri acilici e le anidridi, che in ambiente basico per piridina o trietilamina/DMAP, non sono selettivi. Una bassa selettività si riscontra impiegando anidride acetica in presenza di triflato di rame [Cu(OTf)₂] come catalizzatore.¹²⁹ Sono stati sviluppati sistemi di esterificazione selettiva tra alcoli e acidi

impiegando la reazione di Mitsunobu che riduce le difficoltà legate alla reversibilità del processo di Fischer.¹³⁰ L'esterificazione condotta con acidi di Lewis procede con elevata selettività tra alcoli e fenoli. L'afnio cloruro, ad esempio, è ritenuto un eccellente catalizzatore di ossidrili alifatici con una selettività maggiore di 99:1 in presenza di gruppi fenolici. L'elevata chemoselettività osservata è attribuita alla bassa basicità e nucleofilicità dell'ossigeno fenolico (K_b del fenolo è circa 10^6 volte più bassa di quella del metanolo) in reazioni che coinvolgono molecole neutre catalizzate da acidi di Lewis o protici; viceversa, la presenza di catalizzatori basici altera la chemoselettività.¹¹³ Analoghi risultati sono riportati impiegando sali di lantanidi,¹³¹ cerio (III) cloruro¹¹³, cerio triflato.¹³²

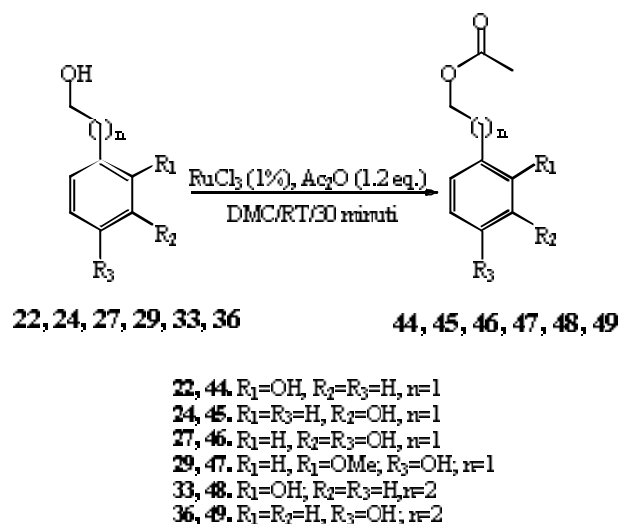
In letteratura è riportato che il rutenio (III) cloruro è un buon catalizzatore per l'esterificazione sia di ossidrili alcolici che di ossidrili fenolici con anidride acetica.¹³³ In questa tesi, tale metodologia è stata studiata in termini di chemoselettività utilizzando come solvente di reazione il DMC invece dell'acetonitrile.

Nello **Schema 33** sono riportate le condizioni sperimentali e i risultati ottenuti. In tempi brevi è stata ottenuta una selettività totale con una resa quantitativa del corrispondente prodotto acetilato **43**.



Schema 33. Reazione di acetilazione chemoselettiva del tirosolo con RuCl_3 .

Anche in questo caso, verificata la selettività della reazione, la metodologia è stata estesa, con successi, a substrati analoghi di interesse per il proseguimento della presente ricerca (**Schema 34, Tabella 9**).



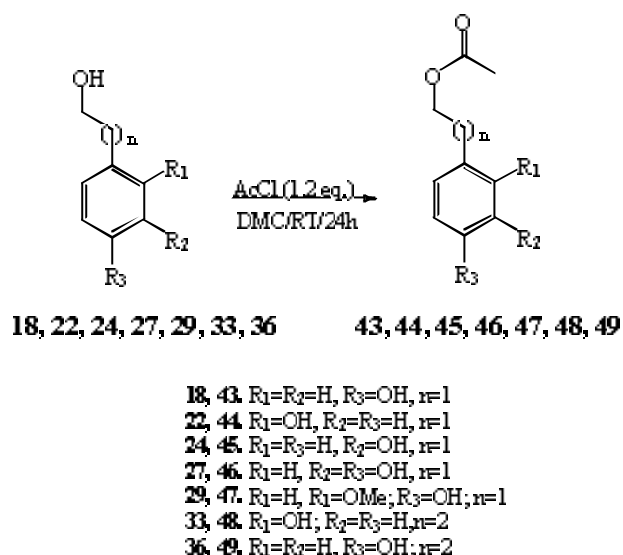
Schema 34. Reazioni di acetilazione chemoselettiva con $RuCl_3$.

Substrato	Conversione (%)	Resa (%)
22	>98	44: 85
24	>98	45: 91
27	>98	46: 75
29	>98	47: 95
33	>98	48: 90
36	>98	49: 80

Tabella 9. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 34**.

Come già detto, in letteratura è riportato che i cloruri acilici, in presenza di un opportuno acido protico o di Lewis, portano all'esterificazione selettiva degli alcoli. Tali agenti acilanti, però, sono facilmente idrolizzati e richiedono dunque condizioni di reazione anidre.

Continuando la ricerca di condizioni di reazione semplici e pratiche, nel presente lavoro si è sfruttata l'idrolisi dei cloruri acilici per effetto dell'umidità, in assenza di condizioni anidre, per produrre la quantità di HCl necessaria a catalizzare la reazione di protezione selettiva degli alcoli (**Schema 35**).



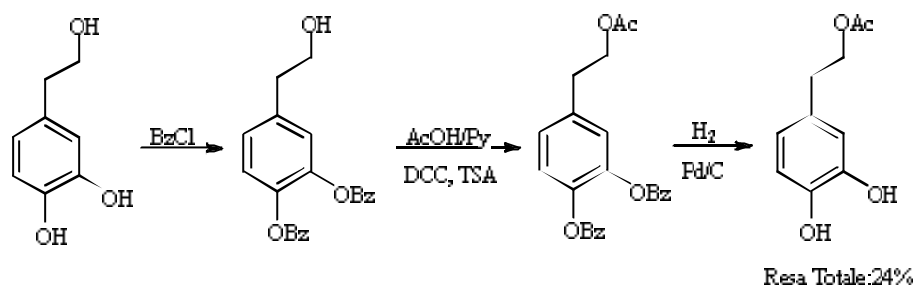
Schema 35. Reazione di acetilazione selettiva con AcCl.

Substrato	Conversione (%)	Resa (%)
18	80	43: 80
22	>98	44: > 98
24	86	45: 86
27	95	46: 95
29	>98	47: 95
33	90	48: 90
36	91	49: 91

Tabella 10. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 35**.

La **Tabella 10** mostra che, per tutti i substrati, l'acetilazione è risultata selettiva; infatti le rese di reazione sono state elevate (80 - >98%).

Tra i prodotti ottenuti, un'attenzione particolare deve essere rivolta all'idrossitirosolo acetato **46**, il più semplice derivato lipofilo dell'idrossitirosolo recentemente identificato nell'olio di oliva.¹³⁴ La sua attività antiossidante è risultata confrontabile a quella dell'idrossitirosolo in oli ed emulsioni. Trova applicazioni come additivo in alimenti (quali burro e latte) e in composizioni farmaceutiche e cosmetiche.¹³⁵ E' importante evidenziare la semplicità della metodologia messa a punto in questa tesi. Infatti, le sintesi chimiche di tale composto descritte in letteratura utilizzano come materia prima di partenza l'idrossitirosolo e prevedono più passaggi che coinvolgono protezioni e deprotezioni degli ossidril alcolici e fenolici.¹³⁴ Un esempio è riportato nello **Schema 36**.



Schema 36. Procedura sintetica per l'ottenimento di idrossitirosolo acetato.

Più recentemente è stata riportata un'esterificazione enzimatica dell'idrossitirosolo con etil acetato come agente acilante e lipasi.

Impiegando catalizzatori acidi (ad esempio, acido solforico o acido *p*-toluensolfonico) o lipasi, ed agenti acilanti a catena lunga, a partire dall'idrossitirosolo, sono stati preparati anche esteri a catena lunga.¹³⁵ Studi di attività antiossidante, effettuati con il metodo spettrofotometrico della DPPH, hanno mostrato che la presenza e la lunghezza della catena non influenza l'attività dell'idrossitirosolo. Essi, inoltre, mostrano una maggiore solubilità, stabilità e attività antiossidante in oli ed emulsioni.¹³⁶ Recentemente è stato riportato che i derivati lipofilici dell'idrossitirosolo e dell'alcol omovanillico trovano applicazioni nel campo delle nanotecnologie per le loro proprietà di "self-organizing".¹³⁷

Considerata, dunque, l'importanza biologica di queste molecole, la metodologia utilizzata per acetilare l'idrossitirosolo, è stata quindi estesa alla classe di composti fenolici, impiegando cloruri acilici a catena lunga satura e insatura (**Schema 37, Tabella 11**). Con tutti i substrati i risultati sono stati soddisfacenti; la metodologia è risultata selettiva con i vari cloruri acilici impiegati.

E' stato infine eseguito uno studio per la deprotezione del gruppo funzionale; sia l'idrolisi basica con KOH, che l'idrolisi acida con HCl, che la riduzione con NaBH₄ in THF hanno portato a conversioni e rese quantitative dei prodotti ossidrilati.

3.3 Messa a punto di processi ossidativi chimici con IBX e DMP: sintesi di idrossitirosolo e derivati a partire da tirosolo o alcol omovanillico.

3.3.1 L'idrossitirosolo

L'idrossitirosolo **27** (2-(3',4'-diidrossifenil)etanolo, **Figura 23**) è un composto *o*-difenolico naturale contenuto nell'olio di oliva,¹³⁸ e nei reflui di lavorazione delle olive, in particolar modo nelle acque di vegetazione.¹³⁹ Deriva dall'idrolisi dell'oleuropeina glicoside ad opera di β -glicosidasi cellulari o tramite catalisi acida durante lo stoccaggio o la pressatura delle olive.¹⁴⁰ Può trovarsi in forma libera o esterificata (**Figura 23**).¹⁴¹ Recentemente, è stato identificato e quantificato anche in alcuni vini italiani bianchi e rossi.¹⁴²

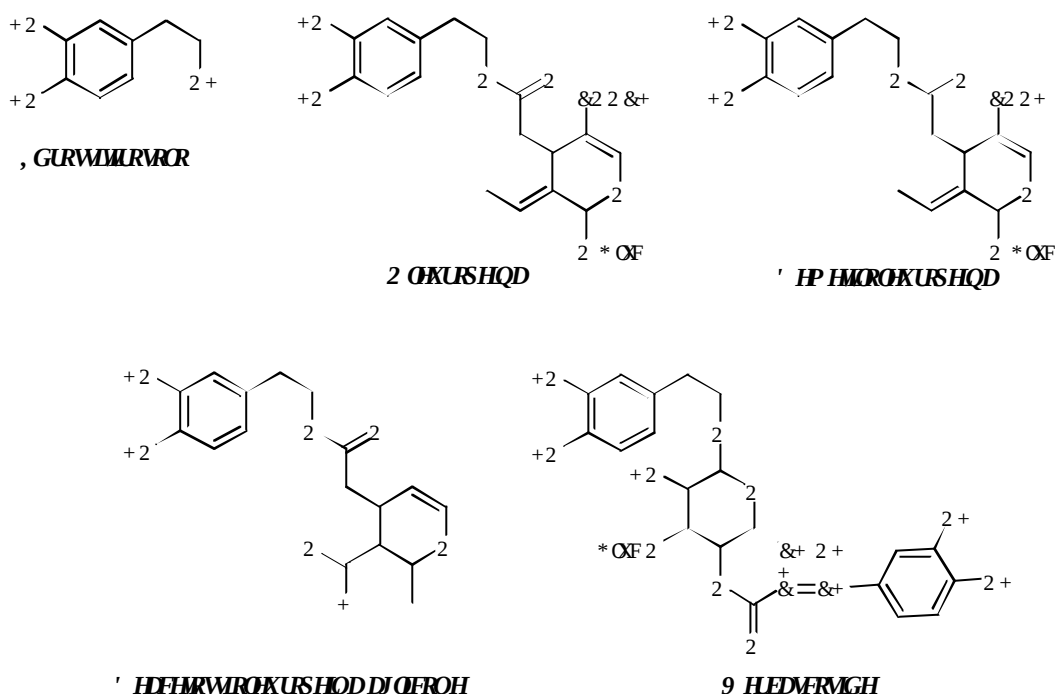


Figura 23. Strutture chimiche dell'idrossitirosolo e suoi precursori e derivati naturali.

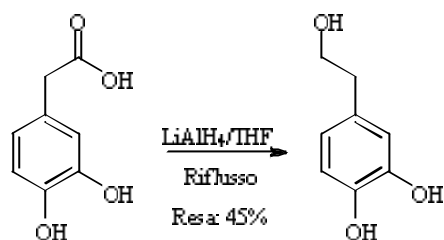
E' già stata descritta la capacità antiossidante e di scavenger di radicali liberi dell'idrossitirosolo attribuibile alla funzionalità *o*-difenolica. Studi *in vivo* eseguiti sui ratti hanno dimostrato che basse dosi di tale composto (0.5 mg/Kg) sono in grado di ridurre sostanzialmente la formazione di prodotti di perossidazione lipidica generati *in vivo* (isoprostani) da uno stress ossidativo (fumo passivo).¹⁴³ L'idrossitirosolo esplica numerose altre attività biologiche: previene alcune patologie cardiovascolari,¹⁴⁴ l'aggregazione piastrinica,¹⁴⁵ il diabete, l'ischemia cerebrale e numerosi disturbi neurodegenerativi.¹⁴⁶ Di

recente è stato utilizzato anche in campo agrochimico per il controllo della crescita di funghi e batteri patogeni.¹⁴⁷ Studi *in vitro* su cellule in cui è stato indotto il processo tumorale, hanno evidenziato come questa molecola agisca da detossificante nei confronti di agenti mutageni, aumentando la capacità della cellula di riparare il proprio patrimonio genetico. E' stato dimostrato, inoltre, che l'idrossitirosolo interviene anche nella fase di promozione del tumore evitando la proliferazione e la mitosi cellulare, oppure favorendo l'apoptosi prima dell'insorgenza della neoplasia vera e propria.¹⁴⁸ Per queste sue importanti proprietà, si presenta come un prodotto di interesse in campo industriale. Malgrado non si sia ancora affermato in campo farmaceutico, sono note applicazioni nel settore cosmetico, come componente di creme protettive per la pelle e di rossetti per labbra;¹⁴⁹ nel settore alimentare, come integratore alimentare o per stabilizzare e migliorare la qualità di alimenti e bevande, in particolare gli oli vegetali. Fino a pochi anni fa l'idrossitirosolo non era disponibile commercialmente; oggi è prodotto da alcune compagnie chimiche ma è commercializzato ancora a prezzi elevati. Considerati questi aspetti la ricerca è stata rivolta alla messa a punto di una metodologia sintetica semplice, ma soprattutto economica, estendibile anche a livello industriale.

3.3.2 Stato dell'arte della produzione di idrossitirosolo.

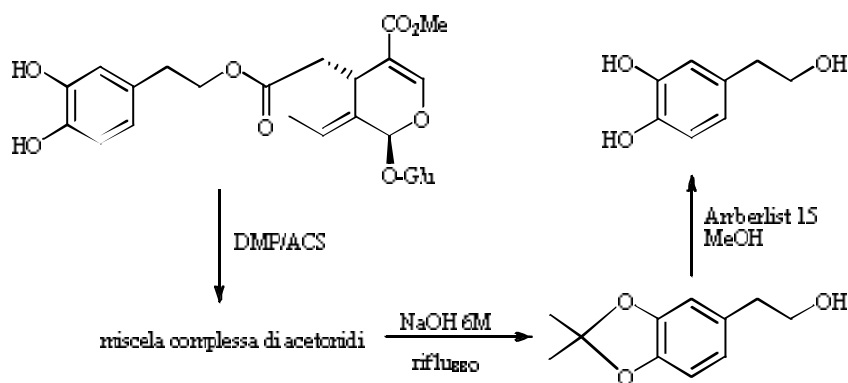
Considerata la sua presenza nelle matrici vegetali, in letteratura sono riportati numerosi protocolli di estrazione dalle olive,¹⁵⁰ dalle foglie d'olivo,¹⁵¹ dall'olio di oliva¹⁵² e dalle acque di vegetazione.^{153, 154} Tali procedure sono spesso laboriose, richiedono l'uso di notevoli quantità di solventi organici nocivi e infiammabili e adeguate apparecchiature di estrazione e di purificazione. Inoltre, in alcuni casi l'idrossitirosolo non è recuperato puro ma in miscela con altri componenti fenolici, in particolare con il tirosolo.

Da un punto di vista sintetico, in letteratura sono riportate alcune procedure che utilizzano come materiali di partenza il 3,4-dimetossifenil etanolo;¹⁵⁵ l'acido 3,4-dimetossifenil acetico;¹⁵⁶ la 3,4-dimetossi benzaldeide.¹⁵⁷ Tuttavia, tali sintesi richiedono molti passaggi e le rese finali di idrossitirosolo non sono elevate. Più convenientemente, può essere preparato per riduzione dell'acido 3,4-diidrossifenil acetico (**Schema 38**). In tal caso, però, è richiesto l'uso di un reagente pericoloso, quale il litio alluminio idruro, e di un solvente anidro, il tetraidrofurano.¹⁵⁸



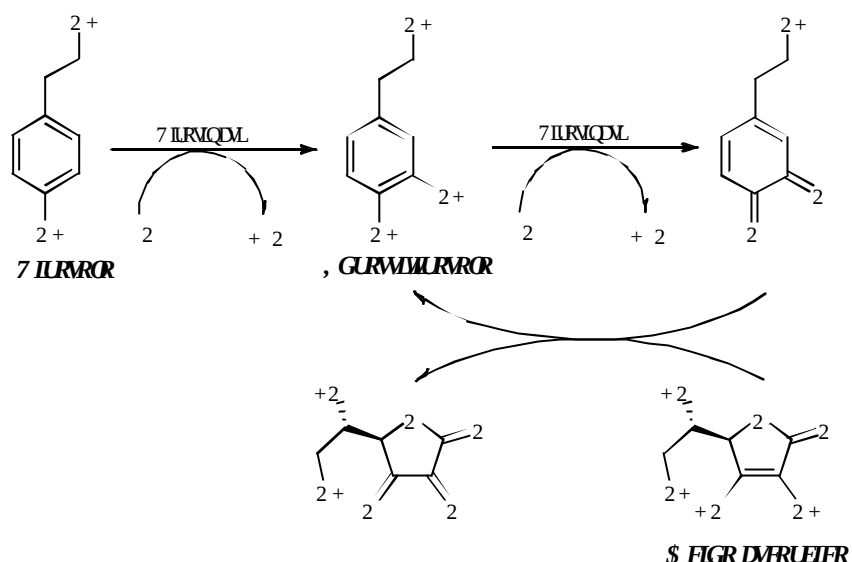
Schema 38. Sintesi dell'idrossitirosolo a partire dall'acido 3,4-diidrossifenilacetico.

Recentemente, sono stati messi a punto alcuni procedimenti sintetici a partire da materiali di partenza contenuti essi stessi nelle foglie di olivo, nell'olio di oliva e nelle acque di vegetazione, quali l'oleuropeina e il tirosolo. Un esempio di utilizzazione dell'oleuropeina descrive una procedura che consente di ottenere una soluzione 0.1 M di idrossitirosolo in acido cloridrico dopo idrolisi basica sotto flusso di azoto e successiva acidificazione dell'idrolizzato.¹⁵⁹ Un esempio più recente di utilizzazione dell'oleuropeina è stata descritta da alcuni di noi ed è riportata nello **Schema 39**.¹⁶⁰ Per stabilizzare la funzione catecolica, inizialmente si è proceduto alla protezione degli ossidrili fenolici, utilizzando il dimetossipropano (DMP) in presenza di acido canforsolfonico (ACS); la successiva idrolisi basica e rimozione del gruppo protettore ha consentito di ottenere idrossitirosolo.



Schema 39. Sintesi di idrossitirosolo a partire dall'oleuropeina.

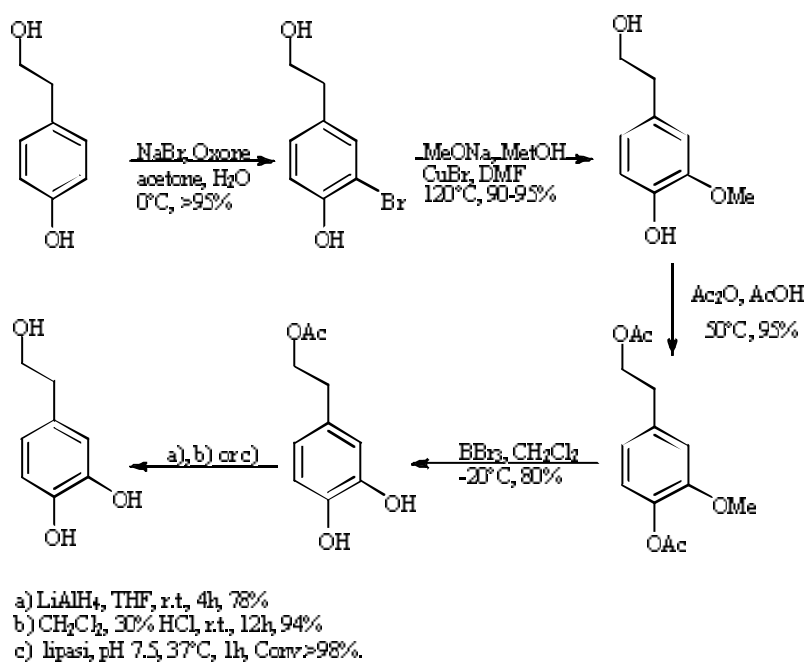
Lavori più recenti hanno impiegato il tirosolo come substrato di partenza per la sintesi di idrossitirosolo. Un'interessante procedura è stata sviluppata sfruttando l'ossidrilazione aromatica operata da una polifenolo-ossidasi, la tirosinasi EC 1.14.18.1, cui segue un work-up riducente in presenza di acido ascorbico (**Schema 40**).¹⁶¹



Schema 40. Sintesi enzimatica dell'idrossitirosolo dal tirosolo.

La sintesi è stata condotta in un mezzo acquoso, a pH neutro e a temperatura ambiente. Tuttavia, sebbene proceda con una resa elevata, per ottenere 1 grammo di idrossitirosolo è necessario utilizzare 1 litro di soluzione acquosa tamponata (circa 0.006 mM).

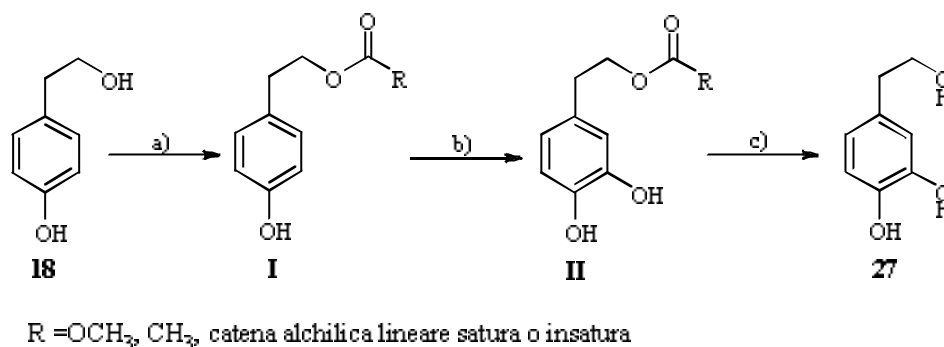
Un'altra sintesi dell'idrossitirosolo a partire dal tirosolo, messa a punto da alcuni di noi (**Schema 41**),¹⁶² pur procedendo con rese soddisfacenti, è di difficile applicazione a livello industriale in quanto richiede molti passaggi, condizioni drastiche di reazione e utilizza reagenti tossici, come il cloruro di metilene e tribromuro di boro.



Schema 41. Sintesi chimica dell'idrossitirosolo dal tirosolo.

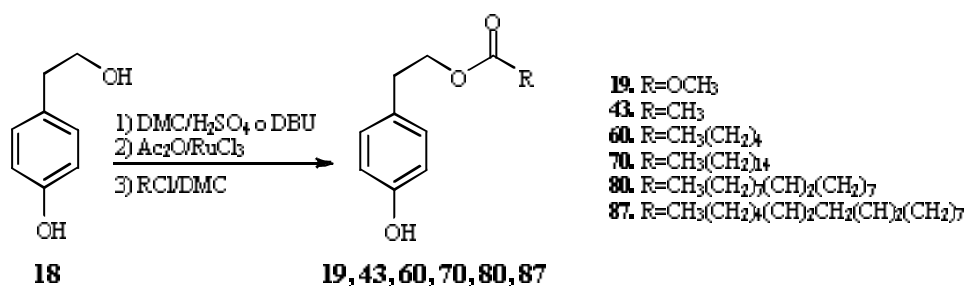
3.3.3 Sintesi di Idrossitirosolo e derivati lipofili con IBX e DMP

La procedura sintetica messa a punto in questa tesi di dottorato è riportata nello **Schema 42**.



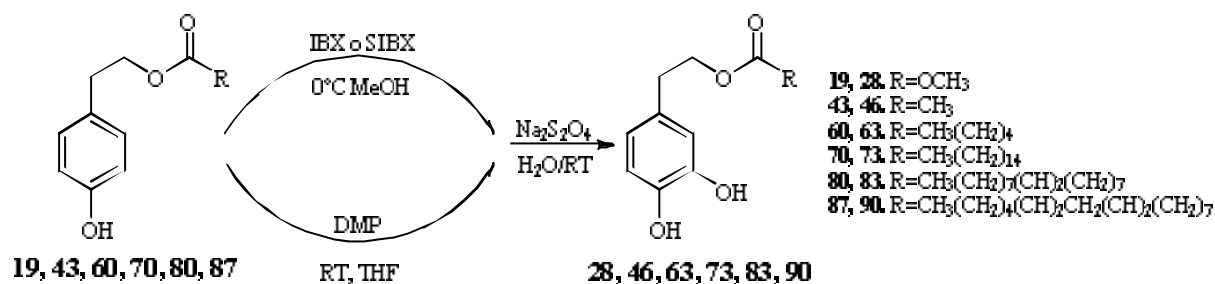
Schema 42. Strategia sintetica dell'idrossitirosolo.

Il punto chiave riguarda il passaggio a), ossia la protezione selettiva della catena alcolica del tirosolo **18** che è stato realizzato impiegando le metodologie di protezione selettiva descritte precedentemente con DMC (Cap. 2, par. 2) (**Schema 43**).



Schema 43. Passaggio a): sintesi di tirosolo protetto.

Il passaggio b) di ossidazione è stato condotto utilizzando IBX o SIBX in metanolo alla temperatura di 0°C oppure DMP in THF a temperatura ambiente. In tutti i casi, al termine dell'ossidazione, si è proceduto ad una fase di riduzione one-pot condotta utilizzando una soluzione acquosa di Na₂S₂O₄ (**Schema 44**).



Schema 44. Passaggio b) sintesi di idrossitirosolo.

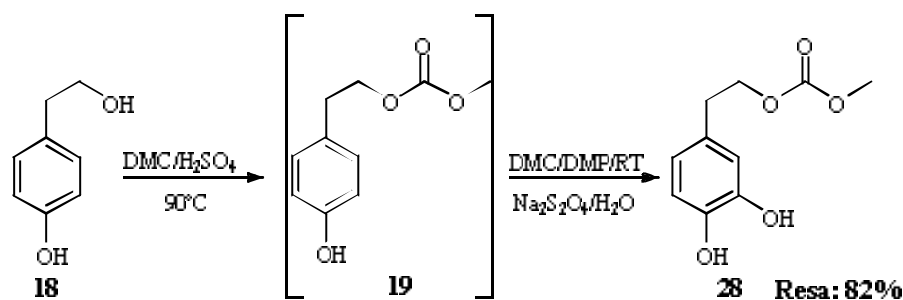
I risultati sperimentali sono riportati in **Tabella 12**.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
19	MeOH/SIBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	28: 85
19	MeOH/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	28: 86
19	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	28: 85
43	MeOH/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	46: 80
43	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	46: 81
60	MeOH/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	63: 84
60	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	63: 82
70	MeOH/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	73: 88
70	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	73: 85
80	MeOH/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	83: 89
80	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	83: 90
87	MeOH/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	90: 73
87	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	90: 77

Tabella 12. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 44**.

Dai risultati si è evidenziato che tutti i reagenti di ossidazione utilizzati hanno mostrato la stessa reattività. Pertanto, in seguito si è deciso di non utilizzare più l'SIBX essendo il reagente più costoso. E' da notare che le rese riportate non sono state calcolate dopo purificazione cromatografica ma sono la percentuale di prodotto recuperato dopo lavorazione. L'ultimo passaggio sintetico ha riguardato la rimozione del gruppo protettore con le metodologie già descritte (cap. 2, par. 2).

Successivamente, per diminuire l'impatto ambientale del processo, si è messa a punto una sintesi one-pot utilizzando il dimetil carbonato (**Schema 45**).



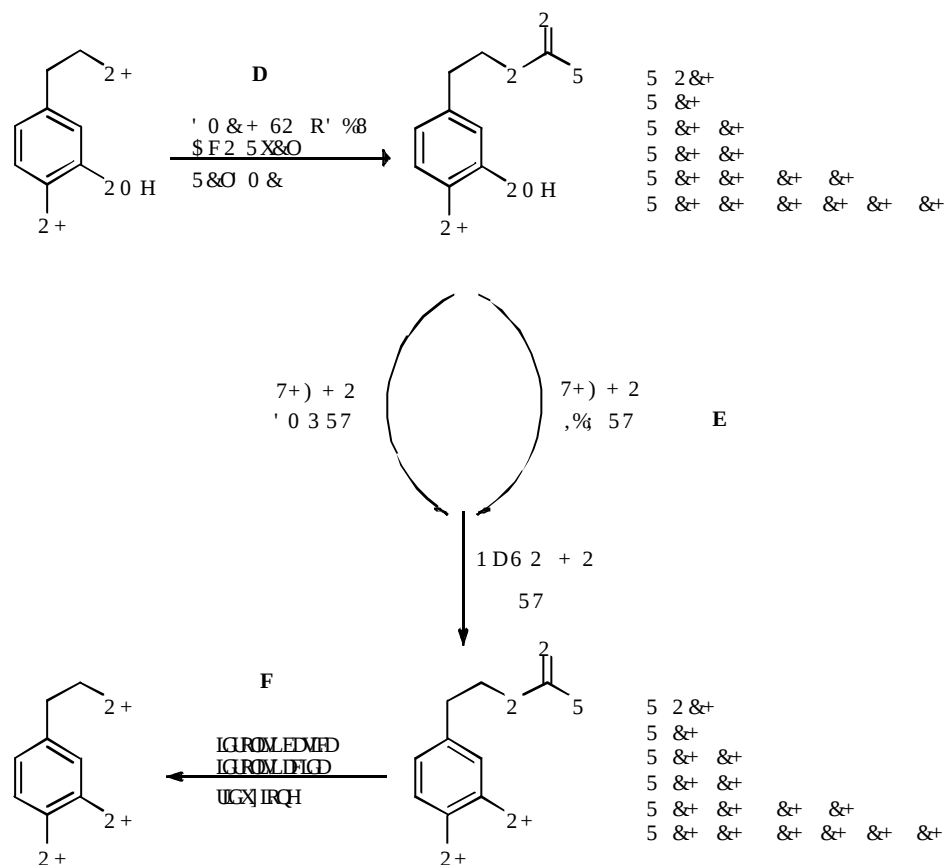
Schema 45. Sintesi one-pot dell'idrossitirosolo carbossimetilato.

Modulando la temperatura è stato possibile sfruttare il DMC prima come agente carbossimetilante (90°C) e successivamente come solvente di ossidazione (RT) ottenendo il prodotto **28** con una resa complessiva dell'82% senza dover ricorrere a purificazioni cromatografiche.

L'ultima parte del lavoro ha riguardato il recupero dell'acido *o*-iodobenzoico, unico sottoprodotto dello stadio di ossidazione, e la sua riutilizzazione per la rigenerazione dell'IBX, al fine di ottenere sia un abbattimento dei costi che un abbattimento dell'impatto ambientale del processo ossidativo. Lavando le fasi organiche con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, l'acido *o*-iodobenzoico è stato trasferito nella fase acquosa. Variando il pH, mediante aggiunte di acido cloridrico, è stato estratto con etil acetato. I migliori risultati ottenuti hanno consentito un recupero dell'85%.

Sfruttando l'altra interessante peculiarità ossidativa dell'IBX e del DMP, di demetilare gli eteri aril metil fenolici (cap. 1, par. 7), è stata messa a punto la sintesi di idrossitirosolo a partire dall'alcol omovanillico con una strategia analoga alla precedente (**Schema 46**). Anche in questo caso, i derivati protetti dell'alcol omovanillico sono stati ottenuti utilizzando le procedure precedentemente descritte (cap. 2, par. 2). Conducendo la reazione in THF/acqua in rapporto 10/1 per favorire l'idrolisi del complesso IBX-substrato (vedi meccanismo di reazione **Schema 13**).

In **Tabella 13** sono riportati i risultati sperimentali relativi allo step di ossidazione.



Schema 46. Sintesi di idrossitirosolo da alcol omovanillico.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
30	MeOH/H ₂ O/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	28: 91
30	THF/H ₂ O/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	28: 86
47	MeOH/H ₂ O/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	89	46: 85
47	THF/H ₂ O/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	46: 80
61	MeOH/H ₂ O/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	85	63: 70
61	THF/H ₂ O/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	63: 84
74	MeOH/H ₂ O/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	>98	73: 80
74	THF/H ₂ O/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	73: 88
84	MeOH/H ₂ O/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	81	83: 66
84	THF/H ₂ O/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	83: 89
91	MeOH/H ₂ O/IBX (1.2eq)/0°C/30 min	75	90: 52
91	THF/DMP (1.2 eq)/RT/30 min	>98	90: 73

Tabella 13. Risultati sperimentali delle reazioni di ossidazione riportate nello **Schema 46**.

Come si può notare dalla **Tabella 13**, alcune delle reazioni di demetilazione ossidativa non sono state ottenute con la conversione completa dei substrati, per cui si sono rese necessarie

purificazioni cromatografiche. Anche in queste sintesi è stato possibile recuperare l'acido *o*-iodobenzoico proveniente dalla riduzione dell'IBX.

3.3.4 Sintesi di idrossitirosolo e idrossitirosolo carbossimetilato con IBX supportato su matrice polimerica.

Come ulteriore avanzamento della ricerca, sia per migliorare l'economicità che l'ecocompatibilità della sintesi dell'idrossitirosolo e dei suoi derivati lipofili, è stato utilizzato l'IBX supportato su polistirene disponibile commercialmente (**Figura 24**) come ossidante nelle reazioni di inserzione ossidrilica del tirosolo e demetilazione ossidativa dell'alcol omovanillico.

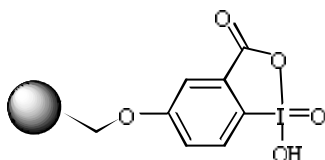
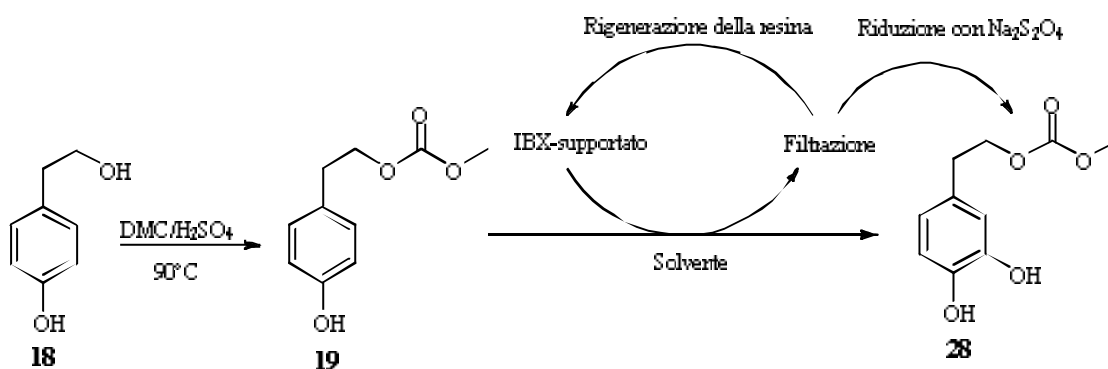


Figura 24. IBX supportato su polistirene.

La procedura sintetica, a partire dal tirosolo carbossimetilato **19**, è riportata nello **Schema 47**.



Schema 47. Sintesi di idrossitirosolo carbossimetilato con IBX supportato.

Inizialmente, la reazione di ossidazione è stata provata nelle stesse condizioni dell'ossidazione con IBX omogeneo (MeOH/0°C/ IBX 1.2 eq) ottenendo, in questo caso, una bassa conversione (27%). La reazione è stata successivamente condotta in THF a temperatura ambiente ottenendo risultati migliori; infatti dopo 1 ora si è avuto l'80% di conversione e resa nel prodotto **28**. A differenza dell'ossidazione in fase omogenea, 1.2 equivalenti di IBX non

sono stati sufficienti a dare una conversione totale, probabilmente perchè non tutti i siti dell'IBX sono disponibili. Sono quindi state eseguite delle prove per trovare la minima quantità di resina necessaria per avere una conversione totale del substrato che è risultata essere pari a 2.1 equivalenti. Dopo l'ossidazione, la miscela è stata filtrata per recuperare la resina e la soluzione è stata sottoposta a riduzione con una soluzione acquosa di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. I risultati ottenuti hanno mostrato una conversione e una resa di idrossitirosolo carbossimetilato pari al 98%.

Verificata l'efficienza dell'IBX-supportato nell'inserzione ossidrilica si è passati alla fase del riciclo. Inizialmente, si è provato a rigenerare la resina utilizzando oxone in acqua,⁶² ma sono stati ottenuti scarsi risultati. Pertanto, è stata applicata la procedura riportata in letteratura, che prevede l'impiego di tetrabutylammonio oxone, acido metansulfonico a temperatura ambiente, sostituendo al diclorometano il dimetilcarbonato come solvente.¹⁶³ I risultati sperimentali ottenuti sono riassunti graficamente nella **Figura 25**.

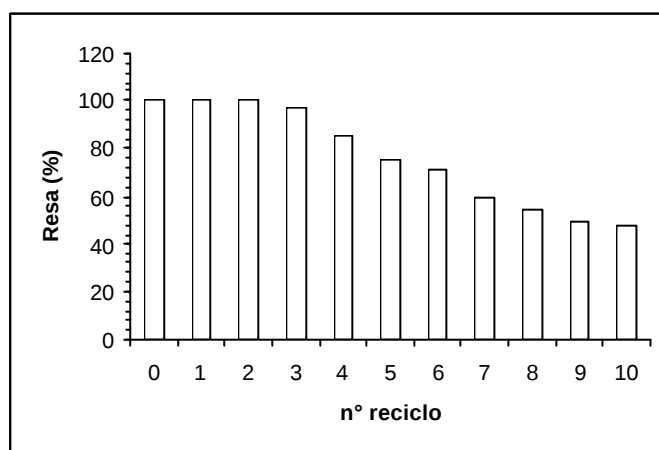
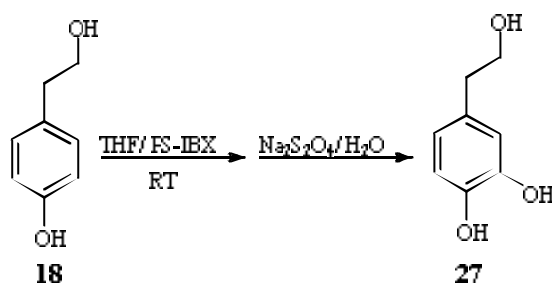


Figura 25. Studio di riciclabilità di IBX supportato nella sintesi di idrossitirosolo carbossimetilato.

Come si può vedere, la resina ha mantenuto un'elevata efficienza per diversi cicli di ossidazione e solo al decimo riciclo la resa del prodotto finale è risultata pari al 50%.

Di maggiore interesse è l'impiego di tale ossidante per la sintesi diretta di idrossitirosolo **27** a partire dal tirosolo **18** (**Schema 48**).



Schema 48. Sintesi diretta di idrossitirosolo da tirosolo con IBX supportato.

La semplificazione del processo di work-up, l'assenza dell'acido iodobenzoico nel grezzo di reazione sono risultati essere requisiti fondamentali per ridurre le perdite del prodotto in fase di lavorazione. I risultati sperimentali della reazione e dei successivi ricicli sono riassunti in **Figura 26**.

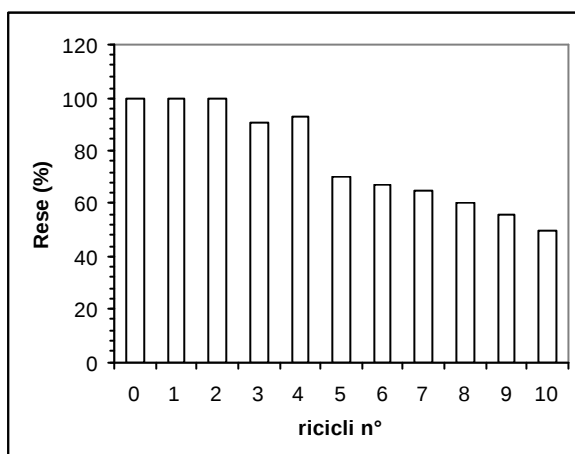


Figura 26. Studi di riciclabilità dell'IBX supportato nella sintesi di idrossitirosolo.

In tutti i casi non si è osservata la presenza di sottoprodotti; infatti, anche in questo caso la reazione è risultata essere selettiva per la formazione dell'idrossitirosolo e la resina ha mantenuto la sua efficienza in numerosi ricicli. Il recupero di idrossitirosolo dall'ambiente di reazione è stato di circa il 70%.

Un miglioramento ulteriore in termini di ecocompatibilità del processo e di efficienza dell'ossidante recuperato si è osservato utilizzando il DMC come solvente. I risultati ottenuti sono riassunti in **Figura 27**.

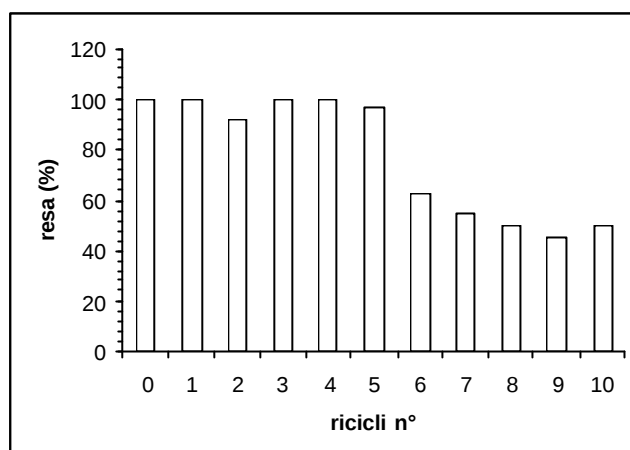
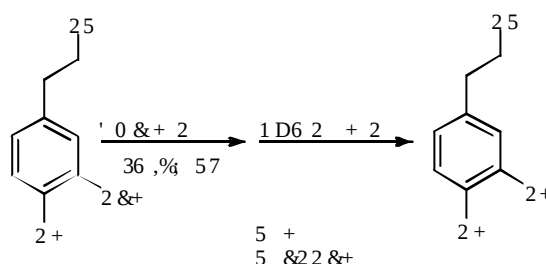


Figura 27. Studi di riciclabilità dell'IBX supportato nella sintesi di idrossitirosolo con DMC.

Infatti, in questo caso, la conversione della reazione è risultata quantitativa fino al quinto riciclo.

Successivamente, l'IBX supportato è stato impiegato nella reazione di demetilazione ossidativa per la sintesi di idrossitirosolo **27** e idrossitirosolo carbossimetilato **28** a partire rispettivamente da alcol omovanillico **29** e da alcol omovanillico carbossimetilato **30** (**Schema 49**). Le reazioni sono state condotte in presenza di DMC/H₂O in rapporto pari a 10:1 con il DMC.



Schema 49. Reazione di demetilazione ossidativa con IBX supportato e DMC.

I risultati ottenuti sono riassunti in **Figura 28**. Si può osservare che in questo caso la resina ha mantenuto pressoché inalterata la sua efficienza fino al decimo riciclo.

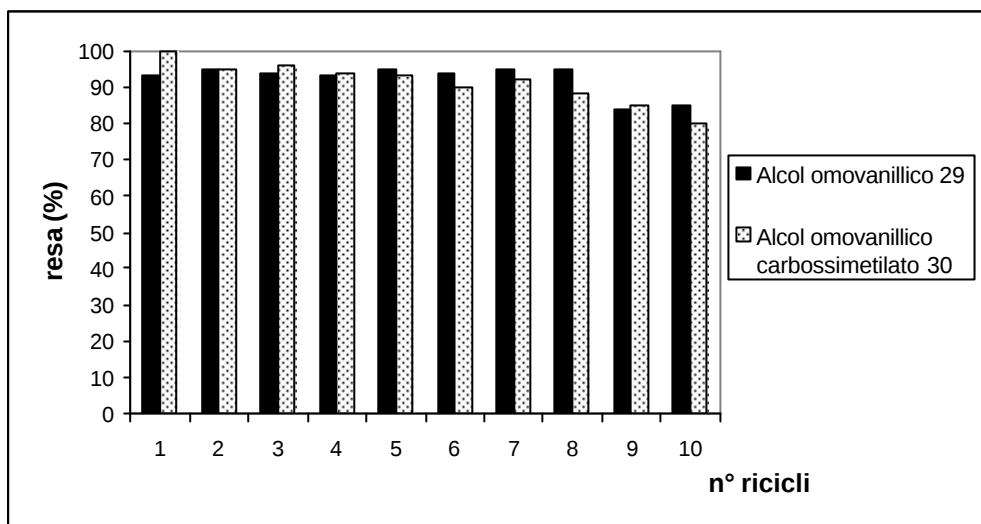


Figura 28. Studi di riciclabilità dell'IBX supportato nella sintesi di idrossitiroso da alcol omovanillico e alcol omovanillico carbosimetilato con DMC.

3.4 Sintesi di piceatannolo e derivati lipofili

3.4.1 Piceatannolo e resveratrolo

Gli stilbeni polioidrossilati sono prodotti naturali presenti in diversi tipi di piante, ampiamente studiati nel trattamento dei tumori.¹⁶⁴ Il *trans*-resveratrolo **94** (*trans*-4,3',5'-trioidrossistilbene, **Figura 29**), ad esempio, è una fitoalessina naturale prodotta dalle piante in risposta a un'infezione fungina, a un danno meccanico o ad irradiazione ultravioletta. Si ritrova nei legumi e principalmente nell'uva e nel vino.¹⁶⁵ E' spesso correlato al cosiddetto "paradosso francese", il fenomeno per il quale in Francia, nonostante l'alto consumo di alimenti ricchi di acidi grassi saturi, il consumo di vino rosso riduce l'incidenza di mortalità per malattie cardiovascolari. Il *trans*-resveratrolo è altamente antiossidante, e questa proprietà è alla base delle sue riconosciute proprietà di prevenzione nei confronti di varie patologie.¹⁶⁶

Il piceatannolo **95** (*trans*-3,4,3',5'-tetraoidrossistilbene, anche conosciuto come astringina, **Figura 29**), un analogo idrossilato del resveratrolo, è meno conosciuto poichè meno abbondante in natura. E' stato individuato solo in alcune specie: *Melaleuca leucadendron* (albero di té bianco), *Cassia garretiana* (legume asiatico), *Rheum undulatum* (rabarbaro coreano) e in culture di cellule in sospensione di *Vitis vinifera* (uva da vino).¹⁶⁷

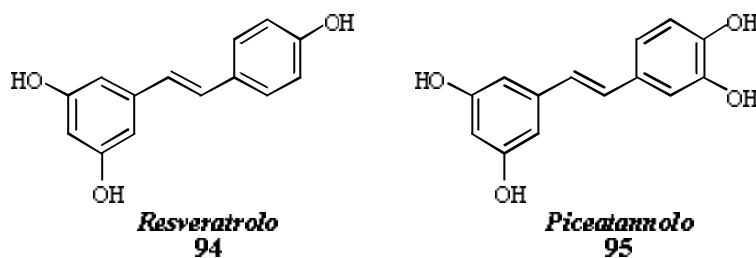


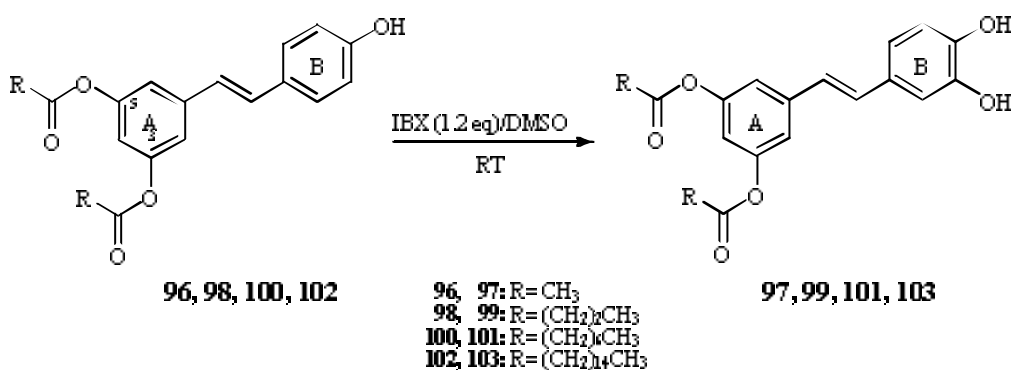
Figura 29. Struttura chimica del resveratrolo e del piceatannolo.

Avendo una funzione catecolica, tale composto ha attività biologiche superiori a quelle del resveratrolo. E' un potente antiossidante, un agente antiaritmico, mostra effetti antiallergici, è un antileucemico e induce apoptosi cellulare.¹⁶⁶ Addirittura, alcuni autori hanno dimostrato che l'attività antitumorale del resveratrolo è, in realtà, correlata alla formazione del piceatannolo ad opera dell'enzima CYP1B1, appartenente alla famiglia del citocromo P450, generalmente presente nei tumori umani.

Malgrado le numerose proprietà biologiche, studi *in vivo* mostrano una scarsa biodisponibilità del piceatannolo che ne riduce drasticamente la capacità di azione. Un ulteriore interessante campo di ricerca è quindi la sintesi di derivati lipofili che ne migliorino l'assorbimento nel corpo umano.

3.4.2 Sintesi del piceatannolo e derivati lipofili con IBX

Nell'ambito del recupero e della valorizzazione dei prodotti fenolici contenuti nei reflui agroindustriali, in cui da anni è impegnato il gruppo di ricerca, e considerata l'esperienza maturata con i reagenti dello iodio ipervalente, in particolare l'IBX, è stata studiata l'ossidazione diretta dei derivati lipofili del resveratrolo, proveniente dagli scarti delle vinacce, per la produzione del piceatannolo e derivati (**Schema 50**).



Schema 50. Sintesi di piceatannolo e derivati con IBX.

I substrati **96**, **98**, **100**, **102** protetti sulle funzioni 3, 5 dell'anello A, sono stati sintetizzati, mediante esterificazione enzimatica impiegando lipasi provenienti da *C. antarctica* dal gruppo di ricerca del Prof. Tringali e della Dott.ssa Spatafora dell'Università di Catania con il quale il nostro gruppo di ricerca ha una collaborazione scientifica. Inizialmente la reazione di ossidazione è stata applicata al resveratrolo 3,5-diacetato **96** nelle condizioni di reazione utilizzate per la sintesi dei derivati dell'idrossitirolo (MeOH/0°C). Il substrato è risultato poco solubile; è stato quindi necessario trovare la miscela di solventi in grado di solubilizzare il composto in esame, mantenendo allo stesso tempo la reattività e la selettività dell'IBX. Per questi motivi è stata utilizzata una miscela MeOH/CH₃Cl (1/1). La reazione, condotta a 0°C, monitorata tramite TLC, è terminata in 1 ora permettendo l'isolamento del prodotto **97**, con una resa dell'80%. La reazione è stata ripetuta anche in dimetil solfossido a temperatura ambiente ottenendo rese e conversioni paragonabili. Pertanto queste ultime condizioni sperimentali sono state utilizzate con gli altri substrati di interesse (**Tabella 14**).

Substrato	Tempo (h)	Conversione(%)	Resa (%)
96	1	>98	97 : 85
98	1	>98	99 : 85
100	2	>98	101 : 74
102	2	>95	103 : 85

Tabella 14. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 50**.

Come si osserva dai risultati riportati in tabella, la procedura di inserzione ossidrilica è stata efficiente con tutti i substrati utilizzati, mostrando un'elevata selettività verso il prodotto atteso. Il piceatannolo **95** si è ottenuto per riduzione con sodioboroidruro in tetraidrofurano a temperatura ambiente con conversione e resa quantitative.

Anche in questo caso, la determinazione dell'attività antiossidante è stata eseguita con il metodo spettrofotometrico della DPPH. I dati hanno mostrato che il piceatannolo ha un'attività molto elevata. Per i derivati lipofili, all'aumentare della lunghezza della catena alchilica del gruppo protettore si è osservata una diminuzione dell'attività biologica rispetto al piceatannolo, ma sempre più elevata di quella del resveratrolo (**Figura 30**).

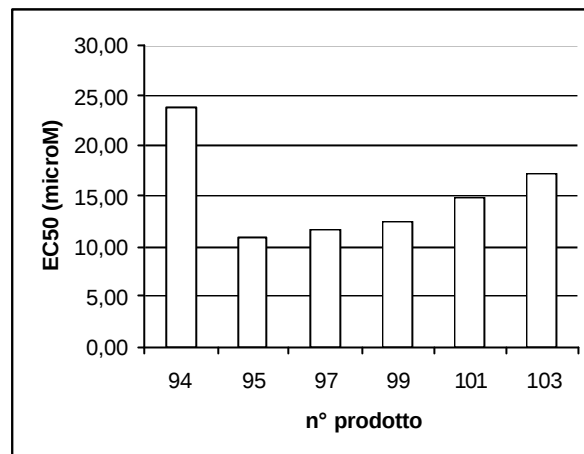


Figura 30. Risultati sperimentali dell'attività di scavenger con il metodo della DPPH.

3.5 Reazioni di ossidazione sui flavonoidi

3.5.1 Relazioni struttura attività nei flavonoidi

Come detto nella parte introduttiva, i flavonoidi sono composti fenolici naturali ampiamente diffusi nel mondo vegetale che mostrano attività biologiche e farmacologiche unitamente ad una bassa tossicità. Alcuni di essi sono antiossidanti, scavenger di radicali liberi, anti-infiammatori, anti-allergici, agenti mutageni, carcinogenici e anti-HIV.¹⁶⁸ Per molte di queste proprietà è stato condotto uno studio delle relazioni struttura-attività (RSA) per comprendere meglio i meccanismi di azione e soprattutto progettare sintesi di composti con maggiori capacità di azione.¹⁶⁹ Senza dubbio, l'attività più studiata è quella di radical scavenger poiché i flavonoidi sono altamente reattivi come donatori di idrogeno o di elettroni. Vari studi RSA hanno puntato l'attenzione sul numero e sulla posizione dei gruppi fenolici presenti nella struttura; in particolare, è risultato che le funzioni catecoliche, pirogalloliche e la presenza dell'ossidril in posizione 3 impartiscono un'alta attività, mentre, ossidril isolati o in *meta* tra loro sono meno importanti ai fini di tale attività (**Tabella 15**).¹⁷⁰

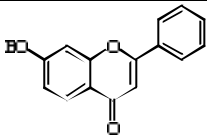
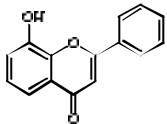
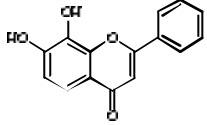
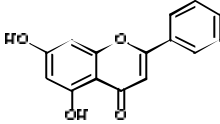
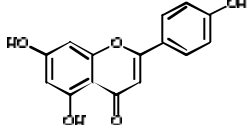
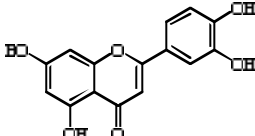
Substrato	IC ₅₀ (μM)
	> 1000
	166.43 ± 3.61
	15.50 ± 0.12
	492.57 ± 23.94
	463.40 ± 22.28
	11.04 ± 0.38

Tabella 15. Valori sperimentali di attività di scavenger di alcuni flavonoidi riportati in letteratura.

Inoltre, studi RSA eseguiti per valutare gli effetti cardiovascolari dei flavonoidi hanno evidenziato l'importanza del doppio legame in posizione 2,3 e degli ossidrili in posizione 5, 7 o 4'.¹⁷¹ Infatti, l'attività citotossica dei flavonoidi verso cellule cancerogene sembra essere attribuita principalmente alla presenza del doppio legame 2,3 e di funzioni catecoliche sull'anello B.¹⁷²

Alla luce delle considerazioni appena fatte, emerge l'importanza di sintetizzare molecole flavonoidiche che possiedano le funzioni principalmente responsabili della loro attività farmacologica quali il doppio legame e la funzione catecolica.

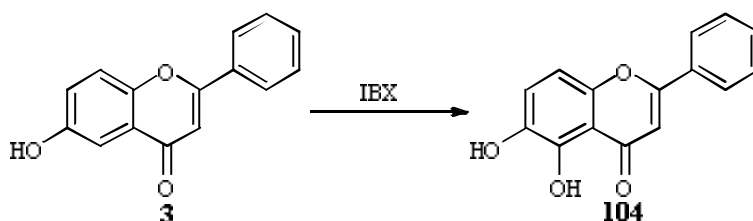
3.5.2 Stato dell'arte sulla sintesi di flavonoidi con struttura catecolica e formazione del doppio legame in posizione 2-3.

In letteratura sono riportati vari metodi di sintesi di flavoni basati sull'ossidazione di 2'-idrossicalconi e flavanoni, composti disponibili in commercio a basso costo. I reagenti usati a questo scopo sono SeO₂/pentanolo,¹⁷³ Pd-C/vuoto,¹⁷⁴ I₂-DMSO,¹⁷⁵ SeO₂-DMSO,¹⁷⁶ DDQ-diossano,¹⁷⁷ NaIO₄-DMSO,¹⁷⁸ nickel perossido-diossano,¹⁷⁹ H₂O₂-NaOH,¹⁸⁰ Dowex-2-propanolo,¹⁷⁵ SeO₂-diossano,¹⁸¹ SeO₂-iso-amil alcol,¹⁸² Br₂-NaOH, Tl(NO₃)·3H₂O,¹⁸³ I₂-trietilenglicole,¹⁸⁴ InBr₃ e InCl₃ supportati su silice,¹⁸⁵ NBS/AIBN in microonde¹⁸⁶ e catalisi enzimatica.¹⁸⁷ Non sono, invece, riportati esempi di ossidrilazione diretta di flavonoidi a dare sistemi catecolici.

Per questo motivo, si è pensato di sfruttare le potenzialità dell'IBX per la modificazione diretta di flavanoni e flavoni per la preparazione di composti bioattivi.

3.5.3 Sintesi di flavoni a struttura catecolica con IBX

Inizialmente è stato condotto un lavoro preliminare per la scelta delle condizioni ottimali di reazione, utilizzando come substrato il 6-idrossiflavone **3** (Schema 51). I dati sono riportati in Tabella 16.



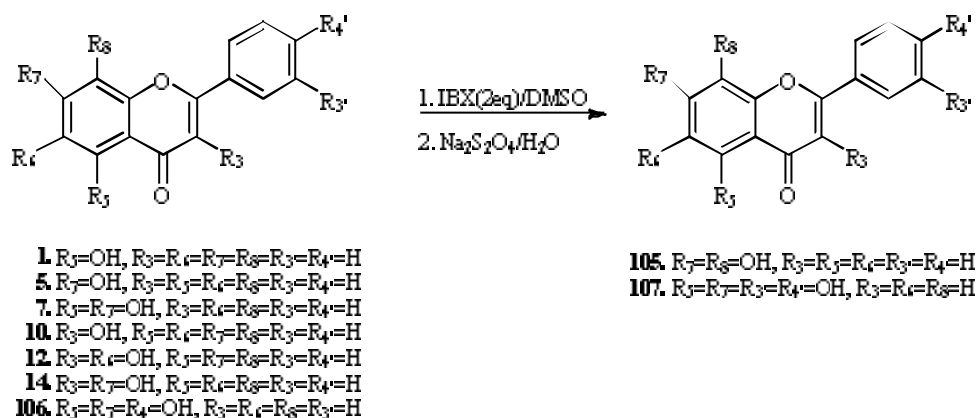
Schema 51. Reazione di ossidazione del 6-idrossiflavone con IBX.

Substrato	Condizioni sperimentali	Convers. (%)	Resa (%)
3	MeOH/IBX (2eq)/0°C per 5 h RT fino a 48 h	< 30	---
3	THF/IBX (2eq)/RT/20 h	90	104: 78
3	DMSO/ IBX (2eq)/RT/1 h	> 98	104: > 98

Tabella 16. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 51**.

Si è osservato che il miglior solvente, in termini di conversione e resa, è risultato essere il DMSO che ha permesso di ottenere il flavone 5,6-diidrossilato **104** con conversione e resa quantitative in tempi brevi senza ricorrere a purificazioni cromatografiche.

La metodologia messa a punto è stata quindi estesa ad altri flavoni di interesse biologico (**Schema 52**, **Tabella 17**).

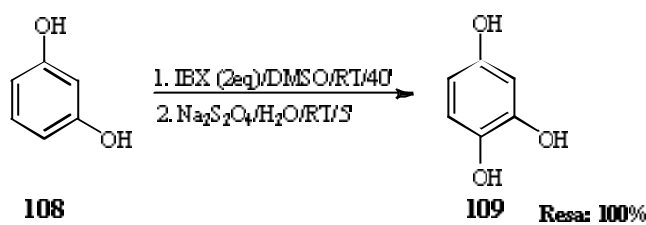


Schema 52. Reazione di ossidazione di flavoni con IBX.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
1	RT/5h	---	---
1	reflusso/30h	---	---
5	RT/2h	---	---
5	80°C/1h	>98	105: >98
7	80°C/1h	---	---
10	RT/1h	---	---
12	RT/2h	---	---
14	24h	---	---
106	80°C/1h	>98	107: >98

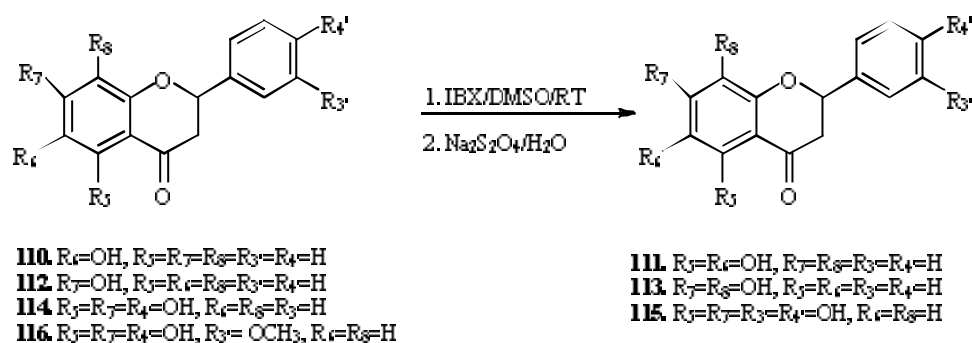
Tabella 17. Risultati sperimentali reazioni riportate nello **Schema 52**.

A differenza di quanto ci si aspettava, i risultati riportati in **Tabella 17** hanno mostrato che solo due substrati, il 7-idrossiflavone **5** e il 5,7,4'-triidrossiflavone **106**, hanno reagito con l'IBX in maniera selettiva portando, con conversioni e rese quantitative, ai prodotti **105** e **107**. Tali substrati sono però risultati meno reattivi del composto **3** precedentemente utilizzato; si è infatti reso necessario condurre la reazione a temperature più elevate. Il 5-idrossiflavone **1** non ha reagito con l'IBX neanche aumentando la temperatura o cambiando i solventi. Con il 5,7-diidrossiflavone **7**, invece, la conversione è stata totale, ma dopo lo step di riduzione, l'unico prodotto che si è osservato su TLC, è stato il substrato di partenza. La stessa situazione si è verificata anche lavorando direttamente la reazione dopo l'ossidazione o acetilando direttamente il grezzo di reazione. Pertanto, si è ipotizzato che la presenza degli ossidrili in *meta* fosse la causa del comportamento anomalo. A tale scopo è stata condotta la reazione di ossidazione su una molecola modello, quale il resorcinolo **108** (**Schema 53**).



Schema 53. Reazione di ossidazione del resorcinolo con IBX.

A differenza di quanto ci si aspettava, il sistema si è dimostrato molto reattivo. Infatti, in breve tempo, è stata osservata la formazione selettiva del prodotto **109**. Questa prova ci ha indotto ad ipotizzare che la coordinazione reversibile osservata nel composto **7** non è attribuibile alla presenza degli ossidrili in posizione *meta*, ma probabilmente ad un meccanismo più complesso in cui evidentemente è coinvolto anche l'anello eterociclico. Anche il 3-idrossiflavone **10**, il 3,6-diidrossiflavone **12** e il 3,7-diidrossiflavone **14** hanno mostrato una reattività analoga a quella precedentemente mostrata. Si è osservato, infatti, una conversione totale e la formazione successiva del substrato dopo riduzione o lavorazione. L'applicazione del sistema ossidante è stata estesa anche ai flavanoni (**Schema 54**, **Tabella 18**), i quali hanno mostrato un analogo comportamento.



Schema 54. Reazione di ossidazione di flavanoni con IBX.

Substrato	Tempo (h)	Conversione (%)	Resa (%)
110	1	>98	111: 82
112	48	80	113: 50
114	3	>98	115: 80
116	2	>98	115: 80

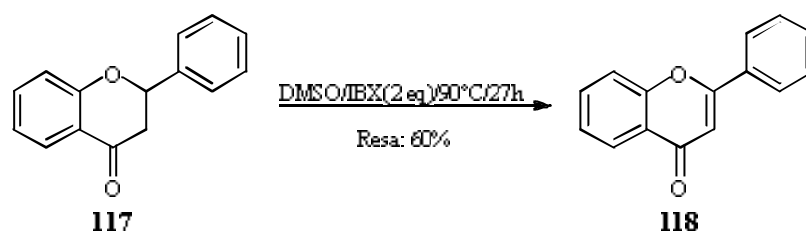
Tabella 18. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 54**.

Con il substrato **116**, avente un metossile in posizione 3', l'IBX ha effettuato una demetilazione ossidativa che è risultata ancora una volta selettiva e quantitativa.

3.5.4 Sintesi di flavoni da flavanoni con IBX

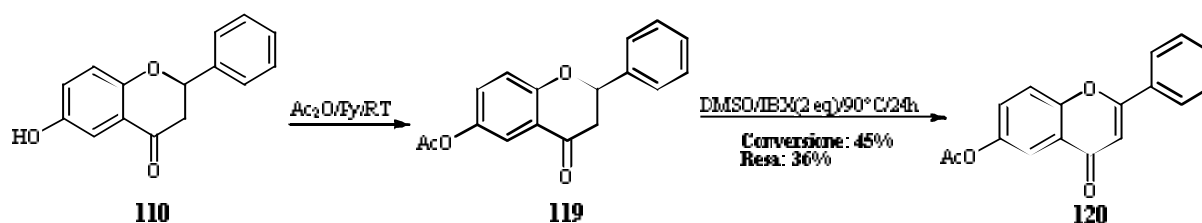
Negli anni sono stati sviluppati diversi metodi per introdurre insaturazioni adiacenti ad una funzionalità carbonilica; tuttavia, alcune di queste procedure, prevedevano l'impiego di reagenti tossici a base di selenio con procedure a uno o più stadi.

Sfruttando un'ulteriore capacità ossidativa dell'IBX, ossia la deidrogenazione in α ad un gruppo carbonilico con conseguente formazione di composti α,β -insaturi, si è pensato di preparare flavoni a partire dai flavanoni. La reazione è stata inizialmente applicata al flavanone **117** (**Schema 55**) ed ha mostrato buoni risultati. Infatti il flavone **118** è stato isolato con una resa del 60%.



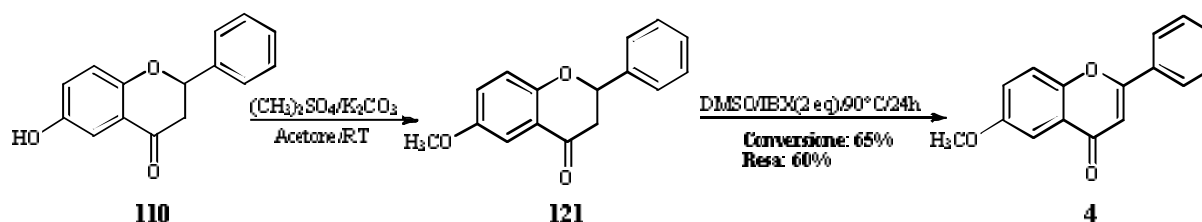
Schema 55. Sintesi del flavone dal flavanone con IBX.

Osservati i buoni risultati, si è proceduto all'ossidazione dei flavanoni ossigenati per i quali è stato inizialmente necessario proteggere la funzionalità fenolica reattiva all'ossidazione. Il substrato inizialmente utilizzato è stato il 6-idrossiflavanone **110** che è stato acetilato a dare il prodotto **119** e poi ossidato (**Schema 56**).



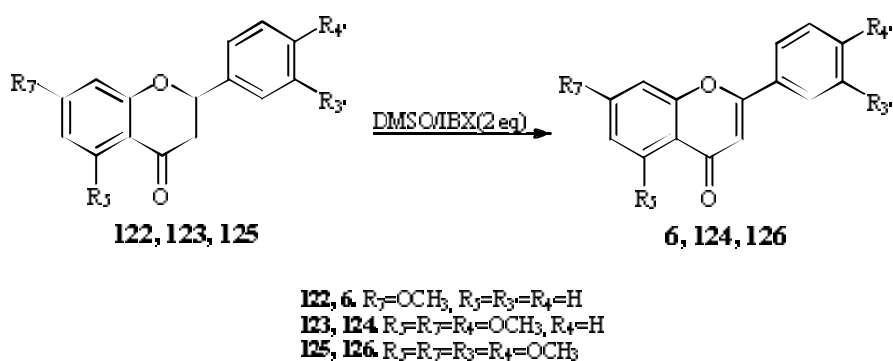
Schema 56. Reazione di ossidazione del 6-acetossiflavanone **119** con IBX.

Sia la resa che la conversione sono risultate basse; si è pensato dunque di verificare l'influenza del gruppo protettore sulla reattività del sistema introducendo un gruppo che fosse elettron donatore. Pertanto, la reazione di ossidazione è stata condotta utilizzando il 6-metossiflavanone **121** (**Schema 57**).



Schema 57. Reazione di ossidazione del 6-metossiflavanone con IBX.

Come ci si aspettava, la resa del prodotto finale **4** è risultata più elevata a dimostrazione che il gruppo protettore svolge un ruolo importante nella reattività del substrato. Questa procedura è stata applicata e ad altri flavanoni (**Schema 58**, **Tabella 19**) ottenendo, in questi casi, conversioni elevate ma rese finali dei prodotti basse a causa di difficoltà pratiche durante le purificazioni cromatografiche.

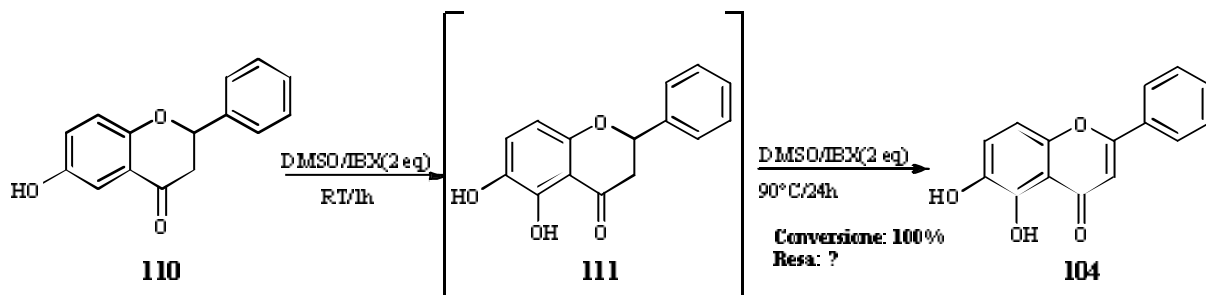


Schema 58. Reazione di ossidazione di flavanoni metossilati con IBX.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
122	DMSO/ IBX (2eq)/95°C/48h	75	6: 45
123	DMSO/ IBX (2eq)/70°C/24h	85	124: 20
125	DMSO/ IBX (2eq)/70/29 h	88	126: 35

Tabella 19. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 58**.

Infine si è pensato di condurre sia la reazione di ossidrilazione che di insaturazione sui flavanoni in un unico stadio, variando la temperatura e la quantità di IBX. Anche in questo caso, il substrato utilizzato è stato il 6-idrossiflavanone **110** (**Schema 59**).



Schema 59. Reazione di ossidrilazione e insaturazione del 6-idrossiflavanone con IBX

La reazione è stata inizialmente condotta a temperatura ambiente fino alla completa scomparsa del substrato; a questo punto la miscela è stata scaldata fino a 90°C e sono stati aggiunti altri due equivalenti di IBX. L'analisi TLC e H-NMR ha mostrato la completa conversione del substrato ma la presenza di numerosi prodotti di reazione. Lo stesso andamento è stato osservato anche con gli altri substrati. Pertanto, non è possibile eseguire la doppia ossidazione one-pot. Evidentemente, l'*orto*-chinone che si forma per inserzione ossidrilica iniziale, se non viene ridotto a catecolo può dar luogo a reazioni collaterali a discapito della selettività di ossidazione dell'IBX.

3.6 Isocromani: sintesi, ossidrilazione e apertura d'anello.

3.6.1 Generalità

Gli isocromani (3,4-diidro-1*H*-benzo[*c*]pirani, **Figura 31**) sono una classe di composti rari in natura, ritrovati solo di recente nell'olio di oliva.²¹

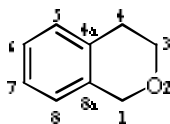


Figura 31. Struttura base di isocromani.

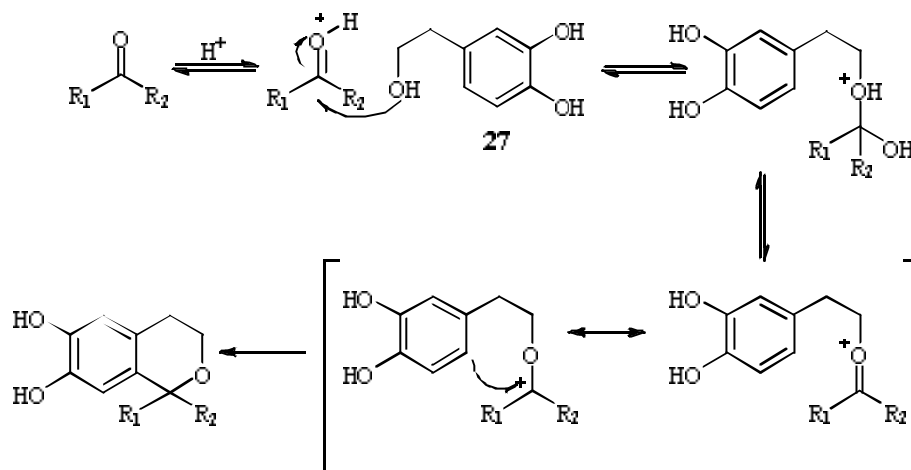
Gli idrossi-1-arilisocromani sono dotati di molteplici attività biologiche quali quella antiossidante, di radical scavenger¹⁸⁸ e sono inibitori dell'aggregazione piastrinica;¹⁸⁹ rappresentano, inoltre, unità strutturali di composti attivi commercialmente disponibili come farmaci e cosmetici. Alcuni di essi hanno azione analgesica, antidepressiva, antistaminica, antiinfiammatoria, antiipertensiva.¹⁹⁰ Alcuni isocromani sintetici sono impiegati come erbicidi, ligandi dei recettori della dopamina e fragranze.¹⁹¹ Recentemente, studi di struttura-attività relativi all'azione antiossidante hanno dimostrato l'importanza dei gruppi ossidrilici presenti negli anelli aromatici degli isocromani.¹⁸⁸ Gli isocromani poli-idrossilati sono anche inibitori della proliferazione cellulare e attivi contro alcune forme tumorali.¹⁹²

Anche i composti derivanti dall'apertura dell'anello eterociclico degli isocromani, aventi lo scheletro base dei benzofenoni, oltre ad essere dei fine-chemicals, sono spesso impiegati come intermedi nella sintesi di benzodiazepine,¹⁹³ e possiedono le caratteristiche strutturali per importanti attività biologiche quali la citotossicità.¹⁹⁴

3.6.2 Stato dell'arte sulla sintesi degli isocromani

La letteratura riporta varie procedure sintetiche di isocromani impiegando reazioni di ciclizzazione C-C o C-O.¹⁹⁵ Tra queste, la più comune è la reazione di oxa-Pictet-Spengler, una modificazione della Pictet-Spengler. Mentre nella Pictet-Spengler un composto a struttura fenetilamminica reagisce con un chetone o un'aldeide a dare una base di Schiff che successivamente ciclizza a dare un derivato dell'isochinolina; nella oxa-Pictet-Spengler, un composto come il 2-feniletanolo reagisce direttamente con un'aldeide o un chetone a dare l'isocromano. Questa reazione fu descritta per la prima volta nel 1992 da Wunsch e Zott e

prevedeva l'impiego di ZnCl_2/HCl gassoso o di acido *p*-toluensolfonico come catalizzatori della Fiedel-Craft, ad elevate temperature. Successivamente è stato descritto che, per substrati attivati dalla presenza di un ossidrile fenolico in *para* alla posizione di ciclizzazione, possono essere utilizzate condizioni di reazione più blande. Un esempio è la reazione tra l'idrossitirosolo **27** e aldeidi o chetoni, il cui meccanismo di reazione è riportato nello **Schema 60**.

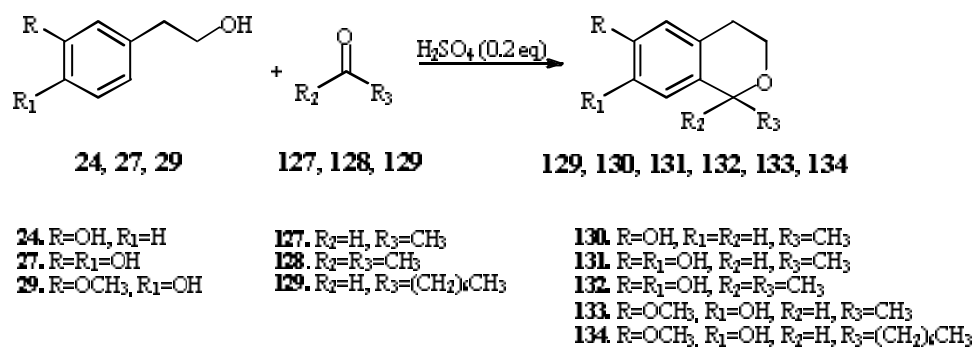


Schema 60. Meccanismo della reazione di oxa-Pictet Spengler con substrati attivati.

L'idrossitirosolo **27** reagisce con composti carbonilici formando un emiacetale. Da questo composto, per perdita di una molecola d'acqua e successiva chiusura d'anello, attivata dall'ossidrile in posizione *para*, si ottiene l'isocromano. Le condizioni di reazioni prevedono l'impiego di acido *p*-toluensolfonico come catalizzatore, metanolo, e temperature basse di reazione (4 °C).¹⁹⁶ Recentemente la reazione di oxa-Pictet Spengler è stata eseguita anche in mezzi acquosi ricorrendo all'uso di surfattanti.¹⁹⁷

3.6.3 Ossidazioni di isocromani con l'IBX

In questo lavoro di tesi, la reazione di oxa-Pictet Spengler su substrati attivati, riportata in letteratura, è stata utilizzata per la sintesi di una serie di isocromani utilizzando, in molti casi, molecole naturali, seguita da ossidazione con IBX.¹⁹⁶ Inizialmente la sintesi è stata applicata utilizzando aldeidi e chetoni alifatici (**Schema 61**, **Tabella 20**).



Schema 61. Sintesi di isocromani mediante reazione di oxa -Pictet Spengler.

Substrati	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
24, 127	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/0°C/5'	>98	130: 90
27, 127	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/0°C/5'	>98	131: >70
27, 128	H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/RT/2 h	>98	132: 65
29, 127	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/0°C/5'	>98	133: 95
29, 129	DMC/H ₂ SO ₄ (0.2 eq)/RT/30'	>98	134: 75

Tabella 20. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 61**.

Come prevedibile, si è evidenziato che le aldeidi erano più reattive dei chetoni. Infatti, per tutte le reazioni le conversioni sono state quantitative e i recuperi del prodotto puro dall'ambiente di reazione, sono risultati buoni. La reattività è stata mantenuta anche con aldeidi a catena lunga, nello specifico l'ottanale **129**. Per le reazioni condotte a temperatura ambiente, o comunque superiori ai 4°C, è stato possibile sostituire al CH₂Cl₂ il DMC.

La metodologia è stata quindi estesa alle aldeidi aromatiche per sintetizzare i corrispondenti 1-arilisocromani di maggior interesse in campo applicativo (**Schema 62, Tabella 21**).

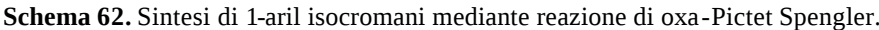
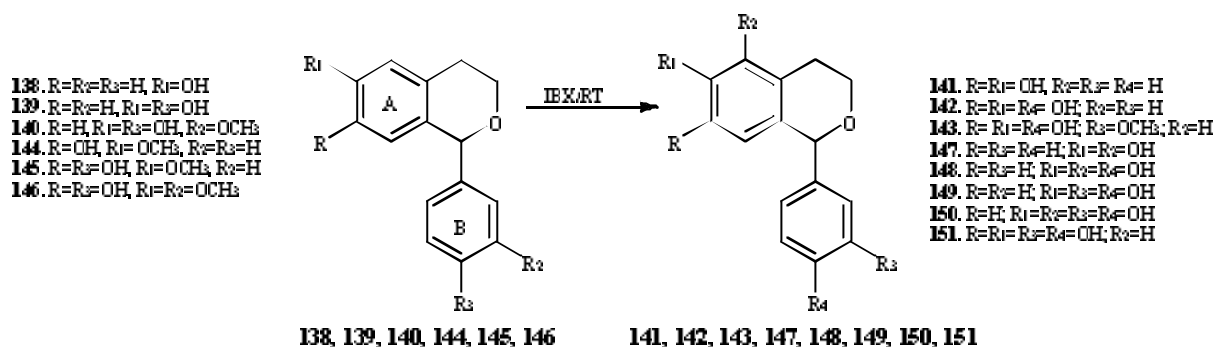


Tabella 21. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 62**.

86

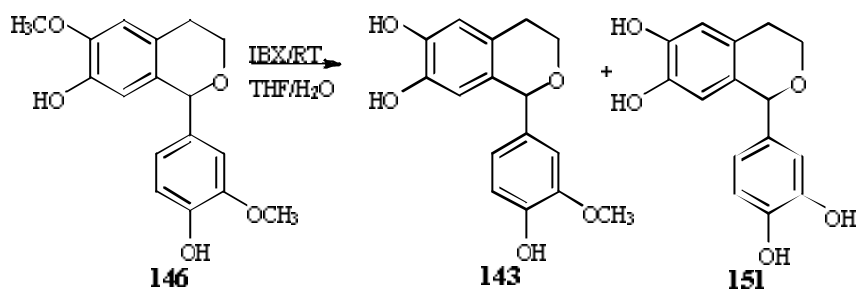


Schema 63. Reazioni di ossidazione di isocromani con IBX.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
138	THF/IBX (1.2eq)/RT/8.5 h	>98	141: 14 147: 86
139	THF/IBX (1.1eq)/RT/7 h	61	148: 36 149: 25
139	THF/IBX (2.1eq)/RT/48 h	>98	149: 33 150: 67
140	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/1,5 h	85	149: 85
140	THF/H ₂ O (10%)/IBX (2.1eq)/RT/18 h	>98	149: 33 150: 67
144	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/15'	68	141: 68
145	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/10'	67	142: 67
145	THF/H ₂ O (10%)/IBX (2.1eq)/RT/16 h	>98	151: 60
146	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/1,5 h	42	143: 42
146	THF/H ₂ O (10%)/IBX (2.1eq)/RT/18 h	>98	151: 95

Tabella 22. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 63**.

Il THF è risultato essere il miglior solvente, le reazioni sono state condotte a temperatura ambiente e come già detto, per condurre la demetilazione ossidativa è stato necessario aggiungere acqua. Le rese sono state calcolate mediante analisi HPLC in presenza di uno standard interno. Agendo sulla quantità di IBX e sul tempo di reazione è stato possibile modulare la selettività del sistema. Ad esempio, dal substrato **146**, per demetilazione ossidativa, è stato ottenuto sia il prodotto di parziale demetilazione **143** che di totale demetilazione **151** (**Schema 64**, **Tabella 23**).



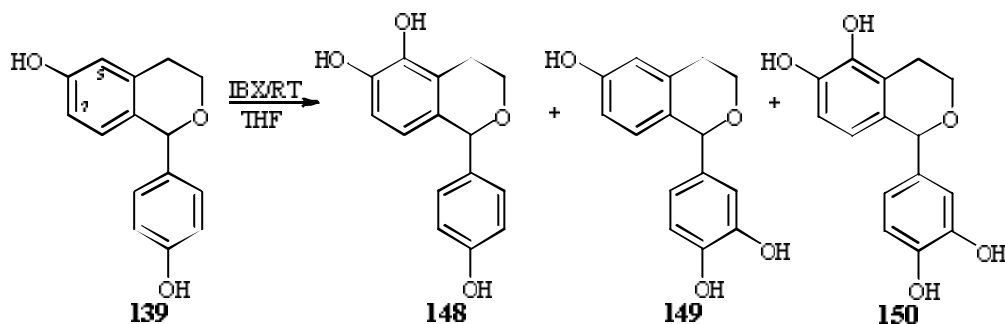
Schema 64. Reazione di demetilazione ossidativa dell'isocromano **146**.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
146	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/1,5 h	42	143 : 42
146	THF/H ₂ O (10%)/IBX (2.1eq)/RT/18 h	>98	151 : 95

Tabella 23. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 64**.

Si è osservata un'elevata selettività di reazione tra i due anelli dell'isocromano; inizialmente infatti, la demetilazione è avvenuta solo nell'anello A, e in tempi rapidi (1.5 h) si è osservata la scomparsa del substrato. E' da sottolineare che, malgrado il controllo della reazione su TLC abbia mostrato una totale conversione, dopo la fase di riduzione e lavorazione, si è osservato nuovamente il substrato. Probabilmente, anche in questo caso, come già ottenuto con i flavoni, una parte del complesso IBX-substrato non è evoluto ai prodotti finali. Dopo l'ossidazione dell'anello A, si è osservato che la demetilazione dell'anello B è stata completa dopo 18 h formando selettivamente il prodotto **151**.

Nello **Schema 65**, e nella **Tabella 24** sono riportati i dati della reazione di inserzione ossidrilica.



Schema 65. Reazione di inserzione ossidrilica per l'isocromano **139**.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
139	THF/IBX (1.1eq)/RT/7 h	61	148: 36 149: 25
139	THF/IBX (1.1eq)/RT/24 h	63	148: 37 149: 26
139	THF/IBX (2.1eq)/RT/24 h	91	148: 47 149: 26 150: 18
139	THF/IBX (2.1eq)/RT/48 h	>98	149: 33 150: 67

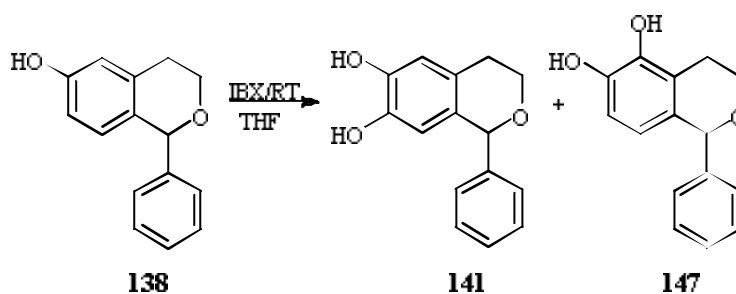
Tabella 24. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 65**.

In questo caso, non è stata osservata una differenza significativa di selettività tra l'anello A e B dell'isocromano. La conversione non è risultata quantitativa neanche prolungando i tempi di reazione. Questo ci ha indotto a supporre che essa dipenda non tanto dal tempo, quanto dalla quantità di IBX. Infatti, lavorando in eccesso di IBX, si è osservata una maggiore conversione a vantaggio del prodotto ossidrilato sull'anello A **148**, ma è stato identificato anche il prodotto **150**. In queste ultime condizioni, prolungando ulteriormente i tempi di reazione, si è osservato che il composto **148** si è convertito completamente nel prodotto idrossilato **150**.

Un'ulteriore osservazione importante è la completa selettività di reazione nell'anello A tra le posizioni 5 e 7 (**Schema 65**), in quanto quest'ultima non è affatto coinvolta nella reazione di ossidazione.

Infine, dal confronto dei risultati della demetilazione ossidativa con quelli dell'inserzione ossidrilica è emerso che, in generale, la demetilazione ossidativa è più rapida, sia nel primo stadio di ossidazione che nel secondo.

Per chiarire la selettività di reazione riscontrata per i due anelli dell'isocromano, nell'inserzione ossidrilica, sono state messe a confronto la reattività del prodotto **139**, con quella del substrato **138** (**Schema 66**, **Tabella 25**).



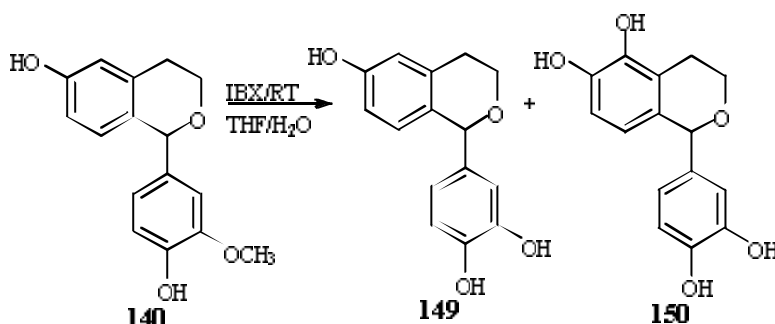
Schema 66. Reazione di inserzione ossidrilica per l'isocromano **138**.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
138	THF/IBX (1.2eq)/RT/8.5 h	>98	141 : 14 147 : 86

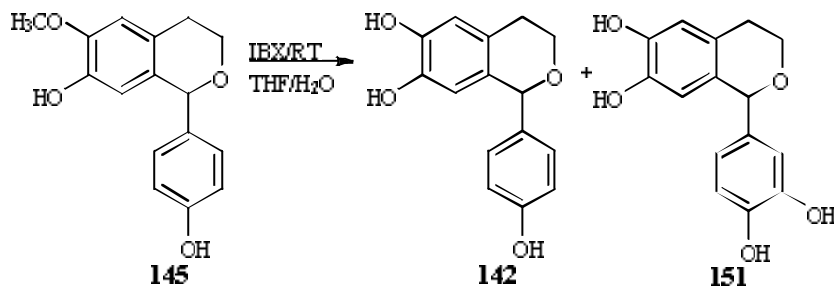
Tabella 25. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 66**.

Con il substrato **138**, si è osservata ancora una buona selettività verso la posizione 5, ma non totale come nel caso del substrato **139**, a dimostrazione che i sostituenti dell'anello B evidentemente hanno svolto un ruolo fondamentale.

Infine, per evidenziare le differenze di velocità tra la demetilazione ossidativa e l'inserzione ossidrilica, sono stati ossidrilati i substrati **140** (**Schema 67**, **Tabella 26**) e **145** (**Schema 68**, **Tabella 26**). In entrambe le reazioni, sia che avvenga sull'anello A che sull'anello B, la demetilazione ossidativa è risultata essere più veloce rispetto all'inserzione ossidrilica. Questo ci ha permesso di modulare la reattività per l'ottenimento di prodotti di sola demetilazione o di inserzione. Dalla **Tabella 26** si evidenzia che è possibile ottenere lo stesso composto partendo da substrati diversi (si vedano gli esempi relativi ai prodotti **149**, **150**, **151**).



Schema 67. Reazione di ossidazione dell'isocromano **140**.



Schema 68. Reazione di ossidazione dell'isocromano **145**.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
140	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/1,5 h	85	149 : 85
140	THF/H ₂ O (10%)/IBX (2.1eq)/RT/18 h	>98	150 : 67 149 : 33
145	THF/H ₂ O (10%)/IBX (1.1eq)/RT/10'	67	142 : 67
145	THF/H ₂ O (10%)/IBX (2.1eq)/RT/16 h	>98	151 : 60

Tabella 26. Risultati sperimentali delle reazioni riportate negli **Schemi 67 e 68**.

Per concludere, con la procedura descritta, i composti **141**, **142**, **143**, sintetizzati partendo dall'idrossitirosolo **27** mediante la reazione di oxa-Pictet Spengler, sono stati ottenuti a partire dall'alcol omovanillico **29**, un composto naturale, facilmente reperibile in commercio, a basso costo.

Per i composti ottenuti, data la presenza delle funzioni catecoliche, è stata determinata l'attività di scavenger di radicali liberi, utilizzando anche in questo caso il metodo spettrofotometrico della DPPH. I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 32**.

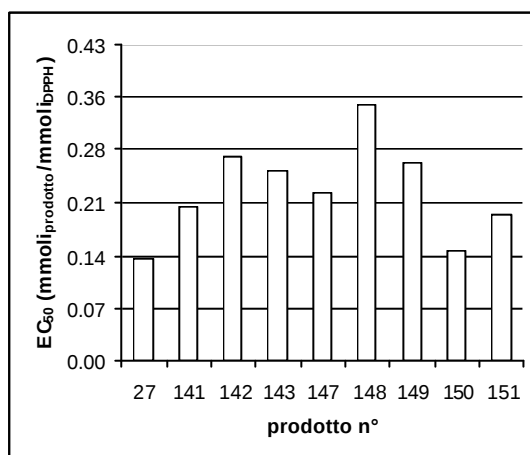


Figura 32. Riassunto dei risultati sperimentali di EC₅₀.

I substrati **141** e **147** hanno mostrato una EC₅₀ paragonabile. Essi differiscono solamente per la posizione della funzione catecolica sull'anello A, che non sembra quindi aver influenza sull'attività antiossidante. La presenza di un'ulteriore ossidrilica in posizione 4' nell'anello B, come nel caso dei composti **142** e **148**, ha comportato una diminuzione dell'attività antiossidante. La differenza dei valori di EC₅₀ è risultata più marcata tra i composti **147** e **148**. Nel caso del composto **149**, in cui la funzione catecolica è presente nell'anello B ed un'ossidrilica si trova in posizione 6 sull'anello A, i valori di EC₅₀ sono risultati più elevati del composto **148**. La presenza di due funzionalità catecoliche, come nei composti **150** e **151**, ha

comportato un aumento dell'attività antiossidante, soprattutto nel composto **150** che è risultato essere il più attivo tra tutti i substrati testati. La sostituzione di un ossidrile con un metossile (composto **143**) ha depresso l'attività biologica.

Confrontando i dati ottenuti sugli 1-arilisocromani con quelli dell'idrossitirosolo **27** ($0.14 \text{ mmoli}_{\text{idrossitirosolo}}/\text{mmoli}_{\text{DPPH}}$) si è osservato che quest'ultimo risulta essere ancora il più attivo, ma, analizzando il tempo necessario al raggiungimento del plateau della DPPH, emergono importanti differenze: l'idrossitirosolo **27** così come l'isocromano **141** esplicano la loro attività in tempi dell'ordine dei minuti, mentre tutti gli altri in tempi inferiori ai 30 secondi (**Figura 33**). Tali risultati meritano ulteriori approfondimenti per una corretta correlazione struttura-attività antiossidante.

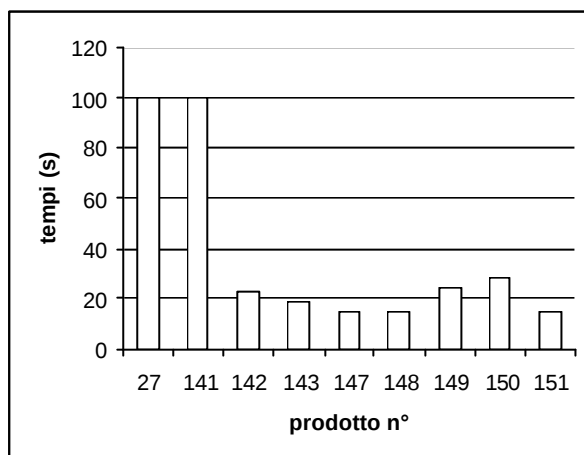
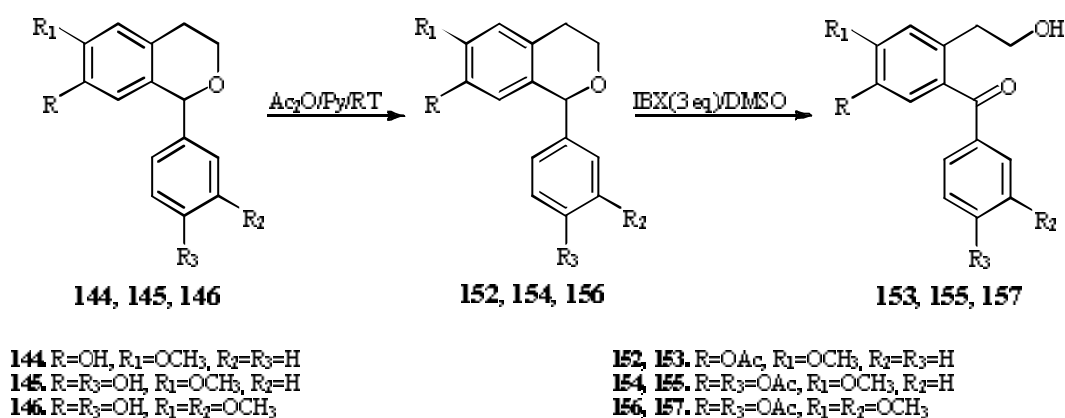


Figura 33. Tempi di raggiungimento del plateau della DPPH ad opera degli antiossidanti in esame.

3.6.4 Apertura d'anello di 1-arilisocromani con IBX

La letteratura ci offre pochi esempi di apertura d'anello di isocromani. La reazione di ossidazione più applicata prevede l'impiego del reagente di Jones preparato solubilizzando l'ossido di cromo (VI) in acido solforico concentrato. La reazione procede con alte rese a dare il prodotto completamente ossidato, ma risulta molto tossica.¹⁹⁸ Un altro esempio, è basato sull'impiego del dimetildiossirano (DMD), un ossidante per anni studiato dal nostro gruppo di ricerca.¹⁹⁹ Tale ossidante è efficiente, ma richiede una preparazione laboriosa al momento dell'uso.

Considerate le potenzialità biologiche e di fine-chemicals dei prodotti derivanti dall'apertura d'anello degli isocromani si è pensato di sviluppare una metodologia di ossidazione efficiente. Anche in questo caso si è pensato di utilizzare l'IBX di cui è riportata in letteratura la capacità di ossidare selettivamente le posizioni benziliche con un meccanismo SET (cap. 1, par. 7.2).⁶⁹ Prima dell'ossidazione, per evitare le reazioni di inserzione ossidrilica e demetilazione, gli ossidril fenolici sono stati acetilati. I risultati dell'ossidazione sono riportati nello **Schema 69, Tabella 27**.



Schema 69. Ossidazione di 1-arilisocromani totalmente acetilati.

Substrato	Condizioni sperimentali	Conversione (%)	Resa (%)
152	DMSO/IBX (3 eq)/80°C/24 h	92	153: 36
154	DMSO/IBX (3 eq)/95°C/24 h	92	155: 15
156	DMSO/IBX (3 eq)/80°C/6.5 h	84	157: 21

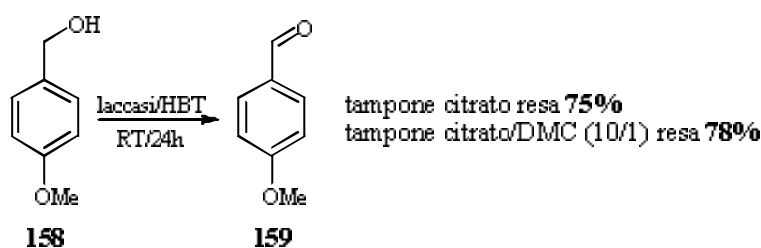
Tabella 27. Risultati sperimentali delle reazioni di ossidazione riportate nello **Schema 69**.

Le conversioni e rese sono state calcolate mediante HPLC con il metodo dello standard interno. I risultati hanno mostrato conversioni elevate ma scarsa selettività verso il prodotto di apertura d'anello. I cromatogrammi presentavano, infatti, diversi sottoprodotti di reazione derivanti, probabilmente, da ossidazioni ulteriori anche a carico della funzione alcolica. Non si sono osservati però, prodotti di ossidazione benzilica, evidenziando la buona selettività dell'IBX nell'ossidazione della posizione benzileterea.

3.6.5 Reazione di apertura d'anello con il sistema O₂/Laccasi/Mediatore (HBT)

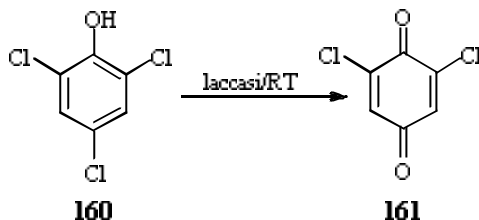
Considerati i risultati non completamente soddisfacenti dell'ossidazione benzilica degli isocromani con IBX, si è pensato di ricorrere alla catalisi enzimatica. Tale obiettivo è stato parte integrante di una collaborazione scientifica avviata tra il nostro gruppo di ricerca e quello del Prof. C. Galli e della Dott.ssa P. Gentili del Dipartimento di Chimica della Sapienza Università di Roma, che da anni si occupano dello studio dei meccanismi di reazione mediate dalle Laccasi. Di questi enzimi si è già parlato in maniera approfondita nell'Introduzione (Cap. 1, par. 9) e si è specificato che per l'ossidazione di sistemi benzilici e benzileterei è necessario ricorrere all'uso di mediatori.⁷⁴

Sulla base delle precedenti considerazioni, il lavoro di ossidazione degli isocromani è stato condotto utilizzando l'1-idrossibenzotriazolo (HBT) come mediatore delle laccasi provenienti dalla specie *Trametes villosa*, nella miscela di solventi tampone acetato/1,4-diossano (1/1 v) di cui erano già noti i dati di stabilità dell'enzima.²⁰⁰ Allo scopo di migliorare ulteriormente l'ecocompatibilità del processo, sono state effettuate, prove di attività della laccasi nella miscela di solventi tampone citrato (pH=5)/DMC. A tale scopo, in analogia a quanto studiato con altri solventi, il substrato di riferimento è stato il *p*-metossi benzilalcol **158**, ossidato con il sistema laccasi/HBT sia in tampone citrato che nella miscela tampone citrato/DMC (10/1). I risultati sperimentali hanno mostrato che la miscela di solventi in esame ha dato risultati paragonabili a quelli ottenuti con il solo tampone e pertanto utilizzabili (**Schema 70**).



Schema 70. Reazione di ossidazione del *p*-metossi benzilalcol **158** con il sistema laccasi/HBT.

Successivamente, è stata eseguita una reazione di ossidazione del 2,4,6-triclorofenolo **160** con le laccasi e la miscela di solventi tampone citrato/DMC in diversi rapporti (**Schema 71**, **Tabella 28**).



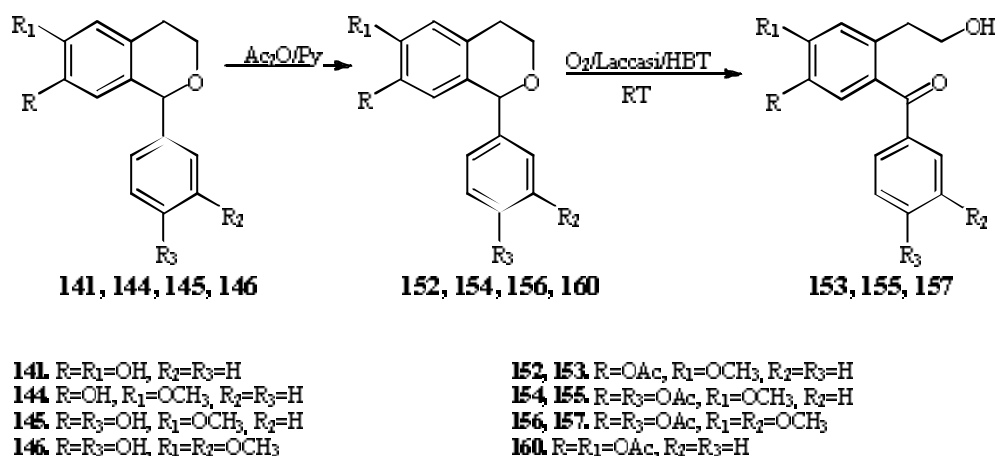
Schema 71. Reazione di ossidazione del 2,4,6-tricloro fenolo **160** con laccasi in solventi misti.

Tempo (h)	tampone citrato (pH=5)/DMC		
	10/1	3/1	1/1
	Resa prodotto 161 (%)		
3	81	55	0
24	85	77	21

Tabella 28. Risultati sperimentali della reazione riportata nello **Schema 71**.

I risultati hanno mostrato come fino ad un rapporto 3/1 della miscela di solventi le rese in termine di ossidazione sono state soddisfacenti mentre subivano un decremento se in miscela 1/1. Sulla base di queste considerazioni, si è deciso di impiegare la miscela di solventi pari a 5/1, in cui l'enzima manteneva attività catalitica e allo stesso tempo permetteva di solubilizzare i substrati in esame.

Anche in questo caso, poichè è noto che le laccasi possono catalizzare reazioni di polimerizzazione su sistemi fenolici,⁷³ gli ossidrili fenolici sono stati acetilati prima della reazione di ossidazione. I risultati ottenuti dall'ossidazione dei substrati **141**, **144**, **145** e **146** sono riportati nello **Schema 72**, **Tabella 29**.



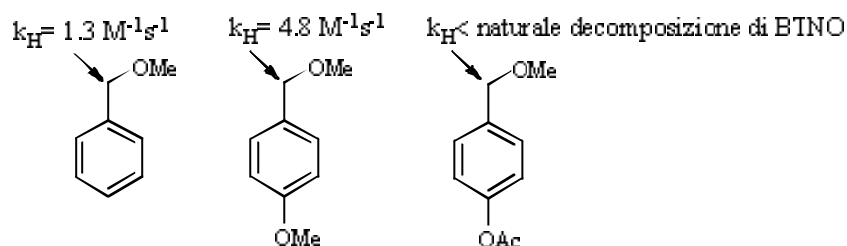
Schema 72. Reazione di apertura d'anello di isocromani con il sistema O₂/Laccasi/HBT.

Substrato	Condizioni sperimentali	Tempo (h)	Conversione (%)	Resa (%)
152	Tampone acetato/diossano (1/1 v/v)	20	75	153: 55
152	Tampone acetato/DMC (5/1 v/v)	20	68	153: 60
154	Tampone acetato/diossano (1/1 v/v)	24	16	155: 10
154	Tampone acetato/DMC (5/1 v/v)	24	---	---
156	Tampone acetato/diossano (1/1 v/v)	24	75	157: 22
156	Tampone acetato/DMC (5/1 v/v)	24	74	157: 41
160	Tampone acetato/diossano (1/1 v/v)	24	34	---
160	Tampone acetato/DMC (5/1 v/v)	24	30	---

Tabella 29. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 72**.

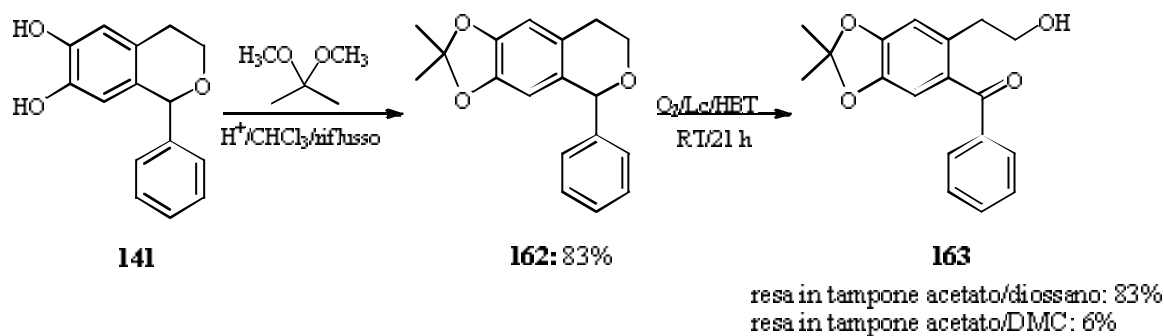
Le rese e le conversioni sono state calcolate via HPLC applicando il metodo dello standard interno. I risultati ottenuti hanno mostrato che anche per gli 1-arilisocromani, la posizione preferenzialmente ossidata dal sistema laccasi/HBT è quella benzil eterea. La reazione di ossidazione enzimatica sul substrato **152** ha portato a risultati soddisfacenti; infatti, le rese di reazione sono state buone sia in tampone acetato/diossano che in tampone acetato/DMC. Nel caso del substrato **156**, la presenza degli acetili nella struttura degli isocromani ha ridotto la selettività del sistema enzimatico; mentre i substrati **154** e **160** hanno mostrato una scarsa reattività. Poichè era noto che il “rate determining step” dell’ossidazione è lo strappo di idrogeno dal substrato da parte del BTNO (specie radicalica derivante dall’ossidazione enzimatica dell’HBT),⁸⁹ sono stati effettuati studi sulla determinazione del valore della costante di velocità del processo HAT su molecole modello in cui è presente la posizione benzileterea (**Schema 73**). I risultati hanno mostrato che, in accordo con il carattere elettrofilo

del radicale BTNO, la presenza di gruppi elettron attrattori quali l'acetile riduce la costante cinetica del processo HAT; al contrario, gruppi elettron donatori quali il metossile lo aumentano.



Schema 73. Determinazione del valore delle costanti cinetiche del processo HAT su molecole modello.

Sulla base di questi risultati si è pensato di condurre l'ossidazione enzimatica del substrato **141**, i cui gruppi fenolici sono stati protetti mediante acetonide, un gruppo elettron-donatore (**Schema 74**). A conferma delle prove cinetiche eseguite in tampone acetato/diossano, le reazioni di ossidazione hanno portato ai prodotti in rese maggiori. La reazione condotta nella miscela tampone acetato /DMC ha mostrato una scarsa reattività a causa della insolubilità del substrato.

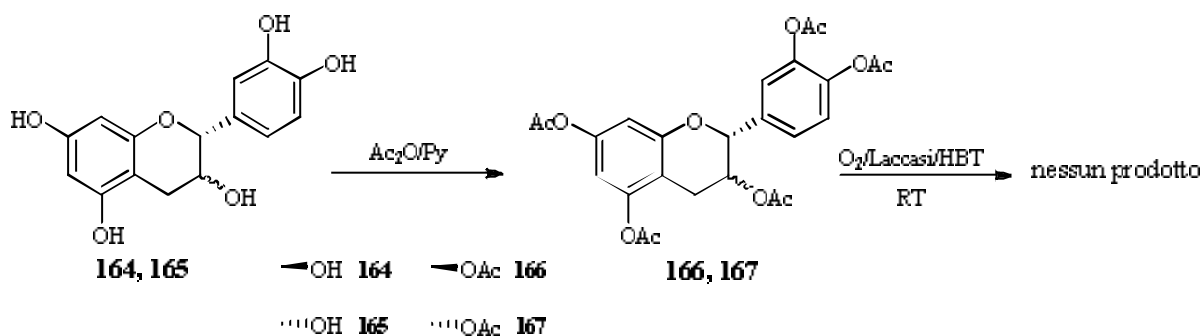


Schema 74. Reazione di protezione e ossidazione dell'1-arilisocromano **141**.

3.7 Ossidazione enzimatica di catechine con il sistema catalitico O₂/Laccasi/HBT

Come detto, le catechine sono una classe di flavonoidi che, grazie alla loro elevata attività antiossidante e di scavenger di radicali liberi, sono agenti protettivi contro alcune forme tumorali, patologie cardiovascolari e fenomeni infiammatori. Recenti studi hanno mostrato anche l'attività antibatterica di tali composti nei confronti dell' *Helicobacter pylori*, il batterio responsabile dell'ulcera gastrica.²⁰¹

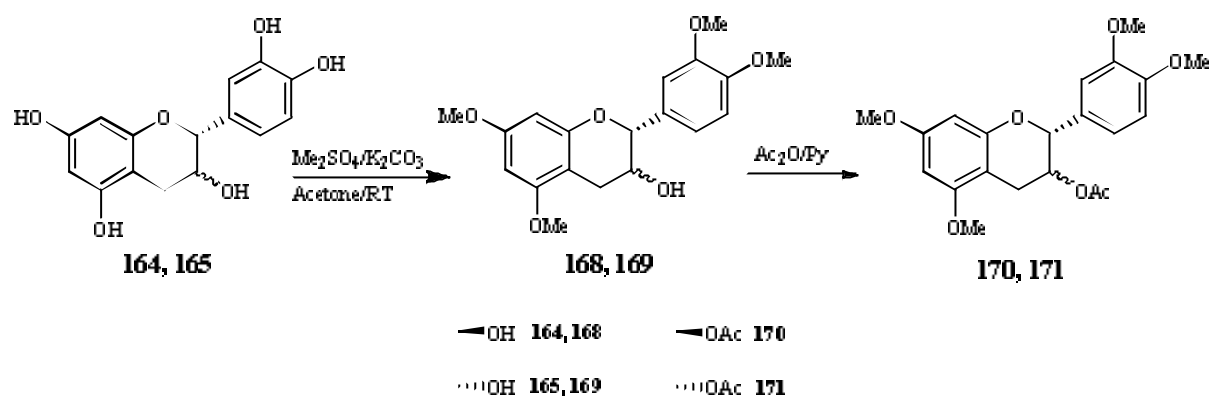
In letteratura sono riportati diversi esempi di ossidazione di catechine da parte di sistemi enzimatici e in particolare di laccasi che portano alla formazione di oligomeri e/o polimeri derivanti da reazioni radicaliche a carico di anelli aromatici.²⁰² Con lo scopo di ossidare la posizione benzilica, si è pensato di studiare la reattività dell'anello eterociclico delle catechine nelle condizioni già impiegate per l'ossidazione degli 1-arilisocromani (Cap.3, par. 6.5): sistema catalitico O₂/Laccasi da *T. villosa*/HBT, miscela tampone acetato/diossano (1/1 v), protezione degli ossidril fenolici tramite acetilazione (**Schema 75**).



Schema 75. Reazione di ossidazione enzimatica di catechine totalmente acetilate.

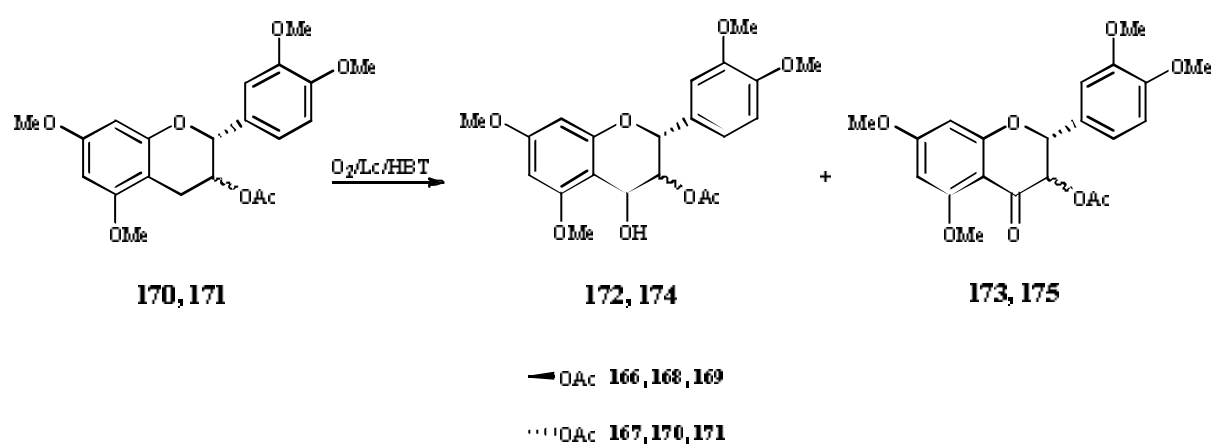
Come ci si aspettava, i substrati acetilati si sono rivelati non reattivi, in accordo con gli studi eseguiti e precedentemente discussi (Cap. 3, par. 6.5) secondo i quali sostituenti elettron attrattori esercitano un effetto disattivante nelle reazioni di ossidazione laccasi/mediatore.

Sulla base di questi risultati preliminari si è deciso di proteggere i gruppi fenolici delle catechine mediante reazione di metilazione ed eliminare eventuali ossidazioni collaterali dell'ossidril alcolico in posizione C-3 derivatizzandolo come acetile (**Schema 76**).



Schema 76. Reazioni di protezione delle funzionalità reattive delle catechine.

I substrati così ottenuti sono stati ossidati con il sistema catalitico O₂/Laccasi/HBT (**Schema 77, Tabella 30**).



Schema 77. Reazioni di ossidazione di 5,7,3',4'-tetrametil-3-acetylcatechine.

Substrato	Tempo (h)	Conversione (%)	Resa (%)
170	28	90	172: 22 173: 11
170	50	>98	172: 32 173: 16
171	50	80	174: 23 175: 11

Tabella 30. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 77**.

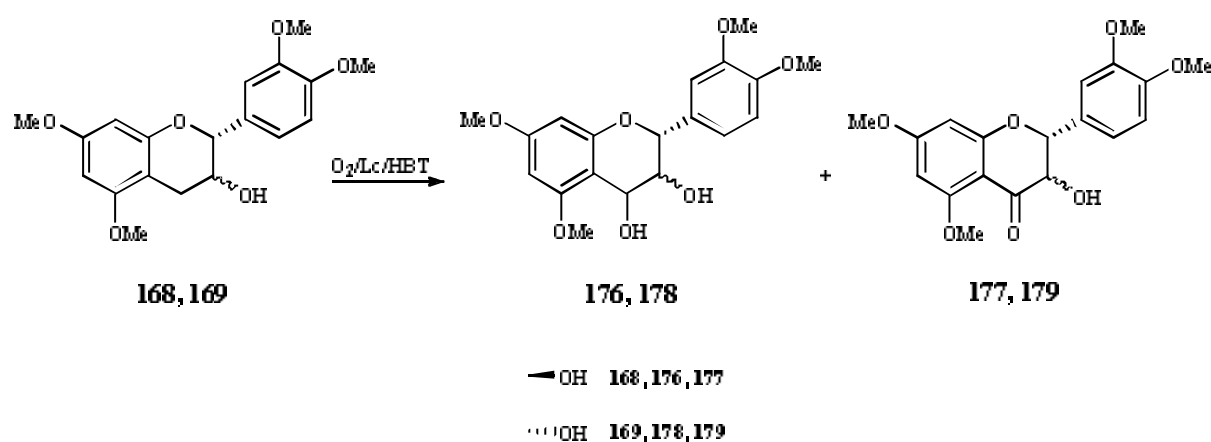
Le rese e le conversioni sono state calcolate tramite HPLC con il metodo dello standard interno a causa delle difficoltà operative correlate alla purificazione dei prodotti finali, instabili su silice. Infatti, sono stati isolati solo alcuni prodotti derivanti dalla

ossifunzionalizzazione della posizione benzilica C-4 (**172**, **174**) e dalla ulteriore ossidazione dell'ossidril inserito (**173**, **175**).

Con la (+)-5,7,3',4'-tetrametil-3-acetilcatechina **170**, protrarre la reazione per tempi più lunghi ha portato ad un piccolo aumento della conversione e resa dei prodotto **172** e **173**.

La (-)-5,7,3',4'-tetrametil-3-acetilepicatechina **171** pur mostrando una minore reattività del substrato **170**, ha portato a risultati analoghi.

Allo scopo di verificare l'influenza del gruppo estereo in posizione C-3 sulla reattività e selettività del sistema, la reazione è stata condotta sui substrati **168** e **169** in cui era presente la funzione alcolica libera (Schema 78, Tabella 31).



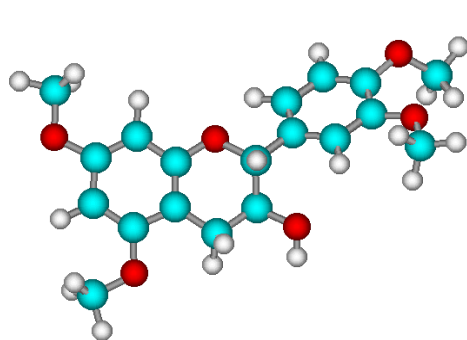
Schema 78. Reazioni di ossidazione delle 5,7,3',4'-tetrametilcatechine.

Substrato	Tempo (h)	Conversione (%)	Resa (%)
168	28	75	176: 10 177: 35
168	50	76	176: 21 177: 48
168	72	77	176: 22 177: 53
169	50	80	178: 38 179: 13

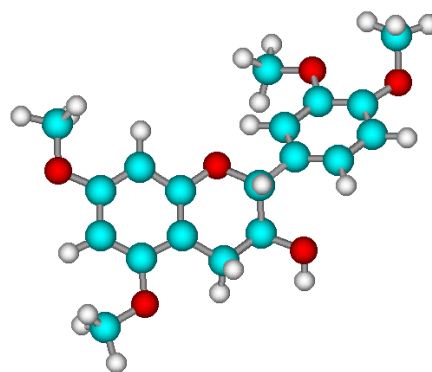
Tabella 31. Risultati sperimentali delle reazioni riportate nello **Schema 78**.

I dati sperimentali hanno mostrato che, con questi substrati, conversioni e rese sono risultati essere quasi coincidenti a dimostrazione della maggiore selettività del sistema verso l'ossidazione in posizione C-4. Per la (+)-5,7,3',4'-tetrametilcatechina **168**, la presenza dell'ossidril libero in C-3 è stato un fattore determinante nel favorire l'ossidazione di **176**

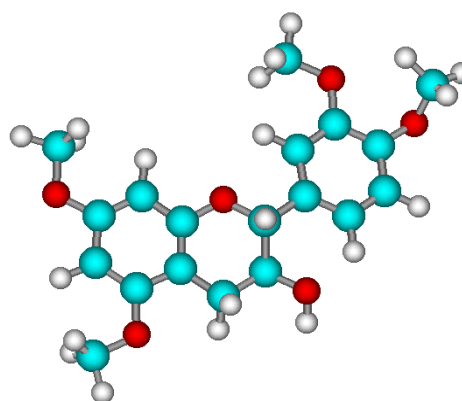
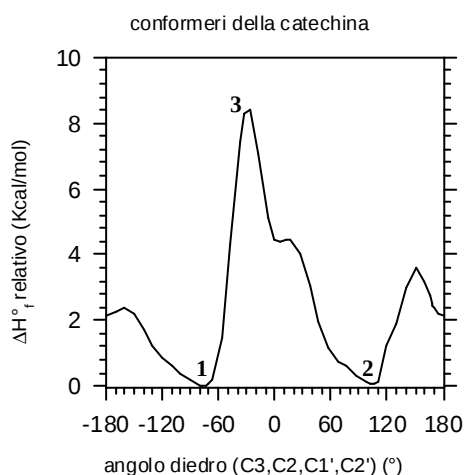
con conseguente aumento della resa del prodotto **177**. Questo andamento non è stato osservato per la (-)-5,7,3',4'-tetrametilepicatechina **169**. A conferma della selettività di ossidazione osservata nella posizione C-4 sono stati effettuati studi teorici di determinazione dell'energia del legame C-H in posizione 4 e in posizione 2. I calcoli hanno mostrato che i conformeri **1** e **2** riportati nello **Figura 34** sono quelli più stabili.



Conformero 1:
angolo diedro $\phi_{C_2,C_1,C_1',C_2'} = -77.09^\circ$
 $\Delta H_f^\circ = -183.19$ Kcal/mol



Conformero 2:
angolo diedro $\phi_{C_2,C_1,C_1',C_2'} = 103.93^\circ$
 $\Delta H_f^\circ = -183.13$ Kcal/mol

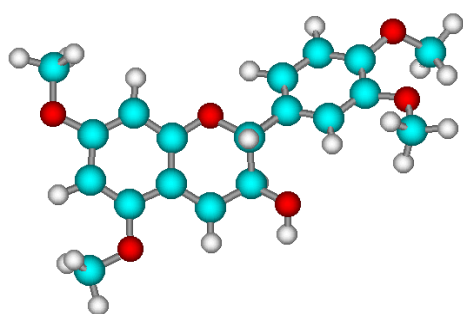


Conformero 3:
angolo diedro $\phi_{C_2,C_1,C_1',C_2'} = -31.76^\circ$
 $\Delta H_f^\circ = -174.91$ Kcal/mol

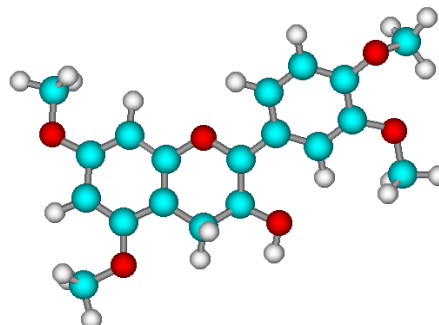
Figura 34. Determinazione dei conformari più stabili della catechina tetrametilata **164**.

Dal punto di vista meccanicistico, la reazione di ossidazione con O_2 /Laccasi/HBT, per strappo di un atomo di idrogeno, porta alla formazione di un radicale. Pertanto, dei due possibili radicali sul C-2 o sul C-4 sono state misurate le entalpie di formazione. Come si può osservare dai dati riportati nella **Figura 35**, tali valori sono risultati paragonabili. Pertanto, la selettività dell'ossidazione in C-4, osservata sperimentalmente, non sembra essere giustificata

dai calcoli teorici. In realtà, la stabilizzazione del radicale formatosi in posizione C-2, comporta una rotazione dell'anello B con formazione del conformero **3** caratterizzato da un massimo di energia (**Figura 34**). Dunque, si può concludere che complessivamente la formazione del radicale in C-2 è sfavorita.



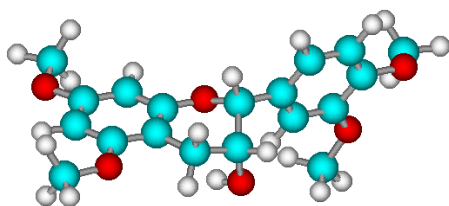
Radicale C4 della catechina:
 $\Delta H^\circ_f = -163.32$ Kcal/mol
 BDE = 72 Kcal/mol
 angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = -73.08^\circ$



Radicale C2 della catechina:
 $\Delta H^\circ_f = -164$ Kcal/mol
 BDE = 71 Kcal/mol
 angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = 11.4^\circ$

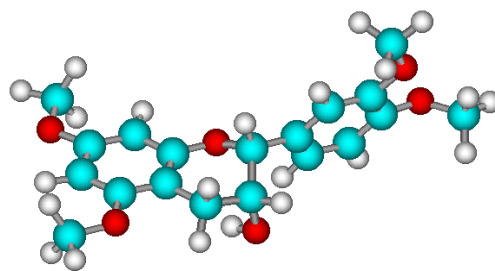
Figura 35. Calcolo delle energie di formazione del radicale in C-4 e C-2.

Ad analoghe considerazioni si è giunti dall'analisi teorica effettuata sulla epicatechina tetrametilata **165** (**Figura 36**). In questo caso, dal punto di vista delle entalpie di formazione dei radicali in C-2 o in C-4, la formazione del radicale in C-2 sembra essere quella favorita, ma la conformazione assunta da tale radicale corrisponde al **conformero 3** meno stabile; di conseguenza il bilancio energetico favorisce l'ossidazione della posizione C-4.



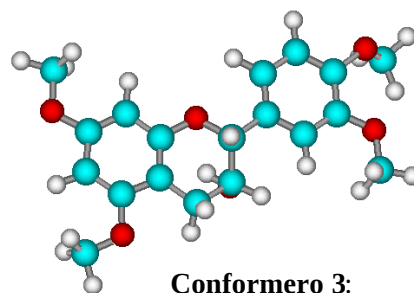
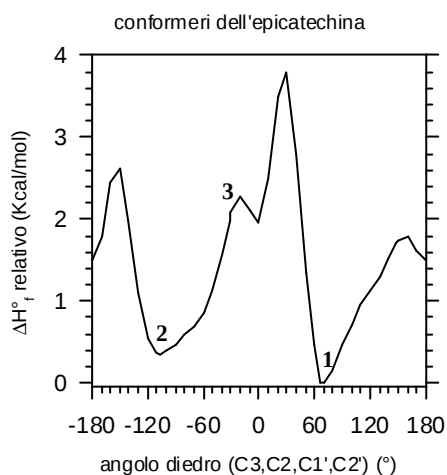
Conformero 1:

angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = 66.439^\circ$
 $\Delta H_f^\circ = -184.97$ Kcal/mol



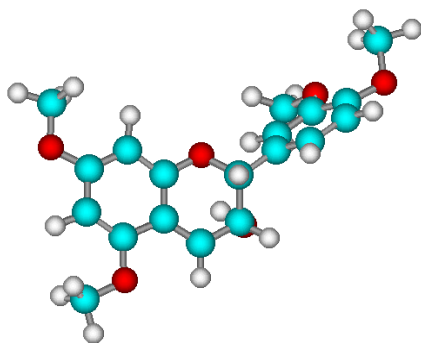
Conformero 2:

angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = -106.49^\circ$
 $\Delta H_f^\circ = -184.61$ Kcal/mol



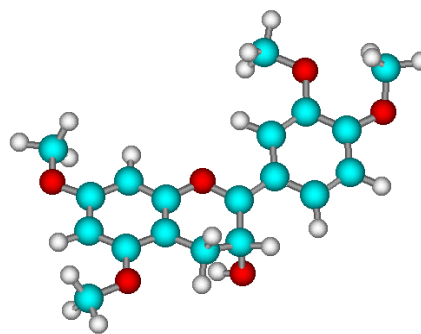
Conformero 3:

angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = -32.05^\circ$
 $\Delta H_f^\circ = -183.26$ Kcal/mol



Radicale C4 dell'epicatechina:

$\Delta H_f^\circ = -163.38$ Kcal/mol
 BDE = 73 Kcal/mol
 angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = 77.8^\circ$



Radicale C2 dell'epicatechina:

$\Delta H_f^\circ = -167.71$ Kcal/mol
 BDE = 69 Kcal/mol
 angolo diedro $\phi_{C2,C1,C1',C2'} = 12.17^\circ$

Figura 36. Calcoli teorici dell'ossidazione radicalica della epicatechina tetrametilata **165**.

Dall'ossifunzionalizzazione in posizione C-4 è possibile ottenere, per ogni substrato, due diastereoisomeri (**Figura 37**).

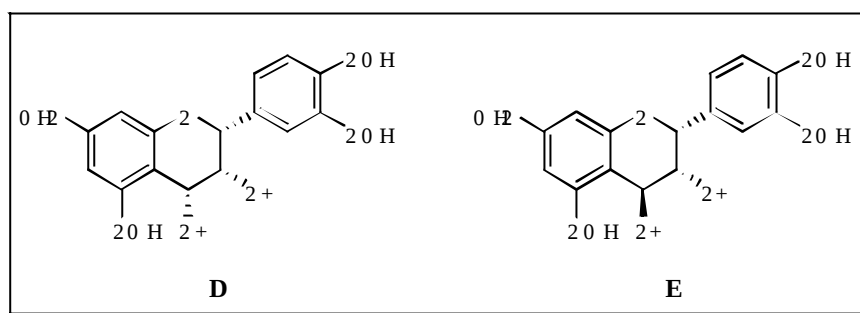
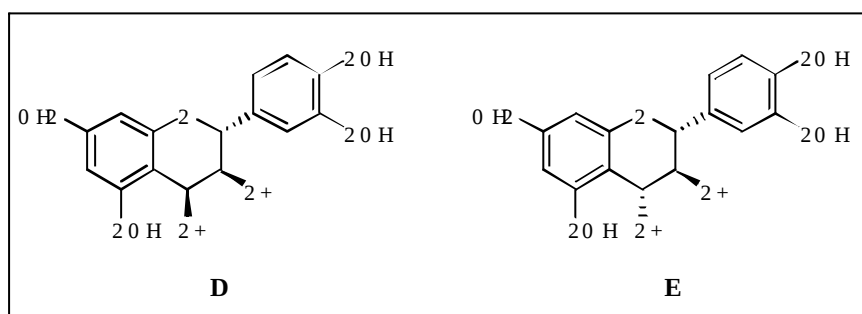


Figura 37. Strutture diastereoisomeriche dei prodotti di ossofunzionalizzazione di 5,7,3',4'-tetrametilcatechine.

Il calcolo del valore delle costanti di accoppiamento $J_{3,4}$, mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ dei prodotti ottenuti, per confronto con i dati riportati in letteratura,²⁰³ ha permesso di stabilire che l'inserzione ossidrilica avviene sempre nella stessa direzione dell'ossidrile in C-3, portando, pertanto, stereoselettivamente alla formazione dei prodotti **176a** e **178b**. Dati analoghi erano stati riportati in letteratura ad opera di alcuni funghi filamentosi presenti nelle piante del tè, quali quelli della specie *Diaporthe*.^{204, 205}

I prodotti ottenuti, i flavan-3,4-dioli, sono i precursori nella sintesi delle proantocianidine, una famiglia di polifenoli naturali a struttura oligomerica che presentano un legame interflavanilico fra le posizioni $\text{C}_4\text{-C}_8$ o $\text{C}_4\text{-C}_6$ delle unità flavan-4-oliche (**Figura 38**). Presentano importanti attività biologiche quali quella antiossidante, di scavenger di radicali liberi e anti-tumorale.²⁰⁶

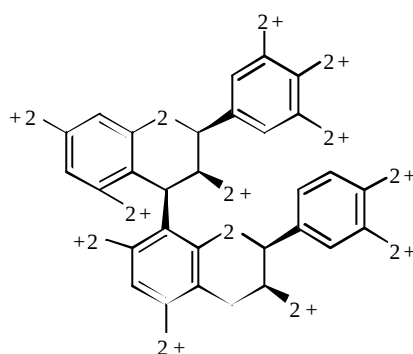


Figura 38. Esempio di proantocianidina.

Il composto **173** è un derivato della taxifolina (**Figura 39**) un bioflavonoide ubiquitario nel regno vegetale che presenta un'attività antiossidante superiore a quella della vitamina E e dei carotenoidi;^{207,208} ha effetti antitumorali,²⁰⁹ è antimutagenico;²¹⁰ antivirale²¹¹ ed antiallergico.²¹² E' stato recentemente isolato un batterio aerobico (*Burkholderia* sp. KTC-1) presente nella torba tropicale, responsabile della degradazione della catechina in due steps a formare la taxifolina.²¹³

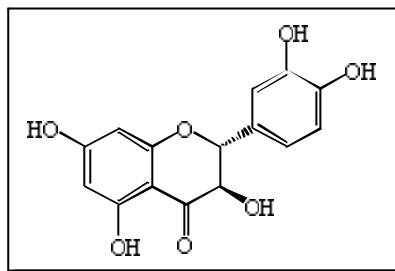


Figura 39. Struttura chimica della taxifolina.

4. CONCLUSIONI

La ricerca svolta nel triennio di dottorato ha previsto lo sviluppo di metodologie ossidative con reagenti chimici biomimetici ed enzimatici per l'ottenimento di fine chemicals e composti biologicamente attivi a partire da composti presenti negli scarti agroalimentari.

La prima parte del lavoro ha previsto la messa a punto di una serie di metodologie di protezione delle molecole in esame. Nello specifico, è stata sviluppata una procedura di metilazione di flavoni impiegando il dimetilcarbonato (DMC), un composto ecocompatibile, nel ruolo di solvente/reagente, in sostituzione dei tossici e cancerogeni agenti metilanti di uso comune quali lo ioduro di metile e il dimetilsolfato. Il sistema si è rivelato efficiente, i prodotti metilati sono stati ottenuti con rese quantitative. Tale reagente è stato utilizzato anche per metilare i flavoni, importanti prodotti biologicamente attivi, dotati di maggiore biodisponibilità rispetto ai corrispondenti composti idrossilati.

Successivamente, il DMC è stato impiegato come agente carbossimetilante per la protezione selettiva di funzioni alcoliche presenti nei composti fenolici e come solvente nelle reazioni di acetilazione selettiva degli stessi composti. Sono state messe a punto due metodologie di acetilazione; la prima con anidride acetica in presenza di quantità catalitiche di tricloruro di rutenio e la seconda con cloruro di acetile in assenza di catalizzatore. Quest'ultima procedura è stata estesa per esterificare le funzioni alcoliche di composti fenolici con cloruri di acidi a catena lunga satura e insatura. La maggior parte di queste reazioni è avvenuta con conversioni e rese quantitative e il prodotto target è stato recuperato puro per semplice work-up. Oltre alla metodologia di protezione, sono risultati interessanti anche alcuni dei prodotti ottenuti, in particolare i derivati dell'idrossitirosolo, in quanto molecole antiossidanti dotate di una maggiore lipofilità e quindi maggiore biodisponibilità rispetto a quelle naturali.

L'impiego dei reagenti ossidanti appartenenti alla famiglia dello iodio ipervalente, quali l'IBX e il DMP, ci ha permesso di raggiungere altri importanti obiettivi. Sfruttando la capacità di tali ossidanti di formare la funzione catecolica per inserzione ossidrilica o demetilazione ossidativa, è stato possibile mettere a punto nuove procedure sintetiche dell'idrossitirosolo, una molecola dotata di molteplici attività biologiche, a partire da materiali di partenza presenti negli scarti agroindustriali, quali il tirosolo e l'alcol omovanillico. Tali procedure, per la loro originalità, semplicità, economicità, efficienza e il basso impatto ambientale, sono state oggetto di un brevetto nazionale ed uno internazionale. La sintesi dell'idrossitirosolo è stata presa come metodologia di riferimento per verificare l'efficienza nelle reazioni di inserzione

ossidrilica e demetilazione ossidativa dell'IBX supportato su polistirene. Il nuovo reattivo eterogeneo ha mostrato una selettività elevata; è stato recuperato e riutilizzato per dieci volte con un notevole abbattimento dei costi e dell'impatto ambientale del processo ossidativo.

Inoltre, sono state sintetizzate altre molecole di pregio quali il piceatannolo e derivati lipofili per sintesi diretta dal *trans*-resveratrolo, composto presente negli scarti della lavorazione del vino; i flavoni e flavanoni con struttura catecolica, importanti antiossidanti; gli 1-arilisocromani poliossidrilati. Lo studio sulle ossidazioni con IBX è proseguito analizzandone altre potenzialità quali la capacità di deidrogenare in posizione adiacente ad un gruppo carbonilico per sintetizzare flavoni a partire da flavanoni, e la capacità di ossidare la posizione benzilica per indurre l'apertura d'anello di 1-arilisocromani allo scopo di formare importanti fine-chemicals.

Gli ultimi e più recenti dati sono relativi all'impiego della catalisi ossidativa enzimatica ricorrendo al sistema O₂/laccasi/HBT per ossidare la posizione benzileterea degli 1-arilisocromani e la posizione benzilica delle catechine. I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti. In particolare, nell'ossidazione delle catechine, il sistema catalitico ha mostrato una stereoselettività nell'inserzione ossidrilica in posizione C-4 che mima quanto avviene in natura ad opera di batteri endofiti delle piante del tè.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Strumenti e materiali utilizzati

Gli spettri di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) sono stati registrati con uno spettrofotometro Bruker 200 MHz, usando solventi deuterati quali cloroformio deuterato (CDCl_3), metanolo deuterato (CD_3OD) acetone deuterato ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) ed acqua deuterata (D_2O). I chemical shift sono espressi in parti per milione (ppm) e le costanti di accoppiamento in Hertz (Hz).

Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando un gascromatografo Shimadzu GC-17 A con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) interfacciato con uno spettrometro di massa GC/MS QP 5050A, equipaggiato con una colonna capillare Supelco CPSIL8CB lunga 30 metri. La programmata più utilizzata è stata la seguente: temperatura iniziale: 100°C ; temperatura finale: 280°C ; velocità: $10^\circ\text{C}/\text{min}$; temperatura dell'iniettore e del detector: 280°C .

Gli spettri HPLC sono stati registrati con uno strumento Varian ProStar con un rivelatore UV, equipaggiato con una colonna Varian Pursuit 5 C18 $150 \times 4,6$ mm.

Il programma utilizzato, alla lunghezza d'onda di 280 nm, è stato:

Tempo (min)	Eluente	
	Acqua (%)	Acetonitrile (%)
Prerun	90	10
10	90	10
25	40	60
30	40	60
35	90	10

Le analisi UV-Vis sono state condotte con uno strumento Perkin Elmer Lambda 20, con cuvette in quarzo ($1 \times 1 \times 3$ cm).

Il decorso delle reazioni è stato monitorato attraverso cromatografia su strato sottile (TLC), utilizzando come fase stazionaria gel di silice Merck (230-400 mesh) e come fase mobile miscele di etere di petrolio/etil acetato o diclorometano/metanolo. I rivelatori utilizzati sono stati la lampada UV ($\lambda = 254$ nm); una soluzione etanolica di p-anisaldeide; il reattivo molibdico; un reattivo allo iodio; un reattivo contenente acido solforico.

I prodotti chimici commerciali e i solventi utilizzati sono stati acquistati presso le ditte Sigma-Aldrich, Fluka, Acros.

5.2 Procedura generale di metilazione di flavoni e flavonoli con il sistema DMC/DBU

In un tipico esperimento, il substrato (1 mmole) è stato solubilizzato in DMC (8 ml) e dopo aggiunta della base DBU (1.2 mmoli), la miscela è stata lasciata in agitazione alla temperatura di riflusso (90°C) e monitorata via TLC. A completa scomparsa del substrato, il solvente è stato allontanato per evaporazione a pressione ridotta dopo l'aggiunta di 3 volumi di MeOH con il quale il DMC forma un azeotropo. Il residuo organico ottenuto è stato solubilizzato con etil acetato, procedendo quindi alla fase di lavaggio con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio (NaCl). Alla fase organica è stato aggiunto sodio solfato anidro per eliminare residui acquosi della lavorazione. Dopo filtrazione del sodio solfato, il solvente organico è stato eliminato per distillazione sotto pressione. Se necessario, il grezzo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica utilizzando come fase fissa gel di silice (230-400 mesh, Aldrich), e fase mobile diclorometano/metanolo.

5.3 Procedura generale di carbossimetilazione di ossidrili alcolici

In un tipico esperimento, il substrato (1 mmole) è stato solubilizzato in dimetil carbonato (10 ml); dopo aggiunta di DBU (1.2 mmoli o 0.1 mmoli) o H_2SO_4 (0.2 mmoli) la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica alla temperatura di riflusso e monitorata via TLC. Alla completa scomparsa del substrato, il solvente è stato allontanato per evaporazione a pressione ridotta dopo l'aggiunta di 3 volumi di MeOH. Il residuo organico ottenuto è stato solubilizzato con etil acetato, procedendo quindi alla fase di lavaggio con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio (NaCl). Alle fasi organiche riunite è stato aggiunto sodio solfato anidro per eliminare residui acquosi della lavorazione. Dopo filtrazione del sodio solfato, il solvente organico è stato eliminato per distillazione a pressione ridotta. Quando necessario, il grezzo ottenuto è stato purificato tramite colonna cromatografica utilizzando come fase fissa gel di silice (230-400 mesh, Aldrich), e fase mobile etilacetato/etere di petrolio.

5.4 Misure di attività antiossidante con il metodo della DPPH

Aliquote di una soluzione di molecola da testare come antiossidante, solubilizzata in metanolo, sono state aggiunte a 2.8 ml di una soluzione 6×10^{-5} M di DPPH in metanolo. Il decremento di assorbanza del radicale libero della DPPH è stato determinato per via spettrofotometrica, registrando i valori ottenuti, alla $\lambda = 516$ nm ($\epsilon_{516} = 10357 \pm 162 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 25°C nel tempo, fino ad arrivare ad un plateau. Per ogni concentrazione di antiossidante, è stata registrata la cinetica di reazione. Da questi grafici è stato determinato il valore percentuale di assorbanza della DPPH rimasta inalterata allo stato stazionario, corretto per comparazione con la soluzione di DPPH di controllo, priva cioè della molecola da testare. I valori così ottenuti sono stati riportati in un altro grafico in funzione del rapporto molare tra antiossidante e DPPH, da cui è stata estrapolata l'attività antiossidante espressa come la quantità di antiossidante necessaria a ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH (EC₅₀):

$$\text{Concentrazione Efficiente (EC}_{50}\text{)} = \text{mmoli/L antiossidante/moli/L DPPH}$$

5.5 Procedura di sintesi del 3-(2-idrossifenil)-1-propanolo **33**¹²⁵

Una soluzione di 3,4-diidrocumarina **32** (10 mmole) in etere etilico anidro (8 ml) è stata aggiunta goccia a goccia, a temperatura ambiente, ad una sospensione posta in agitazione di LiAlH₄ (15 mmoli) in etere etilico anidro. La miscela di reazione è stata messa a riflusso per 4 h e lasciata in agitazione a temperatura ambiente tutta la notte. L'eccesso di LiAlH₄ è stato distrutto per cauta aggiunta di una miscela di THF/H₂O (1:1 v/v, 1 ml) e successiva agitazione di 30 minuti. Quindi è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di H₂SO₄ (5%, 6 ml) fino a completa scomparsa del gas che si sprigiona dall'ambiente di reazione. La fase acquosa è stata separata, ed estratta con etere etilico (2x6 ml). Le fasi organiche riunite sono state lavate con H₂O (6 ml), una soluzione acquosa al 5% di NaHCO₃ (6 ml), una soluzione satura di NaCl (6 ml) e seccate con Na₂SO₄. Il solvente organico è stato eliminato per distillazione sotto pressione. Il grezzo di reazione è stato purificato con una colonna cromatografica utilizzando come fase fissa gel di silice (230-400 mesh, Aldrich), e fase mobile diclorometano/etilacetato (7/1).

5.6 Procedura di acetilazione selettiva, con anidride acetica e tricloruro di rutenio, di ossidrili alcolici

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetil carbonato (3 ml), posta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente, sono stati aggiunti anidride acetica (1.2 mmoli) e cloruro di rutenio (0.01 mmoli). La reazione è stata monitorata via TLC e GC/MS. Alla completa scomparsa del substrato, il dimetil carbonato è stato allontanato dalla miscela di reazione mediante distillazione a pressione ridotta. Il grezzo ottenuto è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaCl. La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e poi seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo aver allontanato il solvente per distillazione a pressione ridotta, quando necessario, il prodotto ottenuto è stato purificato su colonna cromatografica utilizzando come fase fissa gel di silice (230-400 mesh, Aldrich) e come fase mobile una miscela di etere di petrolio/etil acetato.

5.7 Procedura generale di esterificazione selettiva, con cloruri acilici, di ossidrili alcolici

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilcarbonato (3 ml), posta sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente, sono state aggiunte 1.2 mmoli di cloruro dell'acido. La reazione è stata monitorata tramite TLC. Dopo la completa scomparsa del substrato, il solvente di reazione è stato allontanato per distillazione a pressione ridotta. Il residuo è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaCl. La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità, quindi seccate su Na_2SO_4 anidro. Se necessario, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etil acetato.

5.8 Procedura generale di idrolisi basica o acida di gruppi esterei o carbossimetilici

In un tipico esperimento, il substrato (1 mmole) è stato solubilizzato in acqua/THF (1:1). Dopo l'aggiunta di HCl 37% (1.5 mmoli per ogni gruppo idrolizzabile) o KOH (1.5 mmoli per ogni gruppo idrolizzabile), la miscela è stata posta sotto agitazione magnetica alla temperatura opportuna fino a completa scomparsa del substrato. La reazione è stata monitorata via TLC e GC/MS. Alla completa scomparsa del substrato, il solvente è stato allontanato per distillazione a pressione ridotta. Dopo aver portato il pH della fase acquosa

residua a circa 7, per aggiunta di acido o di base, si è proceduto all'estrazione con etil acetato per 3 volte. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio; quindi è stato aggiunto sodio solfato anidro per eliminare residui acquosi della lavorazione. Dopo filtrazione del sodio solfato, il prodotto è stato recuperato per evaporazione del solvente organico per distillazione a pressione ridotta.

5.9 Riduzione con sodioboroidrurio

Il substrato (1 mmole), solubilizzato in THF (10 ml), dopo aggiunta di sodioboroidrurio (5 mmoli) è stato lasciato sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata via TLC e GC/MS. Dopo la completa scomparsa del substrato, il solvente è stato allontanato per evaporazione a pressione ridotta. Il residuo organico è stato solubilizzato con etil acetato e lavato con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio. Alla fase organica è stato aggiunto sodio solfato anidro per eliminare residui acquosi della lavorazione. Dopo filtrazione del sodio solfato, il prodotto è stato recuperato per evaporazione del solvente organico per distillazione a pressione ridotta.

5.10 Ossidazione dell'acido o-iodobenzoico ad IBX

Ad una soluzione di acido o-iodobenzoico (20 mmoli), solubilizzato in acqua (65 ml) è stato aggiunto oxone (29 mmoli). La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica per circa 3 ore alla temperatura di 70°C. La sospensione è stata quindi raffreddata a 5 °C e mantenuta a questa temperatura per circa 1.5 ore sotto leggera agitazione. La miscela è stata filtrata sotto vuoto, lavando ripetutamente il solido prima con acqua (6x10 ml) e poi con acetone (2x10 ml). Il solido è stato seccato a temperatura ambiente per tutta la notte e recuperato con una resa del 75-80 %.

5.11 Reazione di inserzione ossidrilica di composti fenolici con IBX

Ad una soluzione di fenolo (1 mmole) in metanolo (4 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura di 0 °C, è stato aggiunto IBX (1.2 mmoli). Dopo 30 minuti si è osservata la scomparsa del substrato. Alla soluzione sono stati aggiunti acqua (4 ml) e sodio ditionito (2 mmoli); la miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica fino ad osservare una variazione cromatica da rosso a bianco (5 minuti). Dopo aver allontanato il metanolo per distillazione a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una

soluzione satura di sodio bicarbonato. La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto è stato recuperato dopo distillazione del solvente a pressione ridotta.

5.12 Reazione di inserzione ossidrilica di composti fenolici con DMP

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in tetraidrofurano (4 ml) posta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente, sono state aggiunte 1.2 mmoli di reattivo di Dess-Martin. Dopo un'ora, si è osservata la scomparsa del substrato. Alla soluzione è stata aggiunta acqua (4 ml) e sodio ditionito (2 mmoli, 348 mg). La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica fino ad osservare una variazione cromatica da rosso a bianco (5 minuti). Dopo aver allontanato il solvente per distillazione a pressione ridotta, il residuo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di sodio bicarbonato. La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto è stato recuperato per distillazione del solvente a pressione ridotta.

5.13 Reazione di demetilazione ossidativa di composti fenolici con IBX

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in THF (3 ml) e acqua (300 μ l), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, sono state aggiunte 1.2 mmoli di IBX. Dopo la completa scomparsa del substrato, alla soluzione sono stati aggiunti acqua (3 ml) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 mmoli). La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica per 5 minuti, la variazione cromatica che si osserva da rosso a bianco indica la fine della reazione. Dopo aver allontanato il THF per distillazione a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta e purificazione cromatografica si è ottenuto il prodotto puro.

5.14 Reazione di demetilazione ossidativa di composti fenolici con DMP

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in THF (3 ml) e acqua (300 μ l), posta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente, sono state aggiunte 1.2 mmoli di reattivo di Dess-Martin. Alla completa scomparsa del substrato, alla soluzione si sono aggiunti acqua (3 ml) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 mmoli) ed è stata mantenuta l'agitazione magnetica per 5 minuti. La variazione cromatica da rosso intenso a giallo pallido indica la fine della reazione. Dopo aver allontanato il solvente per distillazione a pressione ridotta, il residuo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta e purificazione per cromatografia in silice flash su colonna si è ottenuto il prodotto puro.

5.15 Sintesi one-pot di idrossitirosolo carbossimetilato

Ad una soluzione di tirosolo (1 mmole) in dimetilcarbonato (3 ml), sotto agitazione magnetica, alla temperatura di riflusso, sono state aggiunte 0.2 mmoli di H_2SO_4 96%. Dopo 8 ore si è osservato la completa scomparsa del substrato. La miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente e si sono aggiunti 2 ml di acqua e 1.2 mmoli di DMP. Trascorsi 50 minuti, si è aggiunto $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 mmoli) e si è lasciato sotto agitazione magnetica per 5 minuti. Dopo aver allontanato il solvente per distillazione a pressione ridotta, il residuo è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità, quindi seccate su Na_2SO_4 anidro. Il prodotto è stato recuperato per distillazione a pressione ridotta.

5.16 Reazione di inserzione ossidrilica di composti fenolici con IBX supportato su polistirene

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilcarbonato (10 ml), sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, sono state aggiunte 2.1 mmoli di IBX supportato. Alla completa scomparsa del substrato, la resina è stata rimossa per filtrazione e lavata con dimetilcarbonato. La miscela di reazione è stata versata direttamente nell'ambiente riducente costituito da acqua (10 ml) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 mmoli) posto sotto agitazione magnetica, fino a

completa variazione cromatica da rosso a giallo pallido. Dopo aver allontanato il solvente per distillazione a pressione ridotta, il residuo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione di HCl (1N). La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta e purificazione per cromatografia in silice flash su colonna si è ottenuto il prodotto puro. La resina è stata seccata a temperatura ambiente.

5.17 Reazione di demetilazione ossidativa di composti fenolici con IBX supportato su polistirene

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilcarbonato (10 ml), sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, sono state aggiunte 100 μl di acqua e 2.1 mmoli di IBX supportato. Alla completa scomparsa del substrato, la resina è stata rimossa per filtrazione e lavata con dimetilcarbonato. La miscela di reazione è stata versata direttamente nell'ambiente riducente costituito da acqua (10 ml) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 mmoli) posto sotto agitazione magnetica, fino a completa variazione cromatica da rosso a giallo pallido. Dopo aver allontanato il solvente per distillazione a pressione ridotta, il residuo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione di HCl (1N). La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta e purificazione per cromatografia in silice flash su colonna si è ottenuto il prodotto puro. La resina è stata seccata a temperatura ambiente.

5.18 Reazione di rigenerazione dell'IBX supportato su polistirene

Ad una sospensione di resina (1 mmole) in diclorometano (13 ml), sotto agitazione, a temperatura ambiente, sono stati aggiunti tetrabutylammonio oxone (5 mmoli) e acido metansolfonico (5 mmoli). Dopo 3 h la resina è stata filtrata e lavata con diclorometano e etere etilico (7 volte), quindi è stata lasciata seccare a temperatura ambiente over-night.

5.19 Sintesi di derivati lipofili di piceatannolo con IBX

Ad una soluzione di fenolo (1 mmole) in dimetilsolfossido (10 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, è stato aggiunto IBX (1.2 mmoli). Alla completa scomparsa del substrato, sono stati aggiunti acqua (10 ml) e sodio ditionito (2 mmoli); la miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica fino ad osservare una variazione cromatica da rosso a bianco (5 minuti). La miscela di reazione è stata estratta con etilacetato per 3 volte. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di bicarbonato di sodio, quindi con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto è stato recuperato dopo distillazione del solvente a pressione ridotta. Quando necessario, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

5.20 Procedura generale di inserzione ossidrilica e demetilazione ossidativa di flavonoidi con IBX.

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilsolfossido (10 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla opportuna temperatura (da RT a 80°C), è stato aggiunto IBX (2 mmoli). A completa scomparsa del substrato, alla soluzione sono stati aggiunti acqua (10 ml) e sodio ditionito (2 mmoli); la miscela è stata posta sotto agitazione magnetica fino ad osservare una variazione cromatica da rosso a bianco. Alla miscela di reazione si è aggiunto acqua ed è stata estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione di tampone fosfato a pH=8 per eliminare l'acido iodobenzoico residuo, con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto è stato recuperato dopo distillazione del solvente a pressione ridotta. Quando necessario, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

5.21 Procedura generale di metilazione di ossidrili fenolici, alcolici e acidi carbossilici

In un tipico esperimento, il substrato (1 mmole) è stato solubilizzato in acetone (10 ml); dopo aggiunta di carbonato di potassio e dimetilsolfato (rispettivamente 1.5 e 3 equivalenti per ogni ossidrile alcolico o carbossilico), la miscela è stata posta sotto agitazione magnetica alla appropriata temperatura fino a conversione completa del substrato. La reazione è stata monitorata via TLC e GC/MS. Successivamente, il solvente è stato allontanato per

evaporazione a pressione ridotta, quindi è stata aggiunta una soluzione di HCl (1M) fino a portare il pH a circa 7. Si è proceduto alla fase di estrazione con etil acetato della soluzione acquosa (3 estrazioni). Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio (NaCl) e seccate su sodio solfato anidro per eliminare residui acquosi della lavorazione. Dopo filtrazione del sodio solfato, il solvente organico è stato eliminato per distillazione a pressione ridotta, recuperando il prodotto desiderato.

5.22 Procedura generale di acetilazione di ossidrili fenolici ed alcolici

In un tipico esperimento, il substrato (1 mmole) è stato solubilizzato in piridina e dopo l'aggiunta di anidride acetica (10 equivalenti per ogni ossidrile), la miscela è stata lasciata in agitazione, alla appropriata temperatura, fino a conversione completa del substrato. La reazione è stata monitorata via TLC e GC/MS. Successivamente, è stata aggiunta una soluzione di HCl (1M) per neutralizzare la piridina e si è proceduto alla fase di estrazione con etil acetato della soluzione acquosa (3 estrazioni). Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio (NaCl) e seccate su sodio solfato anidro per eliminare residui acquosi della lavorazione. Dopo filtrazione del sodio solfato, il prodotto puro è stato ottenuto per evaporazione del solvente organico per distillazione a pressione ridotta.

5.23 Procedura generale di deidrogenazione di flavanoni con IBX

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilsolfossido (10 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla opportuna temperatura (da 70 a 95°C), è stato aggiunto IBX (2 mmoli). A completa scomparsa del substrato, alla miscela di reazione è stata aggiunta acqua ed estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione di tampone fosfato a pH=8 per eliminare l'acido iodobenzoico residuo, con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto è stato recuperato dopo distillazione del solvente a pressione ridotta. Quando necessario, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

5.24 Procedura generale di sintesi di isocromani (oxa-Pictet Spengler) da acetaldeide

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in diclorometano (4 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura di 0°C, è stato aggiunto acido solforico (0.2 mmoli) e, goccia a goccia, una soluzione di acetaldeide (2 mmoli) in diclorometano (4 ml). A completa scomparsa del substrato, alla miscela di reazione è stata aggiunta acqua ed estratta per tre volte con diclorometano. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato in rapporto 3/1.

5.25 Procedura generale di sintesi di isocromani (oxa-Pictet Spengler) da acetone

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in acetone (4 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, è stato aggiunto acido solforico (0.2 mmoli). A completa scomparsa del substrato, il solvente è stato allontanato a pressione ridotta. Alla miscela di reazione è stata aggiunta acqua ed estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto puro è stato ottenuto per evaporazione del solvente a pressione ridotta.

5.26 Procedura generale di sintesi di isocromani (oxa-Pictet Spengler)

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilcarbonato (8 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, è stato aggiunto acido solforico (0.2 mmoli). A completa scomparsa del substrato, il solvente è stato allontanato a pressione ridotta. Alla miscela di reazione è stata aggiunta acqua ed estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta, quando necessario, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

5.27 Procedura generale di inserzione ossidrilica di isocromani con IBX

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in THF (8 ml) , posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, è stata aggiunta l'opportuna quantità di IBX (1.1 o 2.1 mmoli). Dopo la completa scomparsa del substrato, alla soluzione sono stati aggiunti acqua (8 ml) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 o 4 mmoli). La miscela è stata posta sotto agitazione magnetica per 5 minuti, la variazione cromatica che si osserva da rosso a bianco indica la fine della reazione. Dopo aver allontanato il THF per distillazione a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

5.28 Procedura generale di demetilazione ossidativa di isocromani

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in THF (8 ml) e acqua (800 μl), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, è stata aggiunta l'opportuna quantità di IBX (1.1 o 2.1 mmoli). Dopo la completa scomparsa del substrato, alla soluzione sono stati aggiunti acqua (8 ml) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (2 o 4 mmoli). La miscela è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 5 minuti; la variazione cromatica che si osserva da rosso a bianco indica la fine della reazione. Dopo aver allontanato il THF per distillazione a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato solubilizzato con etil acetato e trattato con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di NaCl fino a neutralità e seccate su Na_2SO_4 anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

5.29 Procedura generale di determinazione quantitativa HPLC di rese e conversioni mediante il metodo dello standard interno.

Lo standard interno scelto è stato il 6-metossi-1-metil-isocroman-7-olo **133** (**Figura 23**) che è risultato stabile, ha mostrato caratteristiche chimico-fisiche simili ai componenti la reazione con un tempo di ritenzione sufficientemente diverso.

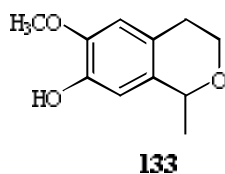


Figura 40. Struttura dello standard interno **133**.

Inizialmente sono state preparate le soluzioni standard per il calcolo del fattore di risposta (R_f) di ogni composto secondo la formula:

$$R_f = (A_{st} \times C_c) / (C_{st} \times A_c)$$

dove:

A_{st} = area del picco dello standard

C_{st} = concentrazione dello standard

A_c = area del picco del campione

C_c = concentrazione del campione

I componenti la soluzione standard devono essere puri e avere la stessa concentrazione per minimizzare gli errori.

Il composto standard è stato aggiunto nell'ambiente di reazione alla stessa concentrazione del substrato, al termine della lavorazione, dopo opportuna diluizione la miscela è stata iniettata all'HPLC.

Il calcolo delle concentrazioni dei prodotti è stato eseguito secondo la relazione:

$$C_c = (A_c \times C_{st} \times R_f) / A_{st}$$

5.30 Procedura generale dell'ossidazione della posizione benzileterea di 1-arilisocromani con IBX

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in dimetilsolfossido (10 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla opportuna temperatura (da 80 a 95°C), è stato aggiunto IBX (3 mmoli). A completa scomparsa del substrato, alla miscela di reazione è stata aggiunta acqua ed essa è stata estratta per tre volte con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono state lavate con una

soluzione di tampone fosfato a pH=8 per eliminare l'acido iodobenzoico residuo, con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità e seccate su solfato di sodio anidro. Il prodotto è stato recuperato dopo distillazione del solvente a pressione ridotta. Quando necessario, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

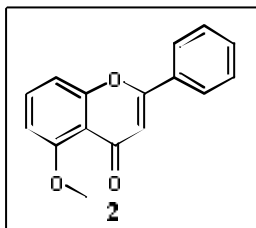
5.31 Procedura generale di protezione della funzione catecolica via acetonide ¹⁶⁰

Ad una soluzione di substrato (1 mmole) in cloroformio (10 ml), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura di riflusso, sono stati aggiunti 2,2-dimetossipropano (9 mmoli) e acido camforsolfonico (0.16 mmoli). Alla completa scomparsa del substrato la miscela di reazione è stata neutralizzata con una soluzione satura di bicarbonato di sodio. La risultante fase acquosa è stata estratta per tre volte con cloroformio. Le fasi organiche riunite sono state seccate su sodio solfato anidro e dopo filtrazione evaporate a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etereetilico per gli isocromani e diclorometano/metanolo per le catechine.

5.32 Procedura generale di ossidazione con il sistema O₂/Laccasi/HBT.

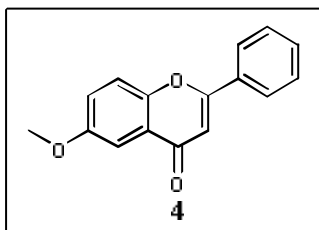
Ad una soluzione di substrato (0.1 mmole) nell'opportuna miscela di solventi (2 ml): Tampone acetato (pH=5)/1,4 diossano (1/1v) e Tampone acetato (pH=5)/DMC (5/1), posta sotto agitazione magnetica, alla temperatura ambiente, sono stati aggiunti HBT (0.033 mmoli) e laccasi (15 U). Si sono effettuate aggiunte successive di enzima ogni 8 ore fino al termine della reazione. Alla completa scomparsa del substrato la miscela di reazione è stata diluita con etilacetato e le fasi organiche estratte con una soluzione satura di NaCl. La fase acquosa è stata estratta con etilacetato. Le fasi organiche riunite sono state seccate su sodio solfato anidro. Dopo distillazione del solvente a pressione ridotta, il grezzo di reazione è stato purificato su colonna cromatografica di gel di silice (230-400 mesh), utilizzando come eluente la miscela etere di petrolio/etilacetato.

6. DATI SPETTROSCOPICI E SPETTRI NMR DI INTERESSE



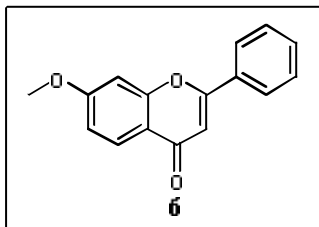
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.89 (3H, s, OCH₃), 6.62 (1H, s, *H*-3), 6.72 (1H, dd, *J*_o= 8.3, *H*-6), 7.021 (1H, dd, *J*_o= 8.4, *H*-8), 7.434 (4H, m, *H*-7, 3', 4', 5'), 7.778 (2H, m, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 56.3 (OCH₃), 106.3 (C-8), 108.9 (C-3), 110.0 (C-6), 114.4 (C-10), 125.8 (C-2'), 125.8 (C-6'), 128.8 (C-3'), 128.8 (C-5'), 131.2 (C-4'), 131.2 (C-1'), 133.6 (C-7), 158.1 (C-9), 159.6 (C-5), 160.9 (C-2), 178.1 (C-4).



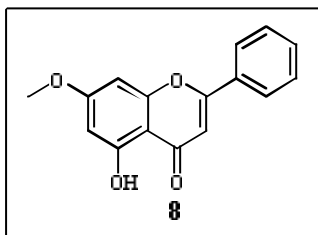
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.85 (3H, s, OCH₃), 6.763 (1H, s, *H*-3), 7.228 (1H, dd, *J*_m=3.1, *J*_o=9.1, *H*-7), 7.475 (5H, m, *H*-5, 8, 3', 4', 5'), 7.85 (2H, m, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.8 (OCH₃), 104.8 (C-5), 106.7 (C-3), 119.4 (C-8), 123.7 (C-7), 124.4 (C-10), 126.1 (C-2'), 126.1 (C-6'), 128.9 (C-3'), 128.9 (C-5'), 131.4 (C-4'), 131.8 (C-1'), 151.0 (C-9), 157.0 (C-6), 163.1 (C-2), 178.1 (C-4).



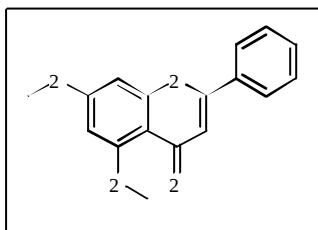
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.90 (3H, s, OCH₃), 6.738 (1H, s, *H*-3), 6.957 (2H, m, *H*-6,8), 7.487 (3H, m, *H*-3', 4', 5'), 7.872 (2H, m, *H*-2', 6'), 8.097 (1H, d, *J*_o= 9.3, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.8 (OCH₃), 100.3 (C-8), 107.4 (C-3), 114.3 (C-6), 117.7 (C-10), 126.0 (C-5), 126.9 (C-2'), 126.9 (C-6'), 128.9 (C-3'), 131.3 (C-5'), 131.7 (C-4'), 131.7 (C-1'), 157.9 (C-9), 162.9 (C-2), 164.1 (C-7), 177.8 (C-4).



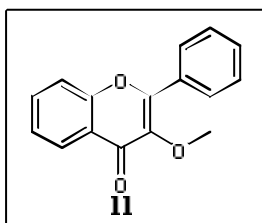
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.867 (3H, s, OCH₃), 6.36 (1H, d, *J*_m= 2.3, *H*-6), 6.49 (1H, d, *J*_m= 2.3, *H*-8), 6.65 (1H, s, *H*-3), 7.51 (3H, m, *H*-3', 4', 5'), 7.870 (2H, m, *H*-2', 6'), 12.71 (1H, s, OH).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.8 (OCH₃), 92.7 (C-8), 98.2 (C-6), 105.9 (C-3), 105.9 (C-10), 126.3 (C-2'), 126.3 (C-6'), 129.1 (C-3'), 129.1 (C-3'), 131.3 (C-1'), 131.8 (C-4'), 158.0 (C-9), 162.2 (C-5), 164.0 (C-2), 165.6 (C-7), 182.5 (C-4).



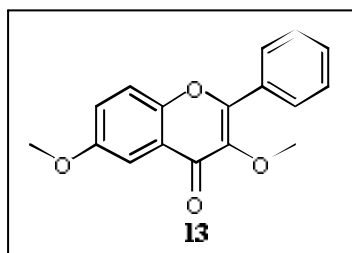
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.90 (3H, s, OCH₃), 6.31 (1H, d, *J*_m= 2.3, *H*-6), 6.514 (1H, d, *J*_m= 2.3, *H*-8), 6.62 (1H, s, *H*-3), 7.44 (3H, m, *H*-3', 4', 5'), 7.80 (2H, m, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.7 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 92.7 (C-8), 96.1 (C-6), 108.9 (C-3), 108.9 (C-3), 125.8 (C-2'), 125.8 (C-6'), 128.8 (C-3'), 128.8 (C-5'), 131.1 (C-4'), 131.4 (C-1'), 159.8 (C-5), 160.5 (C-9), 160.8 (C-2), 164.0 (C-7), 177.5 (C-4).



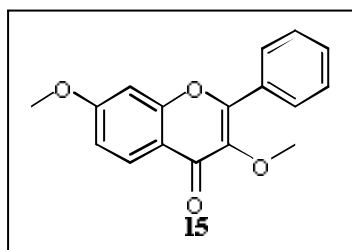
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.86 (3H, s, OCH₃), 7.34-7.38 (1H, m, *H*-6), 7.45-7.50 (4H, m, *H*-8, 3', 4', 5'), 7.58-7.62 (1H, m, *H*-7), 8.03-8.08 (2H, m, *H*-2', 6'), 8.22 (1H, dd, *J*₀=7.94, *J*_m=1.62, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 60.1 (OCH₃), 118.0 (C-8), 124.2 (C-5), 124.6 (C-6), 125.7 (C-10), 128.5 (C-2'), 128.5 (C-6'), 130.7 (C-1'), 130.9 (C-4'), 133.4 (C-7), 141.5 (C-3), 155.2 (C-9), 155.5 (C-2), 175.1 (C-4).



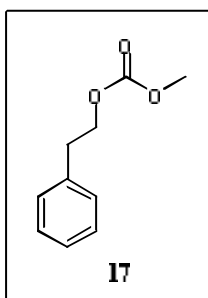
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 7.27 (1H, m, *H*-7), 7.47 (m, 4H, *H*-8, 3', 4', 5'), 7.590 (1H, d, *J_m* = 3.00, *H*-5), 8.07 (m, 2H, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.9 (OCH₃), 60.1 (OCH₃), 104.5 (C-5), 119.4 (C-8), 123.9 (C-7), 124.8 (C-10), 128.4 (C-2'), 128.5 (C-6'), 130.6 (C-4'), 131.0 (C-1'), 141.1 (C-3), 150.2 (C-9), 155.4 (C-2), 156.6 (C-6), 174.9 (C-4).



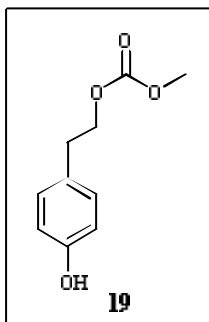
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 6.95 (2H, m, *H*-6, 8), 7.45 (3H, m, *H*-3', 4', 5'), 8.00 (3H, m, *H*-5, 2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.8 (OCH₃), 60.1 (OCH₃), 99.9 (C-5), 114.4 (C-8), 119.0 (C-10), 127.1 (C-7), 128.3 (C-2'), 128.3 (C-6'), 128.5 (C-3'), 128.5 (C-5'), 130.5 (C-4'), 131.0 (C-1'), 141.5 (C-3), 155.2 (C-9), 158.0 (C-2), 164.0 (C-6), 175 (C-4).



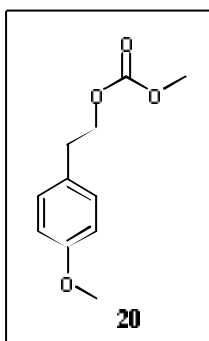
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.97 (2H, t, *J* = 7.1, *H*-2'), 3.75 (3H, s, OCH₃), 4.33 (2H, t, *J* = 7.1, *H*-1'), 7.247 (5H, m, *H*-2, 3, 4, 5, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 35.1 (C-2'), 54.7 (OCH₃), 68.4 (C-1'), 126.7 (C-4), 128.6 (C-3), 128.6 (C-5), 128.9 (C-2), 128.9 (C-6), 137.3 (C-1), 155.7 (COOCH₃)



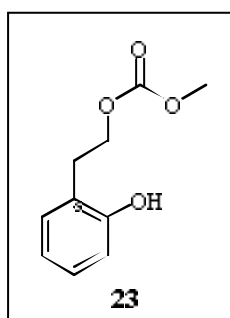
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.88 (2H, t, J=7.1, *H*-2'), 3.75 (3H, s, OCH₃), 4.28 (2H, t, J=7.1, *H*-1'), 6.74 (2H, d, J=8.6, *H*-3, 5), 7.03 (2H, d, J=8.6, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.2 (*C*-2'), 54.8 (OCH₃), 68.7 (*C*-1'), 115.4 (*C*-3), 115.4 (*C*-5), 129.2 (*C*-2), 129.2 (*C*-6), 130.1 (*C*-1), 154.4 (*C*-4), 155.9 (COOCH₃).



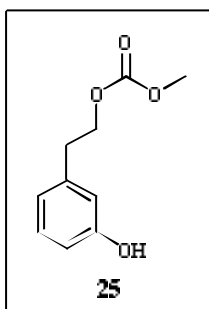
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.89 (2H, t, J= 7.1, *H*-2'), 3.73 (3H, s, COOCH₃), 3.75 (3H, s, OCH₃), 4.27 (2H, t, J=7.1, *H*-1'), 6.82 (2H, d, J= 8.6, *H*-3, 5), 7.11 (2H, d, J= 8.6, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.3 (*C*-2'), 54.7 (COOCH₃), 55.2 (OCH₃), 68.6 (*C*-1') 114.0 (*C*-3), 114.0 (*C*-5), 129.2 (*C*-2), 129.2 (*C*-6), 129.9 (*C*-1), 156.0 (COOCH₃), 158.4 (OCH₃).



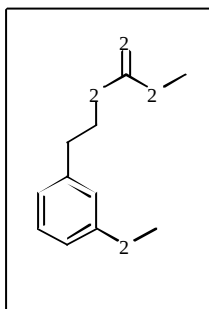
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.98 (2H, t, J=7.06, *H*-2'), 3.76 (3H, s, OCH₃), 4.33 (2H, t, J=7.06, *H*-1'), 6.77-6.88 (2H, m, *H*-3, 5), 7.07-7.12 (2H, m, *H*-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 30.1 (*C*-2'), 54.9 (OCH₃), 67.7 (*C*-1'), 115.8 (*C*-3), 120.7 (*C*-5), 123.3 (*C*-1), 128.3 (*C*-4), 131.1 (*C*-6), 154.3 (*C*-2), 156.0 (COOCH₃).



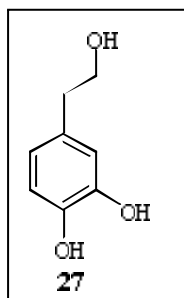
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.91 (2H, t, J=7.10, *H*-2'), 3.75 (3H, s, OCH₃), 4.31 (2H, t, J=7.10, *H*-1'), 6.68-6.79 (3H, m, *H*-2, 4, 6), 7.11-7.19 (1H, m, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.9 (*C*-2'), 54.8 (OCH₃), 68.3 (*C*-1'), 113.7 (*C*-4), 115.8 (*C*-2), 121.3 (*C*-6), 129.8 (*C*-5), 139.8 (*C*-1), 155.8 (*C*-3), 155.9 (COOCH₃).



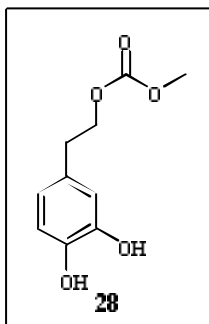
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.94 (2H, t, J= 7.2, *H*-2'), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.78 (3H, s,), 4.32 (2H, t, J= 7.2, *H*-1'), 6.78 (3H, m, *H*-2, 4, 6), 7.19 (1H, m, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 35.2 (*C*-2'), 54.7 (COOCH₃), 55.1 (OCH₃), 68.3 (*C*-1'), 112.1 (*C*-4), 114.7 (*C*-2), 121.2 (*C*-6), 129.5 (*C*-5), 138.8 (*C*-1), 155.7 (COOCH₃), 159.8 (OCH₃).



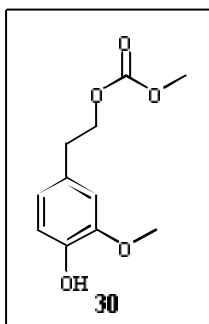
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.58 (2H, t, J=6.8, *H*-2'), 3.66 (2H, t, J=6.8, *H*-1'), 6.44 (1H, dd, J_m=1.8, J_o=8.0, *H*-6), 6.59 (1H, d, J=1.8, *H*-2), 6.64 (1H, d, J=8.0, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 38.1 (*C*-2'), 63.4 (*C*-1'), 115.3 (*C*-2), 115.9 (*C*-5), 120.6 (*C*-6), 130.6 (*C*-1), 143.8 (*C*-4), 144.2 (*C*-3).



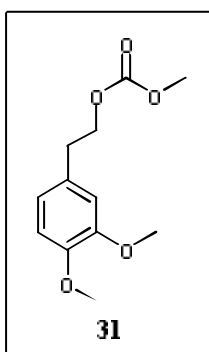
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.82 (2H, t, J=7.18, *H*-2'), 3.75 (3H, s, OCH₃), 4.26 (2H, t, J=7.18, *H*-1'), 6.60 (1H, dd, J_m=2.03, J_o=8.01, *H*-6), 6.70 (1H, d, J=1.9, *H*-2), 6.76 (1H, d, J=8.01, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.4 (*C*-2'), 54.8 (OCH₃), 68.7 (*C*-1'), 115.5 (*C*-5), 116.0 (*C*-2), 121.4 (*C*-6), 130.0 (*C*-1), 142.4 (*C*-4), 143.6 (*C*-3), 155.9 (COOCH₃).



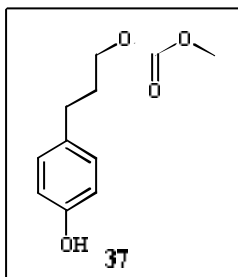
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.88 (2H, t, J=7.2, *H*-2'), 3.75 (3H, s, OCOOCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.29 (2H, t, J=7.2, *H*-1'), 6.68-6.72 (2H, m, *H*-2, 6), 6.83 (1H, d, J=8.5, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.8 (*C*-2'), 54.7 (OCOOCH₃), 55.9 (OCH₃), 68.6 (*C*-1'), 111.4 (*C*-2), 114.4 (*C*-5), 121.6 (*C*-6), 129.0 (*C*-1), 144.4 (*C*-4), 146.7 (*C*-3), 155.8 (OCOOCH₃).



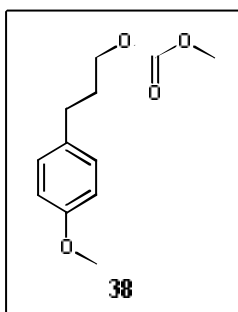
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.90 (2H, t, J= 7.2, *H*-2'), 3.74 (3H, s, COOCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 4.29 (2H, t, J= 7.2, *H*-1'), 6.756 (3H, m, *H*-2, 5, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.7 (*C*-2'), 54.7 (COOCH₃), 55.8 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 68.5 (*C*-1'), 111.4 (*C*-5), 112.2 (*C*-2), 120.9 (*C*-6), 129.7 (*C*-1), 147.9 (*C*-4), 149.0 (*C*-3), 155.7 (COOCH₃).



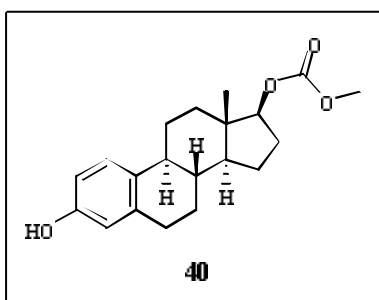
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.85-2.00 (2H, m, *H*-2'), 2.61 (2H, t, *J*=7.17, *H*-3'), 3.77 (3H, s, OCH₃), 4.13 (2H, t, *J*=7.17, *H*-1'), 6.74 (2H, d, *J*=8.58, *H*-3, 5), 7.02 (2H, d, *J*=8.58, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 30.4 (*C*-2'), 30.9 (*C*-3'), 54.8 (OCH₃), 67.4 (*C*-1'), 115.3 (*C*-3), 115.3 (*C*-5), 129.5 (*C*-2), 129.5 (*C*-6), 133.0 (*C*-1), 153.9 (*C*-4), 156.0 (COOCH₃).



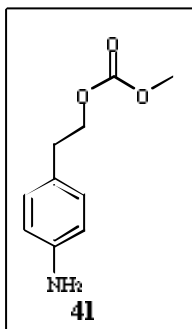
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.93 (2H, m, *H*-2'), 2.62 (2H, t, *J*= 7.2, *H*-3'), 3.75 (6H s, OCH₃), 4.11 (2H, t, *J*=6.5, *H*-1'), 6.79 (2H, d, *J*_o= 8.4, *H*-3, 5), 7.07 (2H, d, *J*_o= 8.4, *H*-3, 5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 30.4 (*C*-2'), 30.9 (*C*-3'), 54.6 (OCH₃), 54.6 (OCH₃), 67.3 (*C*-1'), 113.9 (*C*-3), 113.9 (*C*-5), 129.3 (*C*-2), 129.3 (*C*-6), 133.0 (*C*-1), 155.8 (COOCH₃), 158.0 (*C*-4).



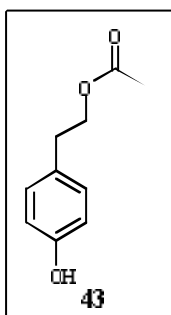
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.82 (3H, s, *H*-18), 1.21-2.25 (13H, m, *H*-7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16), 2.74-2.79 (2H, m, *H*-6), 3.78 (3H, s, OCH₃), 4.59 (1H, t, *J*=7.63, *H*-17), 6.54-6.64 (2H, m, *H*-2, 4), 7.10 (1H, d, *J*=8.33, *H*-1).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 11.9 (*C*-18), 23.1 (*C*-15), 26.1 (*C*-7), 27.1 (*C*-11), 27.4 (*C*-16), 29.7 (*C*-6), 36.8 (*C*-12), 38.5 (*C*-8), 43.0 (*C*-9), 43.7 (*C*-13), 49.6 (*C*-14), 54.7 (OCH₃), 86.6 (*C*-17), 112.8 (*C*-2), 115.3 (*C*-4), 126.5 (*C*-1), 132.2 (*C*-10), 138.0 (*C*-5), 153.6 (COOCH₃), 156.0 (*C*-3).



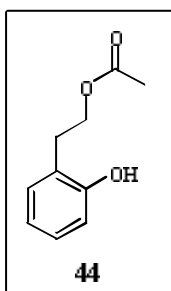
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.84 (2H, t, J=7.25, *H*-2'), 3.74 (3H, s, OCH₃), 4.25 (2H, t, J=7.25, *H*-1'), 6.61 (2H, d, J=8.35, *H*-3, 5), 6.99 (2H, d, J=8.35, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 34.3 (*C*-2'), 54.7 (OCH₃), 68.8 (*C*-1'), 115.3 (*C*-3), 115.3 (*C*-5), 127.0 (*C*-1), 129.8 (*C*-2), 129.8 (*C*-6), 145.0 (*C*-4), 155.8 (COOCH₃).



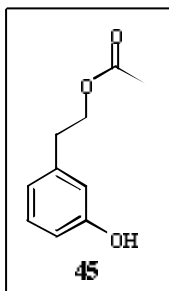
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.03 (3H, s, COCH₃), 2.83 (2H, t, J=7.1, *H*-2'), 4.22 (2H, t, J=7.0, *H*-1'), 6.74 (2H, d, J=8.6, *H*-3, 5), 7.03 (2H, d, J=8.6, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 21.0 (OCH₃), 34.2 (*C*-2'), 65.4 (*C*-1'), 115.4 (*C*-3), 115.4 (*C*-5), 129.6 (*C*-2), 129.6 (*C*-6), 130.0 (*C*-1), 154.5 (*C*-4), 171.6 (COCH₃).



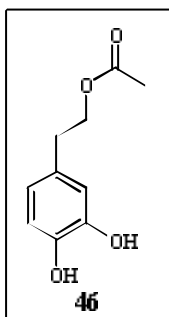
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.05 (3H, s, COCH₃), 2.94 (2H, t, J=7.04, *H*-2'), 4.28 (2H, t, J=7.04, *H*-1'), 6.76-6.87 (2H, m, *H*-4,6), 7.06-7.12 (2H, m, *H*-3,5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 21.0 (COCH₃), 30.0 (*C*-2'), 64.5 (*C*-1'), 115.9 (*C*-3), 120.9 (*C*-5), 123.6 (*C*-1), 128.3 (*C*-4), 130.8 (*C*-6), 154.4 (*C*-2), 171.6 (COCH₃).



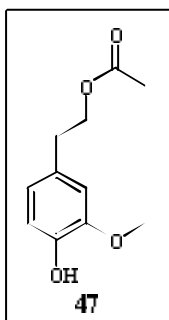
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.03 (3H, s, COCH₃), 2.85 (2H, t, *J*=7.05, *H*-2'), 4.26 (2H, t, *J*=7.05, *H*-1'), 6.68-6.75 (3H, m, *H*-2, 4, 6), 7.13 (1H, m, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 21.0 (COCH₃), 34.8 (C-2'), 64.9 (C-1'), 113.6 (C-2), 115.7 (C-4), 121.1 (C-6), 129.6 (C-5), 139.4 (C-1), 155.9 (C-3), 171.6 (COCH₃).



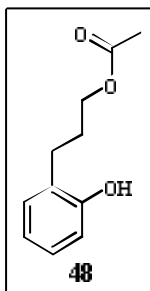
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.93 (3H, s, COCH₃), 2.68 (2H, t, *J*=7.1, *H*-2'), 4.10 (2H, t, *J*=7.0, *H*-1'), 6.46 (1H, dd, *J*_m=2.0, *J*_o=8.0, *H*-6), 6.59 (1H, d, *J*=1.9, *H*-2), 6.65 (1H, d, *J*=8.0, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.7 (COCH₃), 34.2 (C-2'), 65.4 (C-1'), 115.1 (C-2), 115.7 (C-5), 120.4 (C-6), 129.6 (C-1), 143.0 (C-4), 144.2 (C-3), 171.8 (COCH₃).



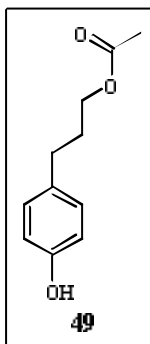
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.02 (3H, s, COCH₃), 2.83 (2H, t, *J*=7.16, *H*-2'), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.22 (2H, t, *J*=7.16, *H*-1'), 6.66-6.69 (2H, m, *H*-2, 6), 6.85 (1H, d, *J*=8.5, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.9 (COCH₃), 34.7 (C-2'), 55.8 (OCH₃), 65.2 (C-1'), 111.4 (C-2), 114.4 (C-5), 121.6 (C-6), 129.6 (C-1), 144.3 (C-4), 146.5 (C-3), 171.1 (COCH₃).



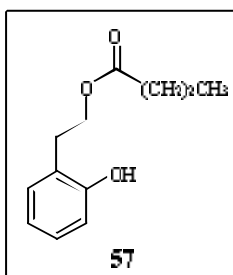
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.91-2.05 (2H, m, *H*-2'), 2.07 (3H, s, COCH₃), 2.71 (2H, t, *J*=6.57, *H*-3'), 4.13 (2H, t, *J*=6.57, *H*-1'), 6.75-6.88 (2H, m, *H*-3, 5), 7.02-7.11 (2H, m, *H*-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 21.0 (COCH₃), 26.5 (*C*-3'), 28.6 (*C*-2'), 64.6 (*C*-1'), 115.3 (*C*-3), 120.5 (*C*-5), 127.3 (*C*-4), 127.5 (*C*-1), 130.3 (*C*-6), 154.1 (*C*-2), 172.2 (COCH₃).



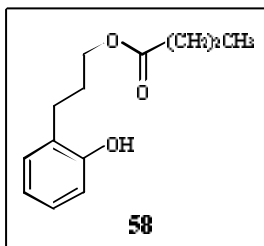
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.89 (2H, m, *H*-2'), 2.05 (3H, s, COCH₃), 2.59 (2H, t, *J*= 7.2, *H*-3'), 4.07 (2H, t, *J*= 6.6, *H*-3'), 6.75 (2H, d, *J*=8.6, *H*-3, 5), 7.0 (2H, d, *J*=8.6, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 21.0 (COCH₃), 30.3 (*C*-2'), 31.2 (*C*-3'), 64.2 (*C*-1'), 115.3 (*C*-3), 115.3 (*C*-5), 129.4 (*C*-2), 129.4 (*C*-6), 129.6 (*C*-1), 152.8 (*C*-4), 174.2 (COCH₂).



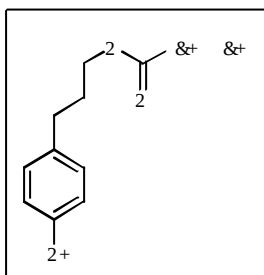
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.93 (3H, t, *J*=7.31, CH₃), 1.56-1.74 (2H, m, CH₂CH₃), 2.31 (2H, t, *J*=7.32, COCH₂), 2.98 (2H, t, *J*=7.02, *H*-2'), 4.34 (2H, t, *J*=7.02, *H*-1'), 6.81-6.88 (2H, m, *H*-3, 5), 7.07-7.14 (2H, m, *H*-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.6 (CH₃), 18.4 (CH₂CH₃), 30.0 (*C*-2'), 36.3 (COCH₂), 64.3 (*C*-1'), 115.7 (*C*-3), 120.4 (*C*-5), 123.9 (*C*-1), 128.1 (*C*-4), 131.0 (*C*-6), 154.6 (*C*-2), 174.8 (COCH₂).



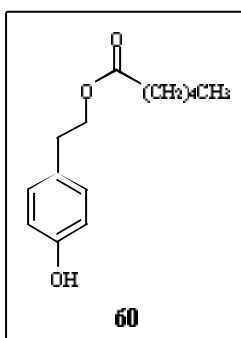
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.95 (3H, t, *J*=7.34, CH₃), 1.58-1.76 (2H, m, *H*-2'), 1.90-2.07 (2H, m, CH₂CH₃), 2.32 (2H, t, *J*=7.38, COCH₂), 2.71 (2H, t, *J*=7.17, *H*-3'), 4.14 (2H, t, *J*=7.17, *H*-1'), 6.76-6.87 (2H, m, *H*-3, 5), 7.03-7.11 (2H, m, *H*-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.7 (CH₃), 18.5 (CH₂CH₃), 26.5 (C-3'), 28.7 (C-2'), 36.4 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.4 (C-3), 120.5 (C-5), 127.3 (C-4), 127.5 (C-1), 130.3 (C-6), 154.1 (C-2), 174.7 (COCH₂).



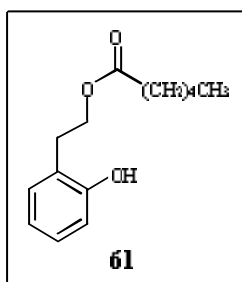
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.94 (3H, t, *J*=7.28, CH₃), 1.56-1.75 (2H, m, CH₂CH₃), 1.83-1.97 (2H, m, *H*-2'), 2.30 (2H, t, *J*=7.32, COCH₂), 2.59 (2H, t, *J*=7.17, *H*-3'), 4.08 (2H, t, *J*=7.17, *H*-1'), 6.77 (2H, d, *J*=8.6, *H*-3, 5), 7.00 (2H, d, *J*=8.6, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.7 (CH₃), 18.5 (CH₂CH₃), 30.4 (C-2'), 31.2 (C-3'), 36.3 (COCH₂), 64.0 (C-1'), 115.4 (C-3), 115.4 (C-5), 129.4 (C-2), 129.4 (C-6), 132.8 (C-1), 154.3 (C-4), 174.7 (COCH₂).



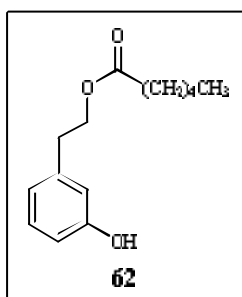
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.85 (3H, m, CH₃), 1.26 (4H, m, 2xCH₂), 1.58 (2H, m, CH₂), 2.24 (2H, t, *J*=7.68, COCH₂), 2.83 (2H, t, *J*=7.06, *H*-2'), 4.23 (2H, t, *J*=7.07, *H*-1'), 6.76 (2H, d, *J*=8.40, *H*-3, 5), 7.06 (2H, d, *J*=8.40, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.9 (CH₃), 22.3 (CH₂), 24.6 (CH₂), 31.2 (C-2'), 34.2 (CH₂), 34.3 (COCH₂), 65.2 (C-1'), 115.4 (C-3), 115.4 (C-5), 129.6 (C-1), 130 (C-2), 130 (C-6), 154.5 (C-4), 174.5 (COCH₂).



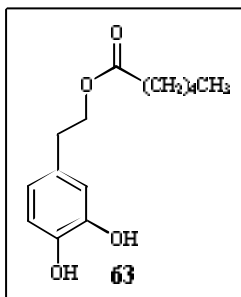
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.28 (4H, m, 2xCH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 2.29 (2H, t, J=7.30, COCH₂), 2.94 (2H, t, J=7.03, H-2'), 4.27 (2H, t, J=7.04, H-1'), 6.83 (2H, m, H-3, 5), 7.11 (2H, m, H-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.8 (CH₃), 22.2 (CH₂), 24.5 (CH₂), 30.1 (C-2'), 31.2 (CH₂), 34.3 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.8 (C-3), 120.5 (C-5), 123.7 (C-1), 128.2 (C-4), 130.8 (C-6), 154.4 (C-2), 174.5 (COCH₂).



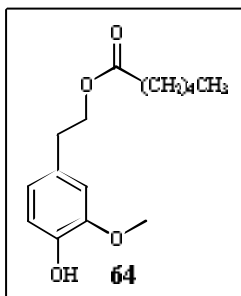
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.85 (3H, m, CH₃), 1.25 (4H, m, 2xCH₂), 1.58 (2H, m, CH₂), 2.27 (2H, t, J=7.71, COCH₂), 2.83 (2H, t, J=7.04, H-2'), 4.27 (2H, t, J=7.04, H-1'), 6.72 (3H, m, H-2, 4, 6), 7.13 (1H, m, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.8 (CH₃), 22.2 (CH₂), 24.5 (CH₂), 31.2 (C-2'), 34.3 (CH₂), 34.9 (COCH₂), 64.7 (C-1'), 113.5 (C-2), 115.8 (C-4), 121.0 (C-6), 129.6 (C-5), 139.5 (C-1), 155.9 (C-4), 174.4 (COCH₂).



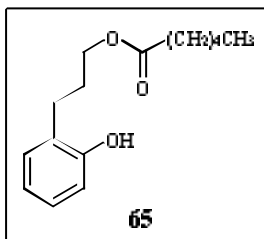
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.85 (3H, m, CH₃), 1.23 (4H, m, 2xCH₂), 1.57 (2H, m, CH₂), 2.26 (2H, t, J=7.6, COCH₂), 2.78 (2H, t, J=7.1 Hz, *H*-2'), 4.18 (2H, t, J=7.1, *H*-1'), 6.58 (1H, dd, J_o=8.0, J_m=1.9, *H*-6), 6.70 (2H, d, J=1.9, *H*-2), 6.76 (2H, d, J=8.0, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.8 (CH₃), 22.3 (CH₂), 24.6 (CH₂), 31.2 (*C*-2'), 34.4 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 65.2 (*C*-1'), 115.3 (*C*-2), 115.8 (*C*-5), 121.2 (*C*-6), 130.3 (*C*-1), 142.5 (*C*-4), 143.8 (*C*-3), 174.9 (COCH₂).



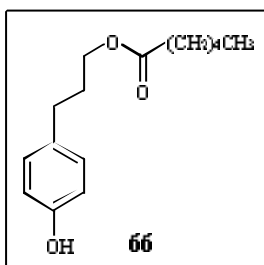
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.83 (3H, m, CH₃), 1.25 (4H, m, 2xCH₂), 1.57 (2H, m, CH₂), 2.25 (2H, t, J=7.7, COCH₂), 2.82 (2H, t, J=7.1, *H*-2'), 3.81 (3H, s, OCH₃), 4.22 (2H, t, J=7.1, *H*-1'), 6.66-6.69 (2H, m, *H*-2, 6), 6.82 (d, 1H, J=8.5, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.9 (CH₃), 22.3 (CH₂), 24.6 (CH₂), 31.2 (*C*-2'), 34.3 (CH₂), 34.8 (COCH₂), 56.0 (OCH₃), 65.0 (*C*-1'), 111.4 (*C*-2), 114.4 (*C*-5), 121.6 (*C*-6), 129.6 (*C*-1), 144.3 (*C*-4), 146.5 (*C*-3), 173.8 (COCH₂).



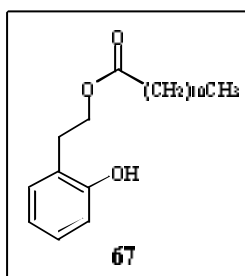
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.91 (3H, t, J=6.62, CH₃), 1.31 (4H, m, 2xCH₂), 1.65 (2H, m, CH₂), 1.98 (2H, m, H-2'), 2.34 (2H, t, J=7.31, COCH₂), 2.72 (2H, t, J=7.05, H-3'), 4.15 (2H, t, J=6.55, H-1'), 6.84 (2H, m, H-3,5), 7.07 (2H, m, H-4,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.9 (CH₃), 22.3 (CH₂), 24.7 (CH₂), 26.5 (C-3'), 28.7 (C-2'), 31.3 (CH₂), 34.5 (COCH₂), 64.4 (C-1'), 115.4 (C-3), 120.4 (C-5), 127.3 (C-4), 127.5 (C-1), 130.3 (C-6), 154.1 (C-2), 175.0 (COCH₂).



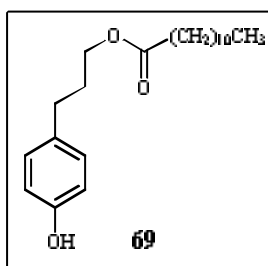
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.84-0.90 (3H, m, CH₃), 1.25-1.32 (4H, m, 2xCH₂), 1.59-1.67 (2H, m, CH₂), 1.83-1.95 (2H, m, H-2'), 2.3 (2H, t, J= 7.3, COCH₂), 2.59 (2H, t, J=7.2, H-3'), 4.07 (t, 2H, J=6.6, H-3'), 6.74 (2H, d, J=8.6, H-3, 5), 7.00 (2H, d, J=8.6, H-2,).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 13.9 (CH₃), 22.3 (CH₂), 24.7 (CH₂), 30.4 (C-2'), 31.2 (CH₂), 31.3 (C-3'), 34.4 (CH₂), 63.8 (C-1'), 115.3 (C-3), 115.3 (C-3), 115.3 (C-5), 129.4 (C-2), 129.4 (C-2), 133.0 (C-1), 154.0 (C-4), 174.5 (COCH₂).



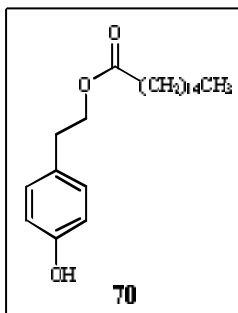
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.88 (3H, t, *J*=6.16, CH₃), 1.26 (16H, m, 8xCH₂), 1.61 (2H, m, CH₂), 2.31 (2H, t, *J*=7.24, COCH₂), 2.95 (2H, t, *J*=6.98, *H*-2'), 4.30 (2H, t, *J*=6.98, *H*-1'), 6.84 (2H, m, *H*-3,5), 7.12 (2H, m, *H*-2,4).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.1 (C-2'), 31.9 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.8 (C-3), 120.5 (C-5), 123.8 (C-1), 128.1 (C-4), 130.9 (C-6), 154.5 (C-2), 174.7 (COCH₂).



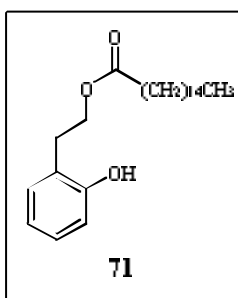
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.87 (3H, t, *J*=6.14, CH₃), 1.25 (16H, m, 8xCH₂), 1.61 (2H, m, CH₂), 1.89 (2H, m, *H*-2'), 2.31 (2H, t, *J*=7.23, *H*-3'), 2.59 (2H, t, *J*=7.12, COCH₂), 4.08 (2H, t, *J*=6.56, *H*-1'), 6.75 (2H, d, *J*=8.60, *H*-3,5), 7.00 (2H, d, *J*=8.60, *H*-2,4).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.4 (C-2'), 31.2 (CH₂), 31.9 (C-3'), 34.5 (COCH₂), 63.9 (C-1'), 115.3 (C-3), 115.3 (C-5), 129.4 (C-2), 129.4 (C-4), 132.9 (C-1), 154.2 (C-4), 174.7 (COCH₂).



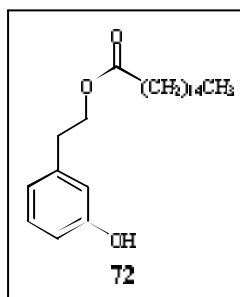
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.26 (24H, m, 12xCH₂), 1.55 (2H, m, CH₂), 2.28 (2H, t, J=7.33, COCH₂), 2.84 (2H, t, J=7.10, *H*-2'), 4.23 (2H, t, J=7.11, *H*-1'), 6.75 (2H, d, J=8.51, *H*-3, 5), 7.03 (2H, d, J=8.51, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 34.2 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 65.3 (C-1'), 115.4 (C-3), 115.4 (C-5), 129.5 (C-1), 130.0 (C-2), 130.0 (C-6), 154.6 (C-4), 174.6 (COCH₂).



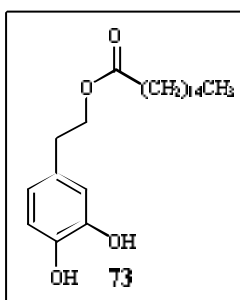
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.87 (3H, m, CH₃), 1.22 (24H, m, 12xCH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 2.30 (2H, t, J=7.65, COCH₃), 2.94 (2H, t, J=7.03, *H*-2'), 4.28 (2H, t, J=7.02, *H*-1'), 6.83 (2H, m, *H*-3, 5), 7.09 (2H, m, *H*-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.2 (CH₂), 31.9 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 64.3 (C-1'), 115.8 (C-3), 120.5 (C-5), 123.7 (C-1), 128.2 (C-4), 130.9 (C-6), 154.5 (C-2), 174.5 (COCH₂).



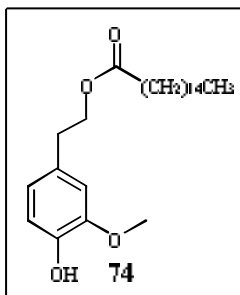
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.26 (24H, m, 12x CH₂), 1.53 (2H, m, CH₂), 2.27 (2H, t, J=7.28, COCH₂), 2.86 (2H, t, J=7.06, CH₂O), 4.26 (2H, t, J=7.06, H-2'), 6.70 (3H, m, H-2, 4, 6), 7.13 (1H, m, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 34.9 (C-2'), 64.7 (C-1'), 113.5 (C-2), 115.7 (C-4), 121.1 (C-6), 129.6 (C-5), 139.5 (C-1), 155.9 (C-4), 174.3 (COCH₂).



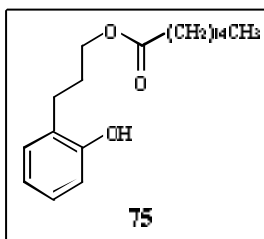
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.85 (3H, m, CH₃), 1.12-1.22 (24H, m, 12xCH₂), 1.56 (2H, m, CH₂), 2.26 (2H, t, J=7.35, COCH₂), 2.77 (2H, t, J=7.16, H-2'), 4.16 (2H, t, J=7.15, H-1'), 6.55 (1H, dd, J_m=1.99, J_o=8.1, H-6), 6.69 (1H, d, J=1.97, H-2), 6.73 (1H, d, J=8.2, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.9 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 65.2 (C-1'), 115.2 (C-2), 115.8 (C-5), 121.1 (C-6), 130.2 (C-1), 142.4 (C-4), 143.8 (C-3), 174.7 (COCH₂).



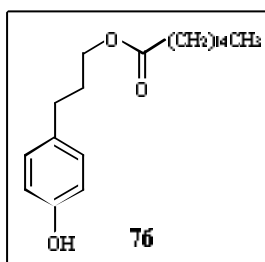
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.18-1.26 (24H, m, 12xCH₂), 1.59 (2H, m, CH₂), 2.26 (2H, t, J=7.60, COCH₂), 2.83 (2H, t, J=7.14, H-2'), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.22 (2H, t, J=7.15, H-1'), 6.66-6.69 (2H, m, H-2, 6), 6.85 (d, 1H, J=8.61, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.9 (CH₂), 34.2 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 56.0 (OCH₃), 65.2 (C-1'), 111.4 (C-2), 115.4 (C-5), 129.4 (C-6), 129.9 (C-1), 144.3 (C-4), 146.5 (C-3), 174.5 (COCH₂).



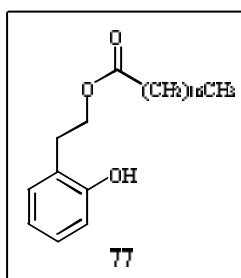
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.88 (3H, t, J=6.17, CH₃), 1.25 (24H, m, 12xCH₂), 1.62 (2H, m, CH₂), 1.96 (2H, m, H-2'), 2.31 (2H, t, J=7.30, COCH₂), 2.69 (2H, t, J=7.07, H-3'), 4.11 (2H, t, J=6.52, H-1'), 6.74-6.86 (2H, m, H-3,5), 7.01-7.24 (2H, m, H-4,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.0 (CH₂), 25.0 (C-3'), 26.4 (CH₂), 28.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.3 (C-2'), 34.4 (COCH₂), 64.1 (C-1'), 115.3 (C-3), 120.5 (C-5), 127.3 (C-4), 127.4 (C-1), 130.3 (C-6), 154.0 (C-2), 174.5 (COCH₂).



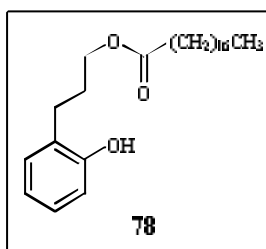
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.28 (14H, m, 7xCH₂), 1.64 (2H, m, CH₂), 1.89 (2H, m, H-2'), 2.30 (2H, t, J=7.3, COCH₂), 2.59 (2H, t, J=7.2, H-3'), 4.06 (2H, t, J=6.6, H-1'), 6.74 (2H, d, J= 8.6, H-3, 5), 7 (2H, d, J=8.6, H-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.0 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.4 (C-2'), 31.2 (CH₂), 31.9 (C-3'), 34.4 (COCH₂), 63.7 (C-1'), 115.3 (C-3), 115.3 (C-5), 129.4 (C-2), 129.4 (C-6), 133.1 (C-1), 154.0 (C-4), 174.4 (COCH₂).



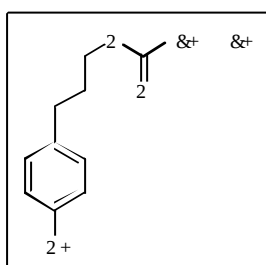
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.87 (3H, t, J=6.19, CH₃), 1.24 (28H, m, 14xCH₂), 1.56 (2H, t, J=7.37, CH₂), 2.31 (2H, t, J=7.24, COCH₂), 2.94 (2H, t, J=7.02, H-2'), 4.27 (2H, t, J=7.02, H-1'), 6.79-6.87 (2H, m, H-3,5), 7.07-7.15 (2H, m, H-4,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.2 (C-2'), 31.9 (CH₂), 34.3 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.9 (C-3), 120.6 (C-5), 123.7 (C-1), 128.2 (C-4), 130.9 (C-6), 154.5 (C-2), 177.2 (COCH₂).



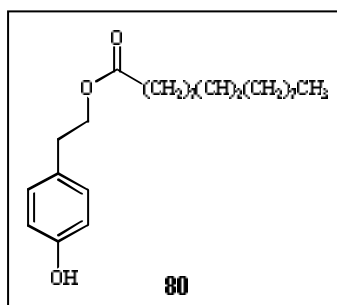
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.87 (3H, t, J=6.14, CH₃), 1.25 (28H, m, 14xCH₂), 1.62 (2H, t, J=6.90, CH₂), 1.88-2.03 (2H, m, H-2'), 2.31 (2H, t, J=7.32, COCH₂), 2.69 (2H, t, J=7.06, H-3'), 4.11 (2H, t, J=6.54, H-1'), 6.74-6.85 (2H, m, H-3,5), 7.00-7.09 (2H, m, H-4,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.0 (CH₂), 26.5 (C-3'), 28.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.2 (C-2'), 34.2 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.3 (C-3), 120.4 (C-5), 127.3 (C-4), 127.4 (C-1), 130.2 (C-6), 154.1 (C-2), 174.5 (COCH₂).



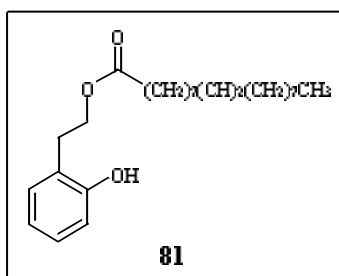
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.87 (3H, t, J=6.15, CH₃), 1.24 (28H, m, 14xCH₂), 1.61 (2H, t, J=7.33, CH₂), 1.86-1.96 (2H, m, H-2'), 2.30 (2H, t, J=7.32, COCH₂), 2.69 (2H, t, J=7.29, H-3'), 4.07 (2H, t, J=6.57, H-1'), 6.75 (2H, d, J=8.51, H-4,6), 6.99 (2H, d, J=8.51, H-2,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.0 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.4 (C-2'), 31.2 (CH₂), 31.9 (C-3'), 34.2 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.3 (C-3), 115.3 (C-5), 129.4 (C-2), 129.4 (C-6), 133.0 (C-1), 154.1 (C-4), 174.5 (COCH₂).



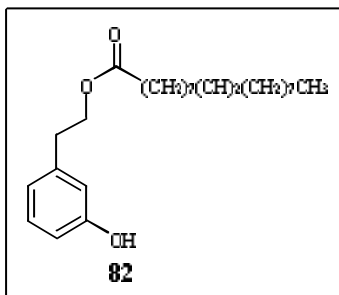
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.23-1.31 (20H, m, 10xCH₂), 1.58 (2H, m, CH₂), 2.01 (4H, m, 2xCH₂) 2.27 (2H, t, J=7.33, CH₂O), 2.83 (2H, t, J=7.13, *H*-2'), 4.23 (2H, t, J=7.12, *H*-1'), 5.33 (2H, m, CH-CH), 6.75 (2H, d, J=8.52, *H*-3, 5), 7.03 (2H, d, J=8.52, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.0 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.90 (CH₂), 34.2 (COCH₂), 34.3 (*C*-2'), 65.1 (*C*-1'), 115.3 (*C*-3), 115.3 (*C*-5), 129.5 (*C*-2), 129.5 (*C*-6), 129.7 (CH-CH), 129.9 (CH-CH), 130.0 (*C*-1), 154.5 (*C*-4), 174.4 (COCH₂).



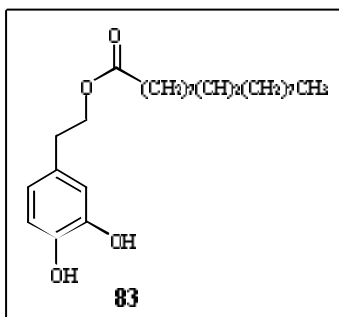
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.23 (20H, m, 10xCH₂), 1.59 (2H, m, CH₂), 1.98 (4H, m, 2xCH₂) 2.30 (2H, t, J=7.34, COCH₂), 2.93 (2H, t, J=7.00, *H*-2'), 4.27 (2H, t, J=7.00, *H*-1'), 5.32 (2H, m, CH-CH), 6.83 (2H, m, *H*-3, 5), 7.10 (2H, m, *H*-4, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 24.8 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.8 (CH₂), 30.2 (*C*-2'), 31.9 (CH₂), 34.3 (COCH₂), 64.3 (*C*-1'), 115.9 (*C*-3), 120.5 (*C*-5), 123.6 (*C*-1), 128.2 (*C*-4), 129.7 (CH-CH), 130.0 (CH-CH), 130.8 (*C*-1), 154.4 (*C*-4), 174.4 (COCH₂).



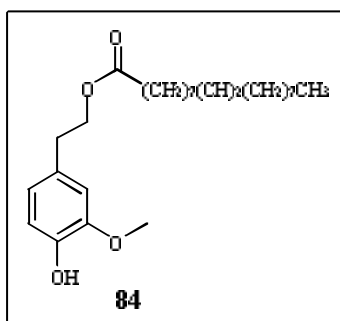
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.88 (3H, m, CH₃), 1.30 (14H, m, 7x CH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 2.03 (4H, m, 2x CH₂), 2.31 (2H, t, J=7.60, CH₂), 2.76 (2H, m, COCH₂), 2.95 (2H, t, J=7.02, CH₂O), 4.29 (2H, t, J=7.03, H-2'), 5.34 (2H, m, CH-CH), 6.83 (2H, m, H-2,4), 7.11 (2H, m, H-5, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.1 (CH₂), 31.5 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 64.3 (C-1'), 115.8 (C-2), 115.8 (C-4), 120.5 (C-6), 123.7 (C-5), 129.2 (CH-CH), 130.0 (CH-CH), 130.9 (C-1), 154.5 (C-3), 174.6 (COCH₂).



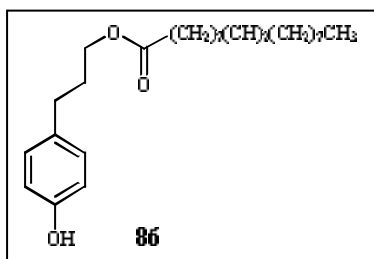
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.15-1.25 (20H, m, 10xCH₂), 1.57 (2H, m, CH₂), 2.00 (4H, m, 2xCH₂), 2.24 (2H, t, J=7.63, COCH₂), 2.77 (2H, t, J=7.15, H-2'), 4.22 (2H, t, J=7.15, H-1'), 5.33 (2H, m, CH-CH), 6.56 (1H, dd, J_m=2.03, J_o=8.04, H-6), 6.69 (1H, d, J=2.02, H-2), 6.75 (1H, d, J=8.04, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.0 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 65.2 (C-1'), 115.3 (C-2), 115.8 (C-5), 121.1 (C-6), 129.7 (CH-CH), 130.0 (CH-CH), 130.2 (C-1), 142.4 (C-4), 143.7 (C-3), 174.4 (COCH₂).



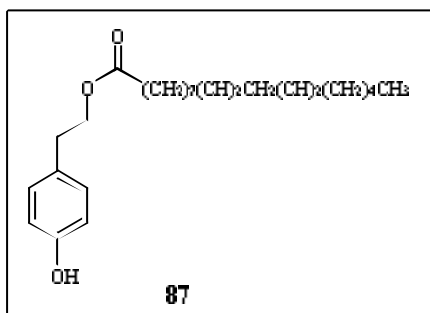
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.20 (20H, m, 10xCH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 1.97 (4H, m, 2xCH₂), 2.26 (2H, t, J=7.63, COCH₂), 2.83 (2H, t, J=7.13, *H*-2'), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.23 (2H, t, J=7.13, *H*-1'), 5.33 (2H, m, CH-CH), 6.67-6.70 (2H, m, *H*-2, 6), 6.82 (1H, d, J=8.57, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.0 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 34.3 (COCH₂), 34.8 (C-2'), 55.8 (OCH₃), 64.9 (C-1'), 111.3 (C-2), 114.3 (C-5), 121.6 (C-6), 129.6 (C-1), 129.7 (CH-CH), 130.0 (CH-CH), 144.3 (C-4), 146.4 (C-3), 173.8 (COCH₃).



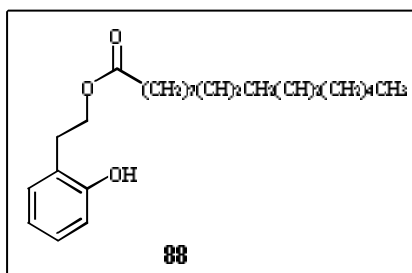
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.87 (3H, m, CH₃), 1.28 (20H, m, 10xCH₂), 1.62 (2H, m, CH₂), 1.94 (6H, m, 3x CH₂), 2.31 (2H, t, J=7.3, COCH₂), 2.59 (2H, t, J=7.3, *H*-2'), 4.08 (2H, t, J=6.6, *H*-1'), 5.34 (2H, m, CH-CH), 6.76 (2H, d, J= 8.6, *H*-3, 5), 7.13 (2H, d, J= 8.6, *H*-2, 6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.8 (CH₂), 30.4 (C-2'), 31.2 (CH₂), 31.9 (C-3'), 34.4 (COCH₂), 63.9 (C-1'), 115.3 (C-3), 115.3 (C-5), 129.4 (C-2), 129.4 (C-6), 129.7 (CH-CH), 130.0 (CH-CH), 132.8 (C-1), 154.2 (C-4), 174.7 (COCH₂).



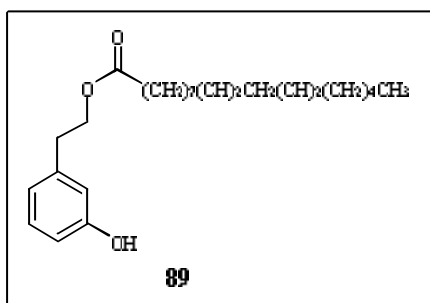
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.88 (3H, m, CH₃), 1.28-1.38 (14H, m, 7xCH₂), 1.58 (2H, m, CH₂), 2.03 (4H, m, CH₂) 2.29 (2H, t, J=7.35, COCH₂), 2.73-2.87 (4H, m, 2xCH₂), 4.24 (2H, t, J=7.14, H-1'), 5.28-5.39 (4H, m, 2x(CH-CH)), 6.76 (2H, d, J=8.48, H-3,5), 7.03 (2H, d, J=8.48, H-2,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.0 (CH₃), 22.5 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.5 (CH₂), 34.2 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 65.3 (C-2'), 115.4 (C-3), 115.4 (C-5), 128.0 (CH-CH), 129.3 (CH-CH), 129.9 (CH-CH), 130.0 (CH-CH), 130.2 (C-2), 130.2 (C-6), 130.2 (C-1), 154.6 (C-4), 174.6 (COCH₂).



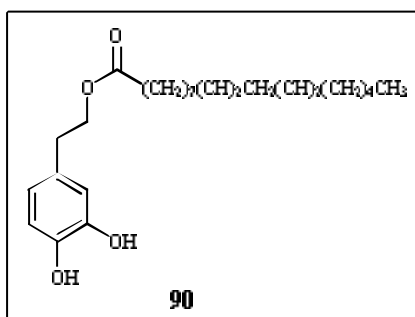
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.88 (3H, m, CH₃), 1.25-1.34 (14H, m, 7xCH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 2.03 (4H, m, 2xCH₂) 2.31 (2H, t, J=7.60, COCH₂), 2.76 (2H, m, CH₂), 2.95 (2H, t, J=7.02, H-2'), 4.29 (2H, t, J=7.03, H-1'), 5.29-5.39 (4H, m, 2x(CH-CH)), 6.79-6.87 (2H, m, H-3,5), 7.07-7.15 (2H, m, H-4,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.0 (CH₃), 22.5 (CH₂), 24.8 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.1 (CH₂), 31.5 (C-2'), 34.4 (COCH₂), 64.3 (C-1'), 115.8 (C-3), 120.4 (C-5), 123.7 (C-1), 127.9 (CH-CH), 128.0 (CH-CH), 128.1 (C-6), 130.0 (CH-CH), 130.2 (CH-CH), 130.9 (C-6), 154.5 (C-4), 174.5 (COCH₂).



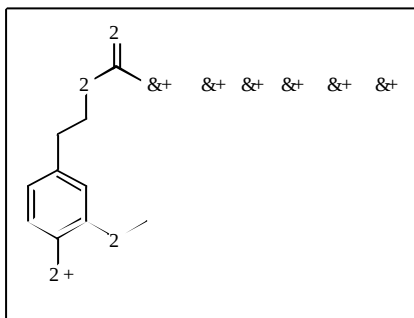
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.88 (3H, m, CH₃), 1.25 (14H, m, 7xCH₂), 1.58 (2H, m, CH₂), 2.02 (4H, m, 2xCH₂) 2.25 (2H, t, J=7.65, COCH₂), 2.61 (4H, m, 2xCH₂), 4.27 (2H, t, J=7.12, H-1'), 5.33 (4H, m, 2x(CH-CH)), 6.73 (3H, m, H-2,4,6), 7.13 (1H, m, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.5 (CH₂), 34.4 (COCH₂), 34.9 (C-2'), 64.9 (C-1'), 113.6 (C-2), 115.8 (C-4), 121.0 (C-6), 127.9 (CH-CH), 128.1 (CH-CH), 129.6 (C-5), 130.0 (CH-CH), 130.2 (CH-CH), 139.4 (C-1), 156.1 (C-3), 174.6 (COCH₂).



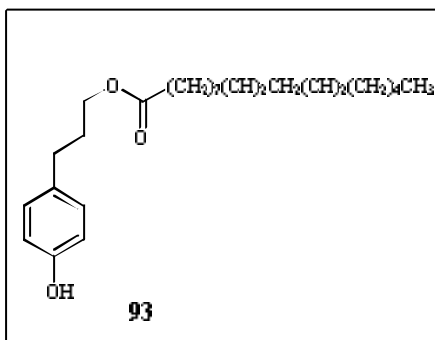
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 0.86 (3H, m, CH₃), 1.26-1.33 (14H, m, 7xCH₂), 1.60 (2H, m, CH₂), 2.00 (4H, m, 2xCH₂), 2.27 (2H, t, J=7.35, COCH₂), 2.72-2.82 (4H, m, 2xCH₂), 4.17 (2H, t, J=7.13, H-1'), 5.24-5.45 (4H, m, 2x(CH-CH)), 6.59 (1H, dd, J_m=1.90, J_o=8.04, H-6), 6.71 (1H, d, J=2.02, H-1), 6.76 (1H, d, J=8.04, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 14.0 (CH₃), 22.5 (CH₂), 24.7 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.1 (CH₂), 28.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.5 (CH₂), 31.5 (CH₂), 31.6 (COCH₂), 34.4 (C-2'), 65.1 (C-1'), 115.3 (C-2), 115.8 (C-5), 121.2 (C-6), 127.9 (CH-CH), 128.0 (CH-CH), 130.0 (C-1), 130.2 (CH-CH), 130.4 (CH-CH), 142.3 (C-4), 143.7 (C-3), 174.5 (COCH₂).



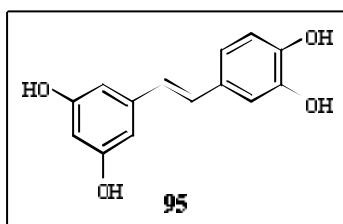
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 0.87 (3H, m, CH₃), 1.27-1.37 (14H, m, 7xCH₂), 1.58 (2H, m, CH₂), 2.01 (4H, m, 2xCH₂), 2.27 (2H, t, J=7.61, COCH₂), 2.73-2.87 (4H, m, 2xCH₂), 3.84 (3H, s, OCH₃), 4.23 (2H, t, J=7.12, H-1'), 5.24-5.38 (4H, m, 2x(CH-CH)), 6.65-6.70 (2H, m, H-2,6), 6.81 (1H, d, J=8.60, H-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 14.0 (CH₃), 22.5 (CH₂), 24.9 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 31.1 (CH₂), 34.3 (COCH₂), 34.8 (C-2'), 55.8 (OCH₃), 64.9 (C-1'), 111.3 (C-2), 114.3 (C-5), 121.6 (C-6), 127.9 (CH-CH), 128.0 (CH-CH), 129.5 (C-1), 130.0 (CH-CH), 130.1 (CH-CH), 144.3 (C-4), 146.4 (C-3), 173.7 (COCH₂).



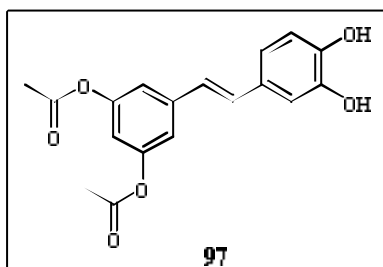
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 0.87 (3H, m, CH₃), 1.28 (14H, m, 7xCH₂), 1.65 (2H, m, CH₂), 1.94 (6H, m, 3xCH₂), 2.30 (2H, t, J=7.3, COCH₂), 2.63 (2H, t, J=7.3, H-2'), 2.75 (2H, m, CH₂), 4.07 (2H, t, J=6.6, H-1'), 6.74 (2H, d, J= 8.6, H-3,5), 7.08 (2H, d, J= 8.6, H-2,6).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 25.0 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.4 (C-2'), 31.2 (CH₂), 31.5 (C-3'), 34.4 (COCH₂), 63.8 (C-1'), 115.3 (C-3), 115.3 (C-5), 127.9 (CH-CH), 128.1 (CH-CH), 129.4 (C-2), 129.4 (C-6), 130.0 (CH-CH), 130.2 (CH-CH), 133.0 (C-1), 154.1 (C-4), 174.4 (COCH₂).



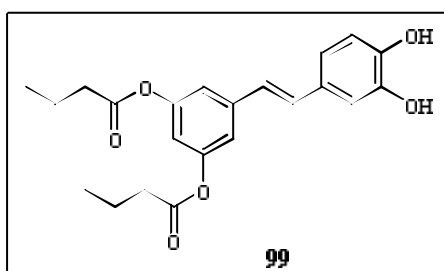
¹H-NMR (200 MHz, CD₃COCD₃, *d* ppm): 6.01 (1H, dd, *J*_{1m}=2.2, *J*_{2m}=2.2, *H*-4), 6.28 (2H, d, *J*_m=2.2, *H*-2,6), 6.50-6.80 (5H, m, *H*-2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CD₃COCD₃, *d* ppm): 102.5 (C-4), 105.5 (C-2), 105.5 (C-6), 113.7 (C-5'), 116.1 (C-2'), 119.8 (C-6'), 126.7 (CH-CH), 129.2 (CH-CH), 130.5 (C-1'), 140.7 (C-1), 145.9 (C-3'), 146.0 (C-4'), 159.4 (C-3), 159.4 (C-5).



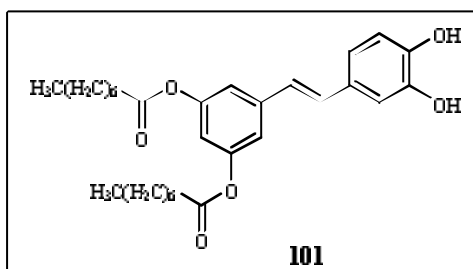
¹H-NMR (200 MHz, CD₃COCD₃, *d* ppm): 2.27 (6H, s, 2xOCOCH₃), 6.80-7.20 (8H, m, CH-CH, *H*-2,4,6,2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃+D₂O, *d* ppm): 21.1 (OCOCH₃), 21.1 (OCOCH₃), 113.1 (C-5'), 113.6 (C-4), 115.3 (C-2'), 116.9 (C-2), 116.9 (C-6), 120.1 (C-6'), 123.9 (CH-CH), 130.3 (CH-CH), 130.3 (C-1'), 140.4 (C-1), 144.2 (C-3'), 144.3 (C-4'), 151.2 (C-3), 151.2 (C-5), 170.0 (OCOCH₃), 170.0 (OCOCH₃).



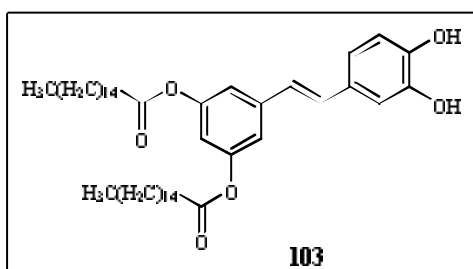
¹H-NMR (200 MHz, CD₃COCD₃, *d* ppm): 1.02 (6H, t, *J*=7.3, 2xCH₃), 1.65-1.83 (4H, m, 2xCH₂CH₃), 2.56 (4H, t, *J*=9.8, OCOCH₂), 6.79-7.20 (8H, m, CH-CH, *H*-2,4,6,2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃+D₂O, *d* ppm): 13.5 (CH₃), 13.5 (CH₃), 18.3 (CH₂CH₃), 18.3 (CH₂CH₃), 36.1 (OCOCH₂), 36.1 (OCOCH₂), 112.8 (C-4), 113.6 (C-5'), 115.1 (C-2'), 116.5 (C-2), 116.5 (C-6), 119.7 (C-6'), 124.8 (CH-CH), 129.4 (C-1'), 130.6 (CH-CH), 140.2 (C-1), 144.9 (C-3'), 144.9 (C-4'), 151.2 (C-3), 151.2 (C-5), 172.1 (OCOCH₃), 172.1 (OCOCH₃).



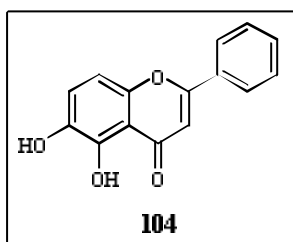
¹H-NMR (200 MHz, CD₃COCD₃, *d* ppm): 0.86 (6H, t, J=6.7, 2xCH₃), 1.28-1.42 (16H, m, 2x((CH₂)₄CH₃)), 1.62-1.76 (4H, m, 2x(OCOCH₂CH₂)), 2.56 (4H, t, J=7.3, 2x(OCOCH₂)), 6.75-7.15 (8H, m, CH-CH, H-2,4,6,2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CD₃COCD₃, *d* ppm): 14.2 (CH₃), 14.2 (CH₃), 23.2 (CH₂CH₃), 23.2 (CH₂CH₃), 25.5 (OCOCH₂CH₂), 25.5 (OCOCH₂CH₂), 29.6 (CH₂CH₂CH₂CH₃), 29.6 (CH₂CH₂CH₂CH₃), 29.7 (OCOCH₂CH₂CH₂), 29.7 (OCOCH₂CH₂CH₂), 32.3 (CH₂CH₂CH₃), 32.3 (CH₂CH₂CH₃), 34.5 (OCOCH₂), 34.5 (OCOCH₂), 114.0 (C-5'), 114.9 (C-4), 116.2 (C-2'), 117.3 (C-2), 117.3 (C-6), 120.3 (C-6'), 124.8 (CH-CH), 130.1 (C-1'), 131.5 (CH-CH), 141.0 (C-1), 146.1 (C-3'), 146.5 (C-4'), 152.6 (C-3), 152.6 (C-5), 172.1 (OCO), 172.1 (OCO).



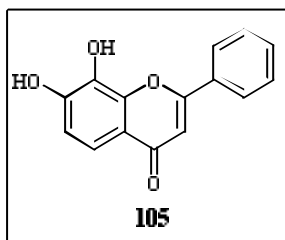
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃+CD₃OD, *d* ppm): 0.83 (6H, t, J=6.2, 2xCH₃), 1.21 (48H, pseudo-s, 2x(CH₂)₁₂CH₃), 1.66-1.73 (4H, m, 2x (OCOCH₂CH₂)), 2.50 (4H, t, J=7.3, 2x(OCOCH₂)), 6.68-7.01 (8H, m, CH-CH, H-2,4,6,2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃+CD₃OD, *d* ppm): 14.0 (CH₃), 14.0 (CH₃), 22.6 (CH₂CH₃), 22.6 (CH₂CH₃), 24.8 (OCOCH₂CH₂), 24.8 (OCOCH₂CH₂), 29.1 (OCOCH₂CH₂CH₂), 29.1 (OCOCH₂CH₂CH₂), 29.2 (CH₂(CH₂)₂CH₃), 29.2 (CH₂(CH₂)₂CH₃), 29.3 (OCO(CH₂)₃CH₂), 29.3 (OCO(CH₂)₃CH₂), 29.4 (OCO(CH₂)₄CH₂), 29.4 (OCO(CH₂)₄CH₂), 29.6 (CH₂(CH₃)₃CH₃), 29.6 (CH₂(CH₃)₃CH₃), 29.6 (OCO(CH₂)₅CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₅CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₆CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₆CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₇CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₇CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₈CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₈CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₉CH₂), 29.6 (OCO(CH₂)₉CH₂), 31.9 (CH₂CH₂CH₃), 4.4 (OCOCH₂), 112.7 (C-5'), 113.7 (C-4), 115.1 (C-2'), 116.5 (C-2), 116.5 (C-6), 119.8 (C-6'), 124.5 (CH-CH), 129.5 (CH-CH), 130.6 (C-1'), 140.1 (C-1), 144.5 (C-3'), 144.8 (C-4'), 151.3 (C-3), 151.3 (C-5), 172.2 (OCO), 172.2 (OCO).



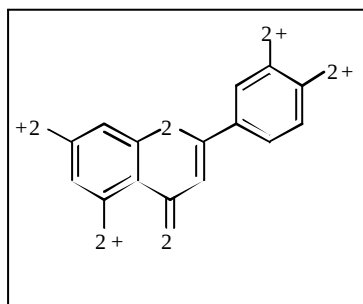
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 6.70 (1H, s, *H*-3), 6.96 (1H, d, *J*=8.9, *H*-8), 7.27 (1H, d, *J*=8.9, *H*-7), 7.45-7.54 (3H, m, *H*-3',4',5'), 7.89 (2H, dd, *J*_o=2.6, *J*_m=7.9, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 105.1 (C-3), 106.8 (C-8), 110.8 (C-10), 121.4 (C-7), 126.4 (C-2'), 126.4 (C-2'), 129.1 (C-6'), 129.1 (C-3'), 129.1 (C-5'), 131.4 (C-1'), 132.0 (C-4'), 140.1 (C-6), 145.4 (C-9), 149.6 (C-5), 165.1 (C-2), 183.7 (C-4).



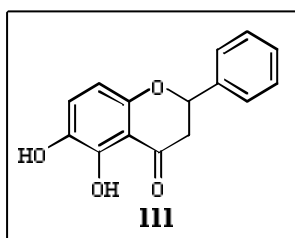
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 6.63 (1H, s, *H*-3), 6.85 (1H, d, *J*=8.8, *H*-6), 7.33-7.41 (3H, m, *H*-3',4',5'), 7.48 (1H, d, *J*=8.7, *H*-5), 7.87-7.91 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 106.1 (C-3), 113.9 (C-6), 116.2 (C-5), 117.2 (C-10), 126.3 (C-2'), 126.3 (C-6'), 128.8 (C-3'), 128.8 (C-5'), 131.4 (C-1'), 132.7 (C-8), 146.7 (C-9), 150.0 (C-7), 163.6 (C-2), 179.3 (C-4).



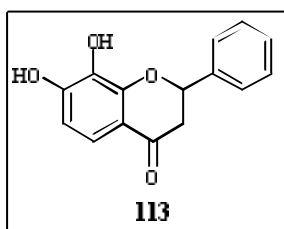
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 6.23 (1H, d, *J*_m=1.6, *H*-6), 6.47 (1H, d, *J*_m=1.6, *H*-8), 6.58 (1H, s, *H*-3), 6.94 (1H, d, *J*_o=8.4, *H*-5'), 7.41-7.44 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 95.2 (C-8), 100.3 (C-6), 103.8 (C-3), 105.1 (C-10), 114.1 (C-2'), 116.8 (C-5'), 120.3 (C-6'), 123.7 (C-1'), 147.1 (C-3'), 151.1 (C-4'), 159.5 (C-5), 163.2 (C-9), 166.3 (C-2), 166.7 (C-7), 183.8 (C-4).



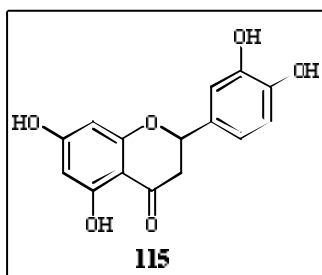
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.86 (1H, dd, *J*₁=3.2, *J*₂=17.3, *H*-3), 3.11 (1H, dd, *J*₁=12.9, *J*₂=17.3, *H*-3), 5.42 (1H, dd, *J*₁=3.1, *J*₂=12.9, *H*-2), 6.44 (1H, d, *J*_o=8.8, *H*-8), 7.08 (1H, d, *J*_o=8.8, *H*-7), 7.36-7.47 (5H, m, *H*-2',3',4',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 44.0 (C-3), 79.3 (C-2), 106.9 (C-8), 108.0 (C-10), 123.5 (C-7), 126.1 (C-2'), 126.1 (C-6'), 128.9 (C-3'), 128.9 (C-5'), 128.9 (C-4'), 138.4 (C-1'), 138.4 (C-6), 147.5 (C-5), 154.2 (C-9), 198.7 (C-4).



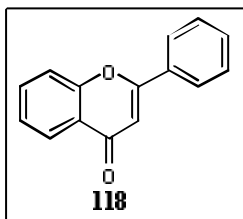
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.73 (1H, dd, *J*₁=3.1, *J*₂=17.0, *H*-3), 3.01 (1H, dd, *J*₁=12.9, *J*₂=17.0), 5.40 (1H, dd, *J*₁=3.1, *J*₂=12.9, *H*-2), 6.53 (1H, d, *J*_o=8.7, *H*-6), 7.30-7.42 (6H, m, *H*-5,2',3',4',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 44.2 (C-3), 80.5 (C-2), 110.1 (C-6), 114.6 (C-10), 118.9 (C-5), 126.3 (C-2'), 126.3 (C-6'), 128.8 (C-3'), 128.8 (C-5'), 128.9 (C-4'), 132.0 (C-8), 138.5 (C-1'), 150.3 (C-9), 151.6 (C-7), 191.4 (C-4).



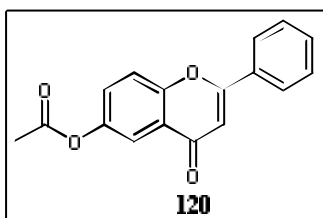
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 2.56 (1H, dd, *J*₁=3.1, *J*₂=17.2, *H*-3), 2.91 (1H, dd, *J*₁=12.8, *J*₂=17.2, *H*-3), 5.10 (1H, dd, *J*₁=3.1, *J*₂=12.8, *H*-2), 5.80 (2H, pseudo-s, *H*-6,8), 6.61-6.78 (3H, m, *H*-2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 42.8 (C-3), 78.9 (C-2), 95.4 (C-8), 96.2 (C-6), 102.2 (C-10), 113.3 (C-2'), 115.1 (C-5'), 118.2 (C-6'), 130.1 (C-1'), 144.7 (C-4'), 145.1 (C-3'), 163.2 (C-5), 164.0 (C-9), 166.7 (C-7), 196.1 (C-4).



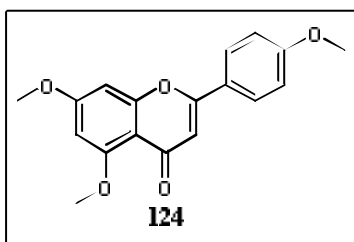
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 6.80 (1H, s, *H*-3), 7.35-7.72 (6H, m, *H*-6,7,8,3',4',5'), 7.87-7.94 (2H, m, *H*-2',6'), 8.21 (1H, dd, *J*_o=1.7, *J*_m=7.9, *H*-5).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 107.6 (C-3), 118.1 (C-8), 124.0 (C-10), 125.2 (C-6), 125.7 (C-5), 126.3 (C-2'), 126.3 (C-6'), 129.0 (C-3'), 129.0 (C-5'), 131.6 (C-4'), 131.8 (C-1'), 133.7 (C-7), 156.3 (C-9), 163.4 (C-2), 178.4 (C-4).



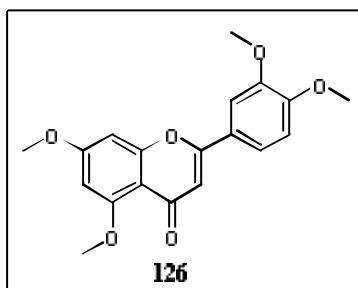
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.33 (3H, s, OCOCH₃), 6.80 (1H, s, *H*-3), 7.40-7.61 (5H, m, *H*-7,8,3',4',5'), 7.88-7.93 (3H, m, *H*-5,2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.9 (OCOCH₃), 107.2 (C-3), 117.8 (C-5), 119.4 (C-8), 124.8 (C-10), 126.3 (C-2'), 126.3 (C-6'), 127.9 (C-7), 129.1 (C-3'), 129.1 (C-5'), 131.7 (C-4'), 131.7 (C-1'), 147.7 (C-9), 153.8 (C-6), 163.6 (C-2), 169.2 (OCOCH₃), 177.6 (C-4).



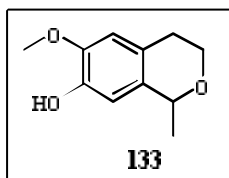
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.93 (3H, s, OCH₃), 6.35 (1H, d, *J*_m=2.3, *H*-6), 6.54 (1H, d, *J*_m=2.3, *H*-8), 6.58 (1H, s, *H*-3), 6.97 (2H, d, *J*_o=9.0, *H*-3',5'), 7.80 (2H, d, *J*_o=9.0, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.5 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 92.8 (C-8), 96.1 (C-6), 107.7 (C-3), 107.7 (C-10), 114.4 (C-3'), 114.4 (C-5'), 123.9 (C-1'), 127.6 (C-2'), 127.6 (C-6'), 159.9 (C-5), 160.7 (C-9), 160.9 (C-2), 162.1 (C-4'), 163.9 (C-7), 177.7 (C-4).



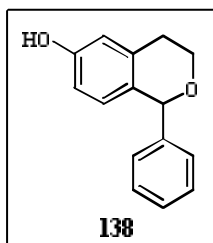
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.78 (6H, s, 2xOCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.86 (3H, s, OCH₃), 6.25 (1H, d, J_m=2.3, *H*-6), 6.45 (1H, s, *H*-3), 6.46 (1H, d, J_m=2.3, *H*-8), 6.84 (1H, d, J_o=8.6, *H*-5'), 7.21 (1H, d, J_m=2.1, *H*-2'), 7.39 (1H, dd, J_o=8.5, J_m=2.1, *H*-6a,7a').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.7 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 92.8 (C-6), 96.1 (C-8), 107.1 (C-3), 108.7 (C-2'), 108.7 (C-10), 111.1 (C-5'), 119.7 (C-6'), 123.6 (C-1'), 149.1 (C-3'), 151.8 (C-4'), 159.8 (C-9), 160.6 (C-5), 161.4 (C-7), 164.3 (C-2), 178.4 (C-4).



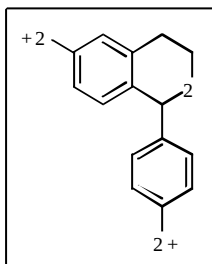
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.46 (3H, d, J=6.45, CH₃), 2.51-2.59 (1H, m, *H*-4), 2.84-3.00 (1H, m, *H*-4), 3.68-3.82 (4H, m, OCH₃, *H*-3), 4.06-4.16 (1H, m, *H*-3), 4.73 (1H, q, J=6.42, *H*-1), 6.55 (1H, s, *H*-5), 6.61 (1H, s, *H*-8).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 21.8 (CH₃), 28.6 (C-4), 55.9 (OCH₃), 63.8 (C-3), 72.0 (C-1), 110.8 (C-5), 110.8 (C-8), 124.7 (C-4a), 132.2 (C-8a), 144.0 (C-7), 145.2 (C-6).



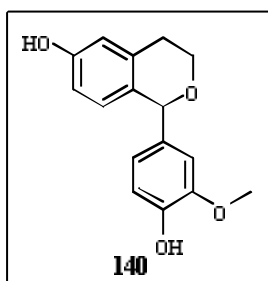
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.75 (1H, m, *H*-4), 3.05 (1H, m, *H*-4), 3.89 (1H, m, *H*-3), 4.15 (1H, m, *H*-3), 5.68 (1H, s, *H*-1), 6.52 (3H, m, *H*-5, 7, 8), 7.28 (5H, m, *H*-2', 3', 4', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.9 (C-4), 63.6 (C-3), 79.5 (C-1), 113.5 (C-7), 114.8 (C-5), 128.1 (C-8), 128.2 (C-2'), 128.2 (C-6'), 128.4 (C-3'), 128.4 (C-5'), 128.9 (C-4'), 135.3 (C-8a), 142.2 (C-4a), 142.2 (C-1'), 154.3 (C-6).



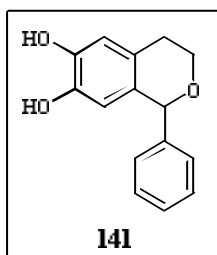
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.63 (1H, m, *H*-4), 3.10 (1H, m, *H*-4), 3.82 (1H, m, *H*-3), 4.03 (1H, m, *H*-3), 5.56 (1H, s, *H*-1), 6.51 (m, 3H, *H*-5, 7, 8), 6.71 (d, 2H, *J*=8.5, *H*-3', 5'), 7.05 (d, 2H, *J*=8.5, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.2 (*C*-4), 62.8 (*C*-3), 78.5 (*C*-1), 112.8 (*C*-7), 114.0 (*C*-5), 114.5 (*C*-8), 127.5 (*C*-8a), 128.2 (*C*-1'), 129.6 (*C*-3'), 129.6 (*C*-5'), 132.9 (*C*-2'), 132.9 (*C*-6'), 134.3 (*C*-4a), 154.1 (*C*-6), 155.6 (*C*-4').



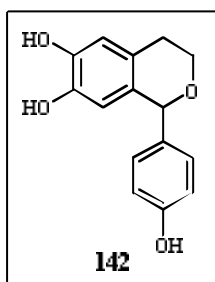
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.64 (1H, m, *H*-4), 3.10 (1H, m, *H*-4), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.82 (1H, m, *H*-3), 4.10 (1H, m, *H*-3), 5.59 (1H, s, *H*-1), 6.57 (3H, m, *H*-5, 7, 8), 6.80 (3H, m, *H*-2', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.9 (*C*-4), 56.9 (OCH₃), 63.6 (*C*-3), 79.5 (*C*-1), 111.1 (*C*-2'), 113.4 (*C*-7), 113.9 (*C*-5'), 114.8 (*C*-5), 122.2 (*C*-6'), 128.2 (*C*-8), 129.5 (*C*-1'), 134.2 (*C*-8a), 135.3 (*C*-4a), 145.6 (*C*-4'), 146.7 (*C*-3'), 154.4 (*C*-6).



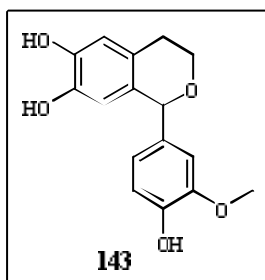
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.57 (1H, m, *H*-4), 2.84 (1H, m, *H*-4), 3.79 (1H, m, *H*-3), 4.04 (1H, m, *H*-3), 5.56 (1H, s, *H*-1), 6.10 (1H, s, *H*-5), 6.50 (1H, s, *H*-8), 7.22 (5H, m, *H*-2', 3', 4', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.0 (*C*-4), 63.7 (*C*-3), 79.3 (*C*-1), 113.5 (*C*-8), 114.9 (*C*-5), 125.7 (*C*-4'), 128.3 (*C*-4a), 128.4 (*C*-2'), 128.4 (*C*-6'), 128.6 (*C*-8a), 129.0 (*C*-3'), 129.0 (*C*-5'), 141.7 (*C*-1'), 142.2 (*C*-6), 143.1 (*C*-7).



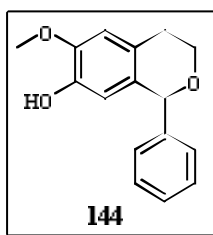
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 2.51 (1H, m, *H*-4), 2.80 (1H, m, *H*-4), 3.39 (1H, m, *H*-3), 3.96 (1H, m, *H*-3), 5.42 (1H, s, *H*-1), 6.06 (1H, s, *H*-5), 6.49 (1H, s, *H*-8), 6.64 (2H, d, *J*=8.3, *H*-3', 5'), 6.98 (2H, d, *J*=8.3, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 28.0 (*C*-4), 63.8 (*C*-3), 79.0 (*C*-1), 113.3 (*C*-8), 114.5 (*C*-5), 115.1 (*C*-3'), 115.1 (*C*-5'), 125.3 (*C*-4a), 128.8 (*C*-8a), 130.1 (*C*-2'), 130.1 (*C*-6'), 133.4 (*C*-1'), 142.5 (*C*-7), 143.3 (*C*-6), 156.5 (*C*-4').



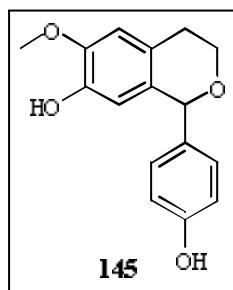
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 2.56 (1H, m, *H*-4), 2.86 (1H, m, *H*-4), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.79 (1H, m, *H*-3), 4.04 (1H, m, *H*-3), 5.45 (1H, s, *H*-1), 6.13 (1H, s, *H*-5), 6.53 (1H, s, *H*-8), 6.71 (3H, m, *H*-2', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 28.0 (*C*-4), 55.8 (OCH₃), 64.0 (*C*-3), 79.3 (*C*-1), 111.3 (*C*-2'), 113.3 (*C*-8), 114.0 (*C*-5), 114.6 (*C*-5'), 122.1 (*C*-6'), 125.5 (*C*-4a), 128.9 (*C*-1'), 134.2 (*C*-8a), 142.4 (*C*-7), 143.3 (*C*-6), 145.5 (*C*-4'), 146.8 (*C*-3').



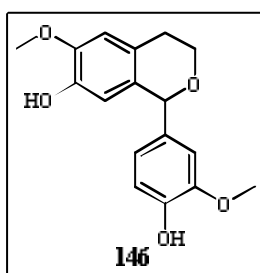
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.71 (1H, m, *H*-4), 3.12 (1H, m, *H*-4), 3.82 (4H, m, *H*-3, OCH₃), 3.91 (1H, m, *H*-3), 5.55 (1H, s, *H*-1), 6.30 (1H, s, *H*-5), 6.62 (1H, s, *H*-8), 7.28 (5H, m, *H*-2', 3', 4', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.4 (*C*-4), 55.9 (OCH₃), 64.0 (*C*-3), 79.3 (*C*-1), 110.6 (*C*-5), 112.7 (*C*-8), 125.3 (*C*-4'), 128.0 (*C*-4a), 128.4 (*C*-2'), 128.4 (*C*-6'), 128.8 (*C*-3'), 128.8 (*C*-5'), 130.0 (*C*-8a), 142.2 (*C*-1'), 143.8 (*C*-6), 145.5 (*C*-7).



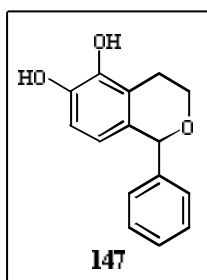
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.61 (1H, m, *H*-4), 2.91 (1H, m, *H*-4), 3.78 (4H, m, *H*-3, OCH₃), 4.06 (1H, m, *H*-3), 5.49 (1H, s, *H*-1), 6.19 (1H, s, *H*-5), 6.54 (1H, s, *H*-8), 6.68 (2H, d, *J*=8.6, *H*-3', 5'), 7.03 (2H, d, *J*=8.6, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.3 (*C*-4), 55.8 (OCH₃), 63.7 (*C*-3), 78.9 (*C*-1), 110.7 (*C*-5), 112.9 (*C*-8), 115.1 (*C*-2'), 115.1 (*C*-6'), 125.1 (*C*-4a), 130.0 (*C*-8a), 130.1 (*C*-3'), 130.1 (*C*-5'), 133.3 (*C*-1'), 143.4 (*C*-7), 145.6 (*C*-6), 156.8 (*C*-4').



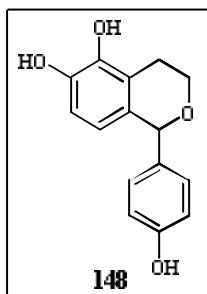
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.70 (1H, m, *H*-4), 3.21 (1H, m, *H*-4), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.84 (4H, m, *H*-3, OCH₃), 4.11 (1H, m, *H*-3), 5.52 (1H, s, *H*-1), 6.30 (1H, s, *H*-5), 6.49 (1H, s, *H*-8), 6.78 (3H, m, *H*-2', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 28.4 (*C*-4), 55.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 63.9 (*C*-3), 79.3 (*C*-1), 110.5 (*C*-5), 111.0 (*C*-8), 112.8 (*C*-2'), 113.9 (*C*-5'), 122.1 (*C*-6'), 125.2 (*C*-1'), 130.2 (*C*-4a), 134.1 (*C*-8a), 143.7 (*C*-7), 145.6 (*C*-4'), 145.6 (*C*-6), 146.7 (*C*-3').



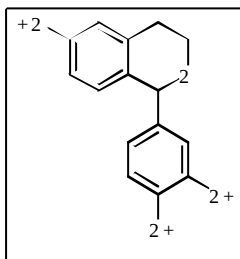
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d* ppm): 2.80 (2H, m, *H*-4), 3.78 (1H, m, *H*-3), 4.15 (1H, m, *H*-3), 5.63 (1H, s, *H*-1), 6.16 (2H, d, *J*=8.0, *H*-8), 6.54 (1H, d, *J*=8.0, *H*-7), 7.29 (5H, m, *H*-2', 3', 4', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d* ppm): 23.1 (*C*-4), 63.2 (*C*-3), 79.3 (*C*-1), 112.9 (*C*-7), 118.6 (*C*-8), 121.3 (*C*-4a), 128.1 (*C*-4'), 128.4 (*C*-2'), 128.4 (*C*-6'), 128.9 (*C*-3'), 128.9 (*C*-5'), 130.3 (*C*-8a), 141.2 (*C*-1'), 141.3 (*C*-6), 142.0 (*C*-5).



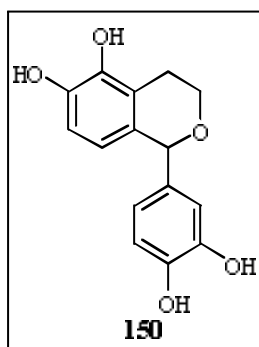
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d* ppm): 2.74 (2H, m, *H*-4), 3.81 (1H, m, *H*-3), 4.03 (1H, m, *H*-3), 5.49 (1H, s, *H*-1), 6.05 (1H, d, *J*=7.9, *H*-8), 6.49 (1H, d, *J*=7.9, *H*-7), 6.68 (2H, d, *J*=8.6, *H*-3', 5'), 7.02 (2H, d, *J*=8.6, *H*-2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d* ppm): 29.6 (*C*-4), 63.2 (*C*-3), 79.0 (*C*-1), 112.6 (*C*-7), 115.0 (*C*-3'), 115.0 (*C*-5'), 118.2 (*C*-8), 121.4 (*C*-4a), 129.7 (*C*-8a), 130.1 (*C*-2'), 130.1 (*C*-6'), 133.5 (*C*-1'), 141.5 (*C*-5), 142.0 (*C*-6), 156.5 (*C*-4').



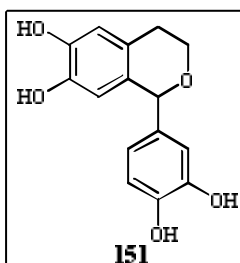
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 2.62 (1H, m, *H*-4), 2.88 (1H, m, *H*-4), 3.75 (1H, m, *H*-3), 4.02 (1H, m, *H*-3), 5.46 (1H, s, *H*-1), 6.48 (3H, m, *H*-5, 7, 5'), 6.76 (3H, m, *H*-8, 2', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 28.8 (*C*-4), 63.3 (*C*-3), 79.2 (*C*-1), 113.3 (*C*-2'), 114.5 (*C*-7), 114.6 (*C*-5'), 115.7 (*C*-5), 121.0 (*C*-6'), 128.1 (*C*-1'), 128.5 (*C*-8), 134.2 (*C*-8a), 134.8 (*C*-4a), 144.2 (*C*-4'), 144.5 (*C*-3'), 155.0 (*C*-6).



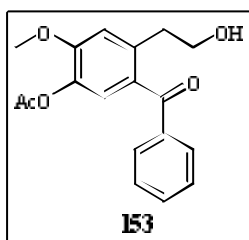
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 2.78 (1H, m, *H*-4), 3.00 (1H, m, *H*-4), 3.80 (1H, m, *H*-3), 4.05 (1H, m, *H*-3), 5.47 (1H, s, *H*-1), 6.11 (1H, d, *J*=8.3, *H*-8), 6.51 (1H, d, *J*=8.3, *H*-7), 6.66 (3H, m, *H*-2', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 27.1 (*C*-4), 63.0 (*C*-3), 79.1 (*C*-1), 112.6 (*C*-2'), 114.5 (*C*-7), 115.7 (*C*-5'), 118.3 (*C*-8), 121.1 (*C*-6'), 121.3 (*C*-4a), 129.5 (*C*-1'), 134.2 (*C*-8a), 141.5 (*C*-6), 142.0 (*C*-7), 144.1 (*C*-4'), 144.4 (*C*-3').



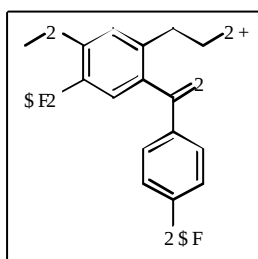
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 2.87 (2H, m, *H*-4), 3.78 (1H, m, *H*-3), 4.04 (1H, m, *H*-3), 5.42 (1H, s, *H*-1), 6.15 (1H, s, *H*-5), 6.54 (1H, s, *H*-8), 6.67 (3H, m, *H*-2', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD, *d ppm*): 28.0 (*C*-4), 63.8 (*C*-3), 79.0 (*C*-1), 113.3 (*C*-8), 114.5 (*C*-2'), 114.6 (*C*-5'), 115.7 (*C*-5), 121.2 (*C*-6'), 125.5 (*C*-1'), 128.9 (*C*-4a), 134.4 (*C*-8a), 142.3 (*C*-7), 143.3 (*C*-6), 144.0 (*C*-4'), 144.4 (*C*-3').



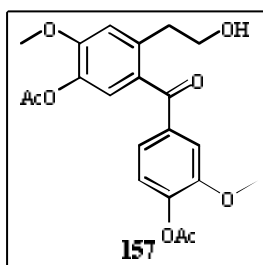
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.24 (3H, s, CH₃), 2.99 (2H, t, J=6.07, H-2'), 3.87-3.96 (5H, m, OCH₃, H-1'), 6.97 (1H, s, H-6), 7.02 (1H, s, H-3), 7.40-7.80 (5H, m, H_{ar}).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.6 (CH₃), 36.4 (C-2'), 56.0 (OCH₃), 64.0 (C-1'), 114.8 (C-3), 125.4 (C-6), 128.4 (C-3 anello B), 128.4 (C-5 anello B), 130.5 (C-2 anello B), 130.5 (C-6 anello B), 137.9 (C-4 anello B), 135.6 (C-1), 137.9 (C-1 anello B), 140.3 (C-2 anello B), 140.3 (C-4), 145.0 (C-5), 168.8 (COCH₃), 197.1 (COPh).



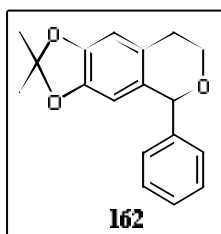
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.26 (3H, s, CH₃), 2.31 (3H, s, CH₃), 2.98 (2H, t, J=6.02, H-2'), 3.89-3.95 (5H, m, OCH₃, H-1'), 6.96 (H-6), 7.08 (H-3), 7.17 (2H, d, H-3,5 anello B), 7.82 (2H, d, H-2,6 anello B).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.5 (CH₃), 21.1 (CH₃), 36.4 (C-2'), 56.0 (OCH₃), 64.0 (C-1'), 114.8 (C-3), 121.7 (C-3 anello B), 121.7 (C-5 anello B), 125.2 (C-6), 135.4 (C-2 anello B), 135.4 (C-6 anello B), 137.0 (C-1), 138.2 (C-2), 140.2 (C-4), 140.2 (C-1 anello B), 153.5 (C-5), 154.4 (C-4 anello B), 167.8 (COCH₃), 168.1 (COCH₃), 197.1 (COPh).



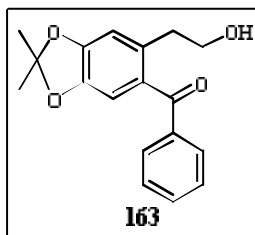
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.27 (3H, s, CH₃), 2.32 (3H, s, CH₃), 2.98 (2H, t, J=6.01, H-2'), 3.80-3.96 (8H, m, 2xOCH₃, H-1'), 6.96 (1H, s, H-6), 7.06-7.48 (5H, s, H_{ar}).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.6 (CH₃), 20.6 (CH₃), 36.3 (C-1'), 56.0 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 64.0 (C-1'), 113.8 (C-2 anello B), 114.8 (C-3), 122.7 (C-6), 124.3 (C-5 anello B), 125.5 (C-6 anello B), 130.0 (C-1 anello B), 136.5 (C-1), 136.8 (C-4), 140.2 (C-2), 141.8 (C-4 anello B), 151.3 (C-5), 153.5 (C-3 anello B), 168.5 (COCH₃), 168.9 (COCH₃), 195.7 (COPh).



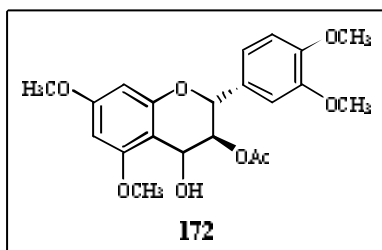
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.62 (6H, s, CH₃), 2.66 (1H, m, H-4), 3.10 (1H, m, H-4), 3.87 (1H, m, H-3), 4.13 (1H, m, H-3), 5.61 (1H, s, H-1), 6.11 (1H, s, H-5), 6.52 (1H, s, H-8), 7.31 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 25.8 (CH₃), 25.8 (CH₃), 28.9 (C-4), 63.9 (C-3), 79.7 (C-1), 106.6 (C-8), 108.1 (C-5), 117.6 (C(CH₃)₂), 126.3 (C-4'), 128.0 (C-4a), 128.4 (C-2'), 128.4 (C-6'), 128.8 (C-3'), 128.8 (C-5'), 129.7 (C-8a), 142.3 (C-1'), 145.8 (C-6), 146.2 (C-7).



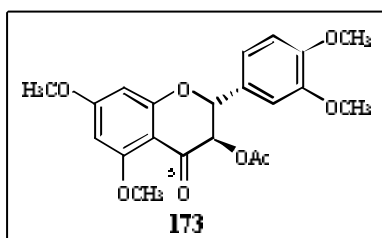
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.74 (6H, s, 2xCH₃), 2.87 (2H, t, J=6.02, H-2'), 4.12 (2H, t, J=6.02, H-1'), 6.69 (1H, s, H-6), 6.75 (1H, s, H-3), 7.40-7.81 (5H, m, H_{ar} anello B).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 25.9 (CH₃), 36.2 (C-2'), 64.1 (C-1'), 109.9 (C-3), 109.7 (C-6), 119.2 (C(CH₃)₂), 128.1 (C-3 anello B), 128.1 (C-5 anello B), 130.6 (C-2 anello B), 130.6 (C-6 anello B), 131.1 (C-1), 133.1 (C-4 anello B), 135.1 (C-2), 138.0 (C-1 anello B), 148.6 (C-4), 150.0 (C-5), 197.9 (COCH₃).



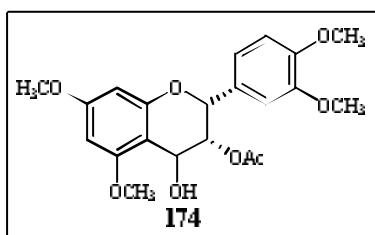
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.89 (3H, s, OCOCH₃), 3.74 (3H, s, OCH₃), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.86 (6H, s, 2xOCH₃), 5.14-5.28 (3H, m, *H*-2,3,4), 6.08-6.10 (2H, m, *H*-6,8), 6.85 (1H, d, *J*=8.2, *H*-5'), 6.95-7.04 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.7 (OCOCH₃), 55.4 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 60.6 (*C*-4), 72.1 (*C*-3), 74.2 (*C*-2), 92.3 (*C*-8), 93.1 (*C*-6), 110.6 (*C*-5'), 110.9 (*C*-2'), 120.5 (*C*-6'), 122.0 (*C*-10), 129.2 (*C*-1'), 148.8 (*C*-4'), 149.3 (*C*-3'), 155.7 (*C*-9), 159.3 (*C*-5), 162.0 (*C*-7), 169.5 (OCOCH₃).



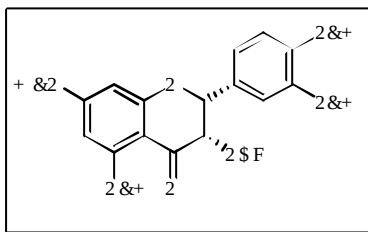
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 2.01 (3H, s, OCOCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 5.27 (1H, d, *J*=12.1, *H*-3), 5.69 (1H, d, *J*=12.1, *H*-2), 6.09-6.12 (2H, m, *H*-6,8), 6.85-7.04 (3H, m, *H*-2',5',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.5 (OCOCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 73.4 (*C*-3), 81.1 (*C*-2), 93.5 (*C*-6), 93.5 (*C*-8), 103.9 (*C*-10), 110.1 (*C*-5'), 111.0 (*C*-2'), 120.4 (*C*-6'), 128.0 (*C*-1'), 149.1 (*C*-3'), 149.8 (*C*-4'), 164.2 (*C*-5), 166.5 (*C*-9), 166.5 (*C*-7), 169.5 (OCOCH₃).



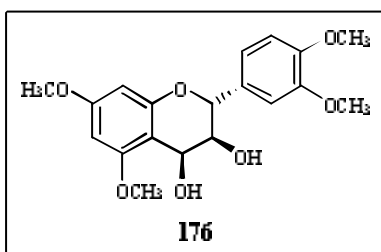
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.89 (3H, s, OCOCH₃), 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, OCH₃), 4.80 (1H, d, *J*=2.1, *H*-2), 5.19-5.21 (2H, m, *H*-3,4), 6.12 (1H, d, *J*=2.3, *H*-8), 6.21 (1H, d, *J*=2.2, *H*-6), 6.85 (1H, d, *J*=8.8, *H*-5'), 6.96-7.04 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.8 (OCOCH₃), 55.4 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 61.4 (*C*-4), 71.4 (*C*-3), 73.9 (*C*-2), 92.3 (*C*-8), 93.4 (*C*-6), 103.5 (*C*-10), 110.0 (*C*-5'), 111.0 (*C*-2'), 119.1 (*C*-6'), 129.7 (*C*-1'), 148.9 (2C, *C*-3'), 148.9 (*C*-4'), 155.9 (*C*-9), 159.9 (*C*-5), 161.5 (*C*-7), 169.7 (OCOCH₃).



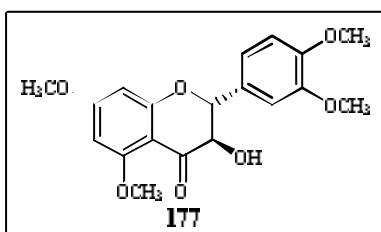
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 1.99 (3H, s, OCOCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.89 (6H, s, 2xOCH₃), 5.50 (1H, d, *J*=3.3, *H*-2), 5.64 (1H, d, *J*=3.3, *H*-3), 6.08 (1H, d, *J*=2.0, *H*-8), 6.16 (1H, d, *J*=2.0, *H*-6), 6.81 (1H, d, *J*=8.8, *H*-5'), 6.95-6.99 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 20.5 (OCOCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 72.4 (C-3), 79.7 (C-2), 93.3 (C-8), 93.7 (C-6), 104.2 (C-10), 110.2 (C-5'), 111.0 (C-2'), 119.4 (C-6'), 127.3 (C-1'), 149.3 (C-3'), 149.9 (C-4'), 162.7 (C-5), 163.9 (C-9), 166.5 (C-7), 168.9 (OCOCH₃), 184.0 (C-4).



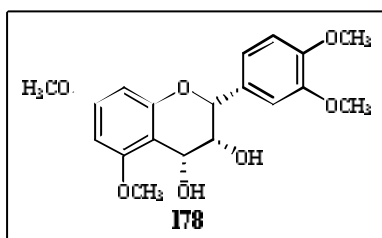
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.74 (3H, s, OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.90-4.00 (1H, m, *H*-4), 4.90 (1H, d, *J*=10, *H*-2), 5.03 (1H, d, *J*=4.2, *H*-3), 6.09-6.12 (2H, m, *H*-6,8), 6.90 (1H, d, *J*=8.1, *H*-5'), 6.99-7.06 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.4 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 61.5 (C-4), 70.5 (C-3), 76.8 (C-2), 92.2 (C-8), 93.1 (C-6), 104.5 (C-10), 110.5 (C-2'), 111.2 (C-5'), 120.5 (C-6'), 130.0 (C-1'), 149.2 (C-3'), 149.9 (C-4'), 155.8 (C-9), 159.6 (C-5), 161.8 (C-7).



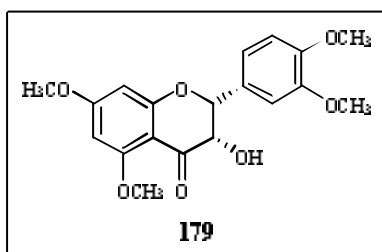
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.91 (3H, s, OCH₃), 3.92 (3H, s, OCH₃), 4.44 (1H, d, *J*=12.2, *H*-3), 4.96 (1H, d, *J*=12.2, *H*-2), 6.08-6.13 (2H, m, *H*-6,8), 6.92 (1H, d, *J*=8, *H*-5'), 7.05-7.12 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 72.6 (C-3), 83.3 (C-2), 93.3 (C-8), 93.7 (C-6), 103.3 (C-10), 110.3 (C-5'), 111.2 (C-2'), 120.4 (C-6'), 128.9 (C-1'), 149.2 (C-3'), 149.8 (C-4'), 162.1 (C-9), 165.0 (C-5), 167.0 (C-7), 190.8 (C-4).



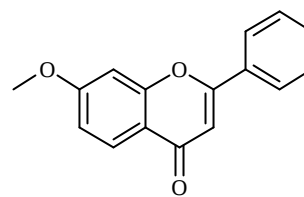
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.91 (3H, s, OCH₃), 4.04 (1H, m, *H*-3), 4.87 (1H, d, *J*=2.5, *H*-2), 5.11 (1H, s, *H*-4), 6.13 (1H, d, *J*=2.3, *H*-8), 6.21 (1H, d, *J*=2.3, *H*-6), 6.91 (1H, d, *J*= 8.1, *H*-5'), 7.06-7.13 (2H, m, *H*-2',6').

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.4 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 63.6 (C-4), 70.7 (C-3), 75.0 (C-2), 92.5 (C-8), 93.4 (C-6), 103.7 (C-10), 109.6 (C-2'), 111.2 (C-5'), 118.7 (C-6'), 130.0 (C-1'), 149.2 (C-3'), 149.7 (C-4'), 155.7 (C-9), 160.2 (C-5), 161.5 (C-7).

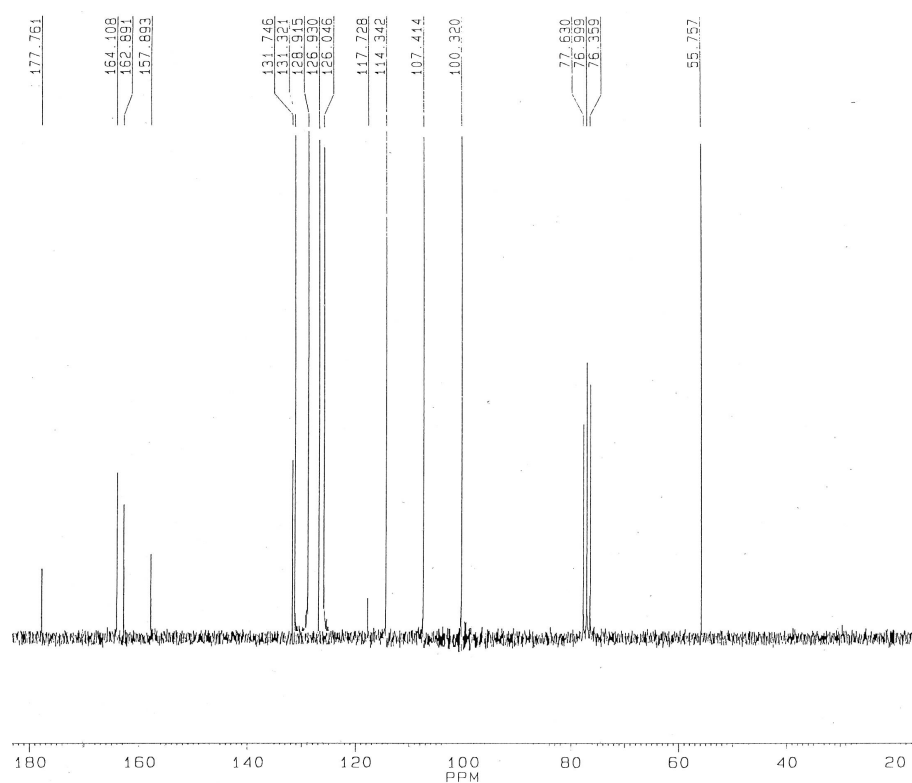
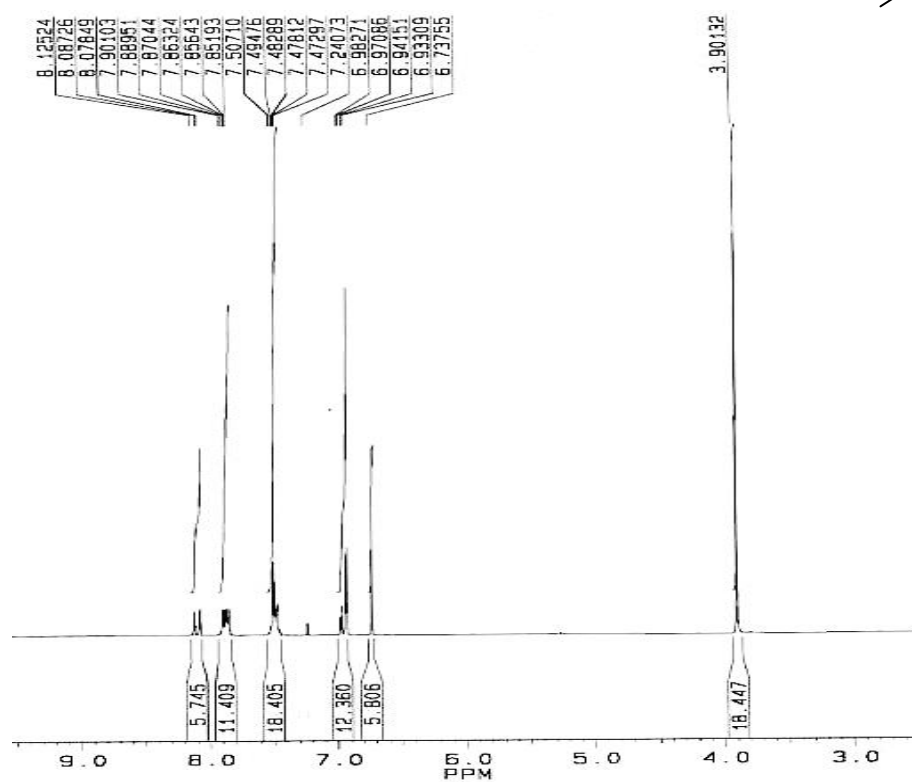


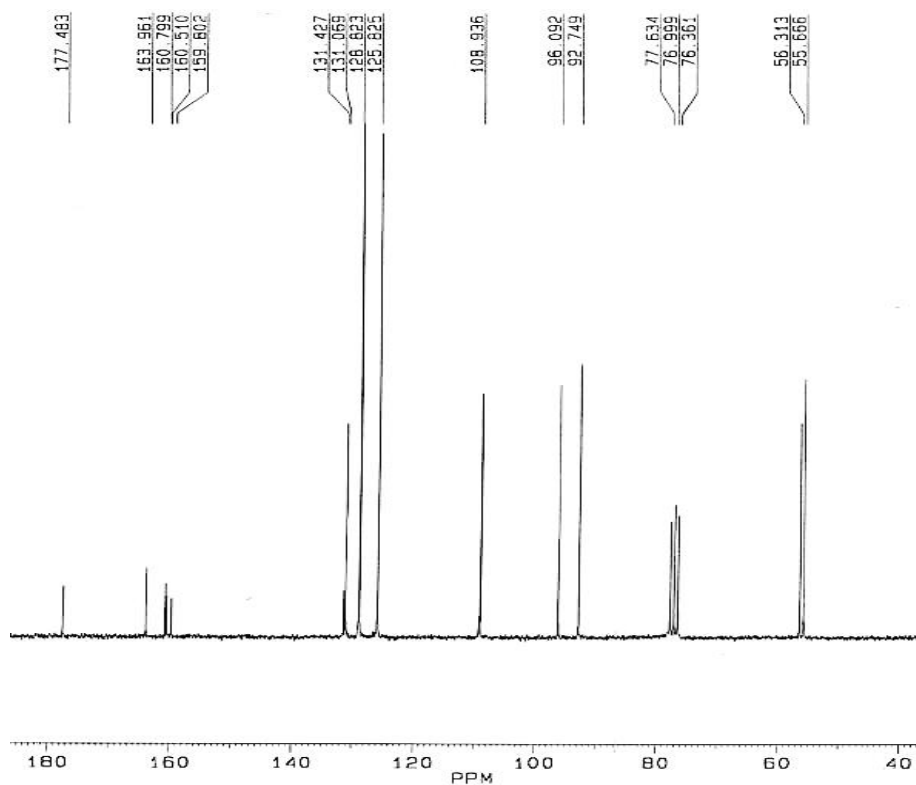
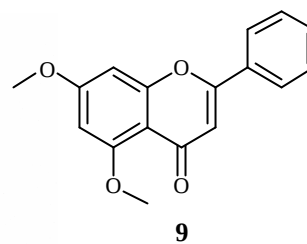
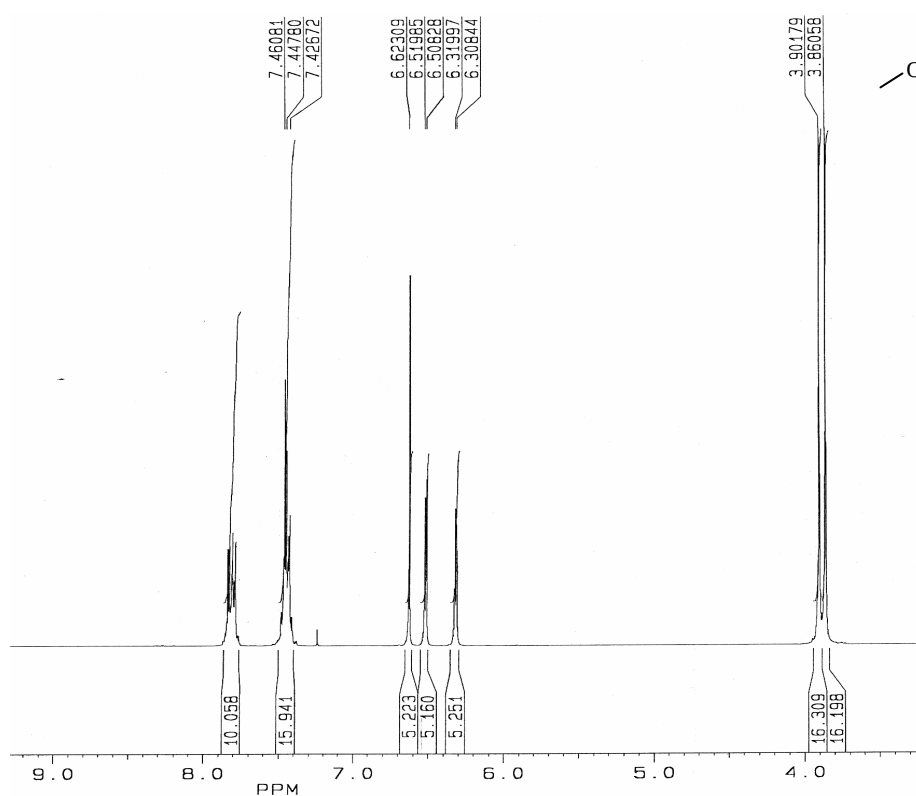
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.83 (1H, d, *J*= 6.4, *H*-3), 5.70 (1H, d, *J*= 6.4, *H*-2), 6.04 (1H, d, *J*=2.3, *H*-8), 6.13 (1H, d, *J*=2.2, *H*-6), 6.71 (1H, d, *J*=8.3, *H*-5'), 6.82-6.90 (2H, m, *H*-2',6').

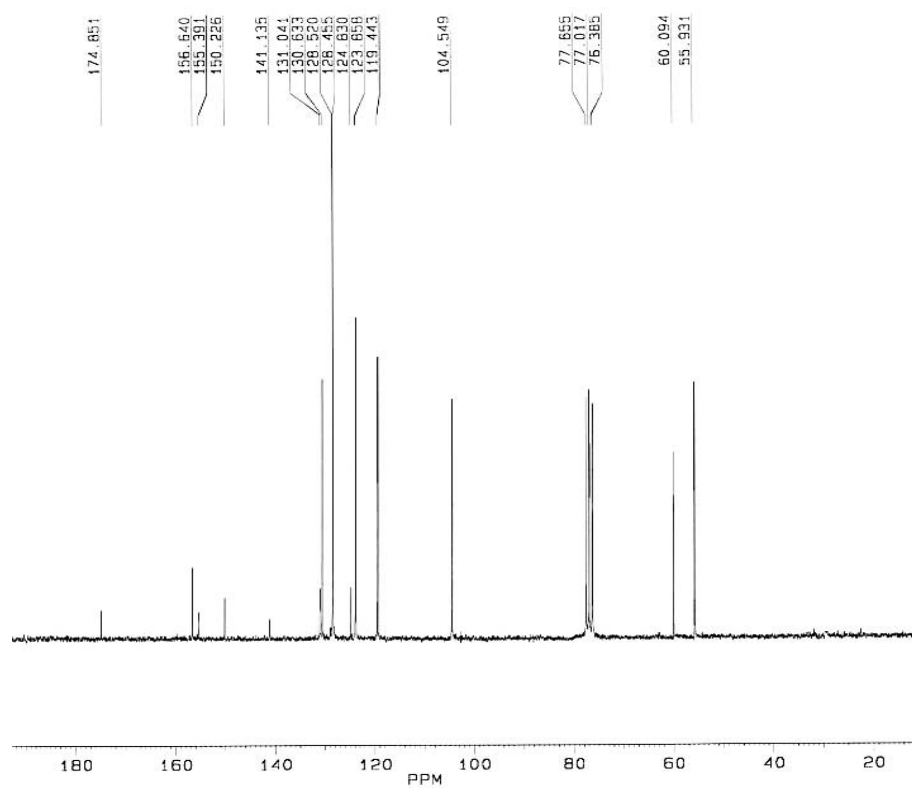
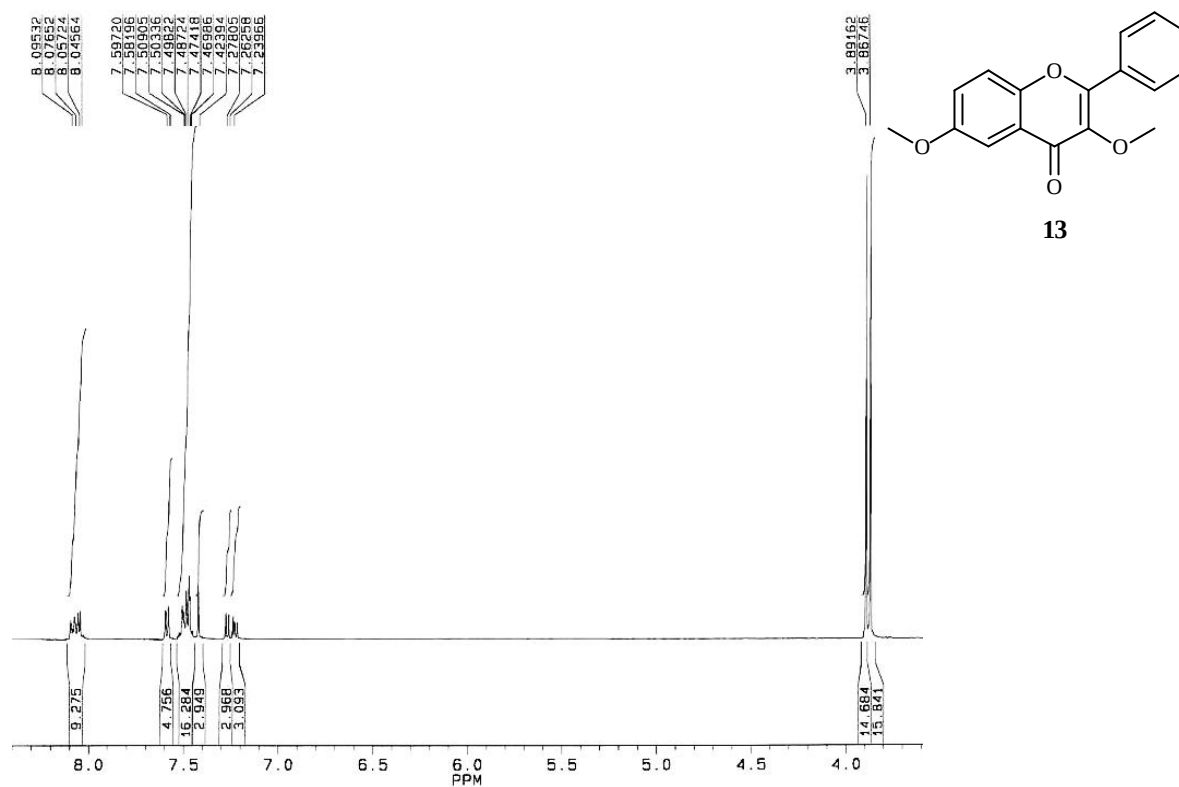
¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, *d ppm*): 55.7 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 72.0 (C-3), 80.1 (C-2), 92.7 (C-8), 93.8 (C-6), 105.5 (C-10), 110.9 (C-5'), 111.2 (C-2'), 119.6 (C-6'), 125.4 (C-1'), 148.7 (C-3'), 149.2 (C-4'), 161.8 (C-9), 163.8 (C-5), 167.0 (C-7), 189.4 (C-4).

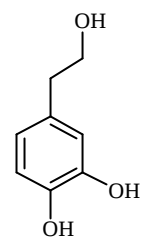
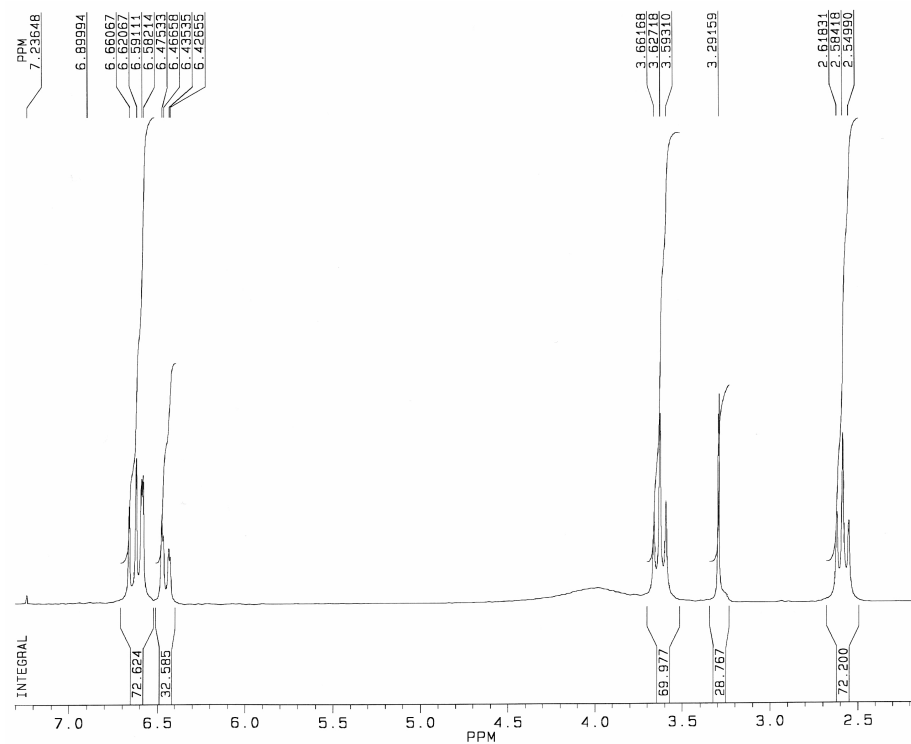


6

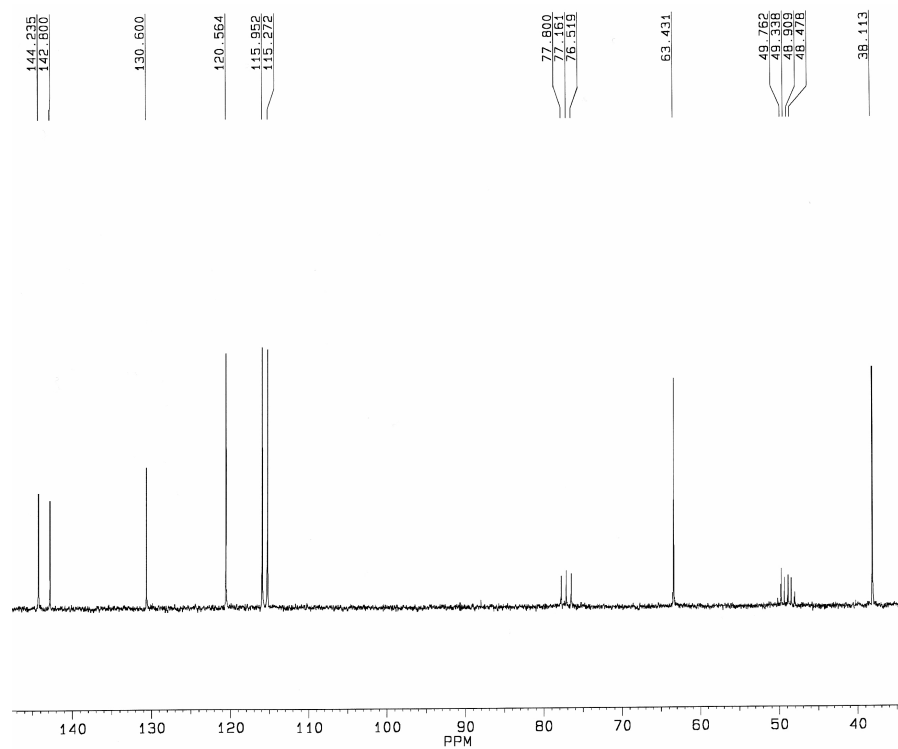


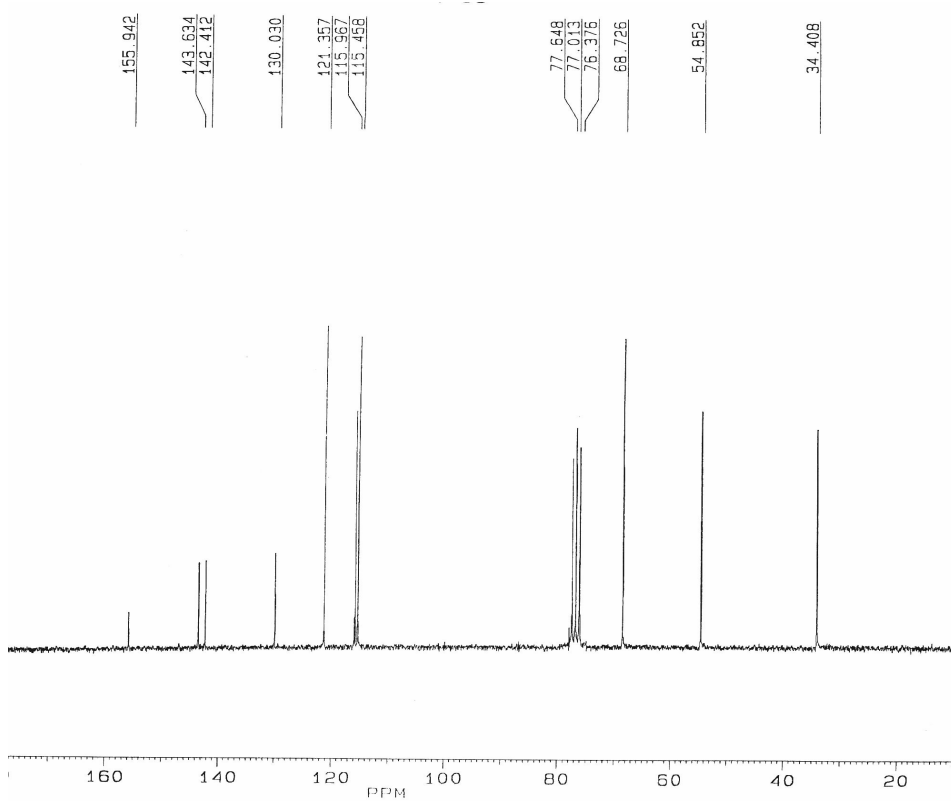
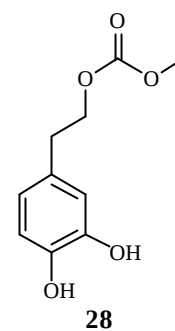
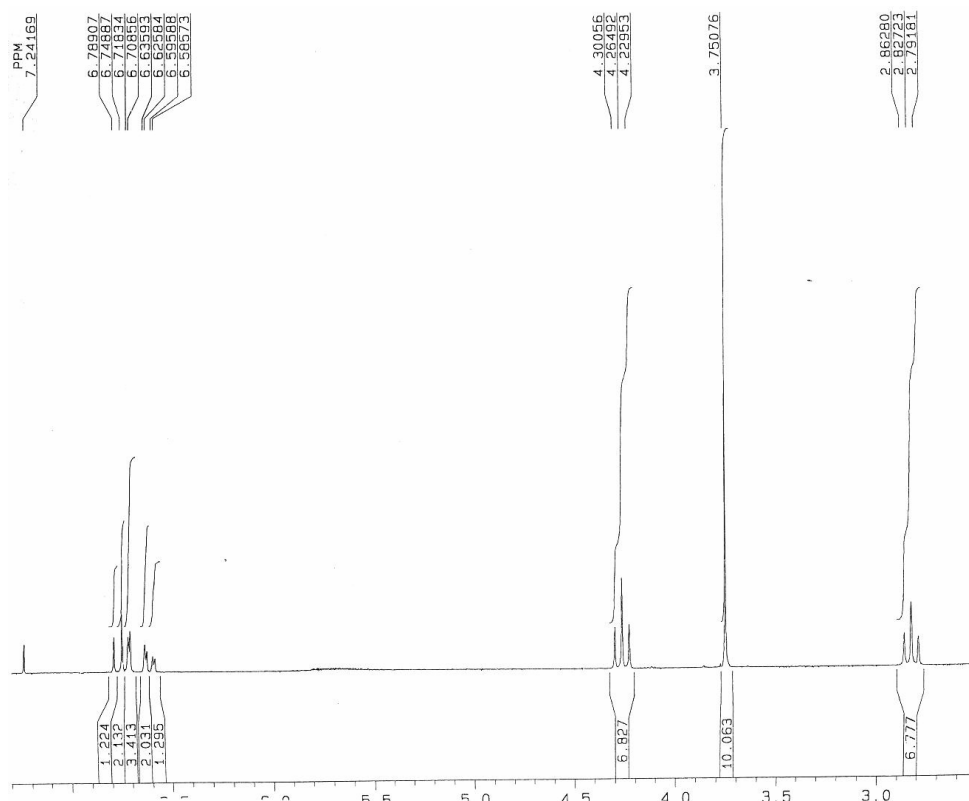


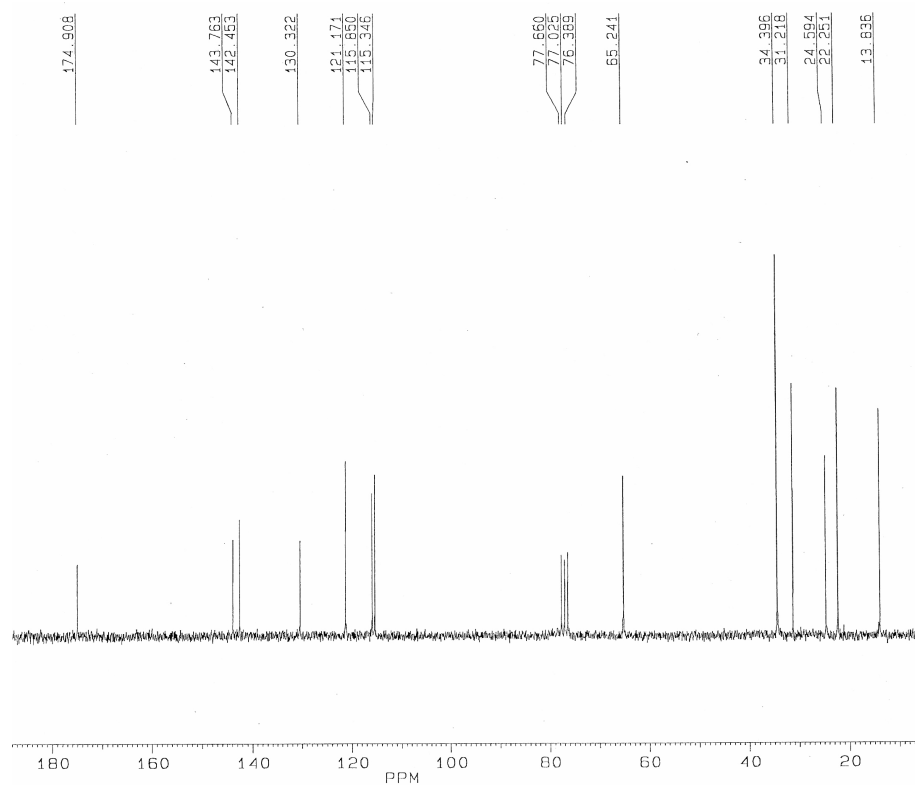
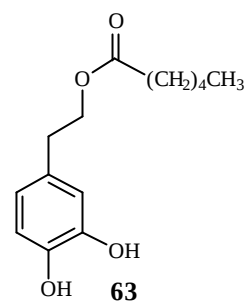
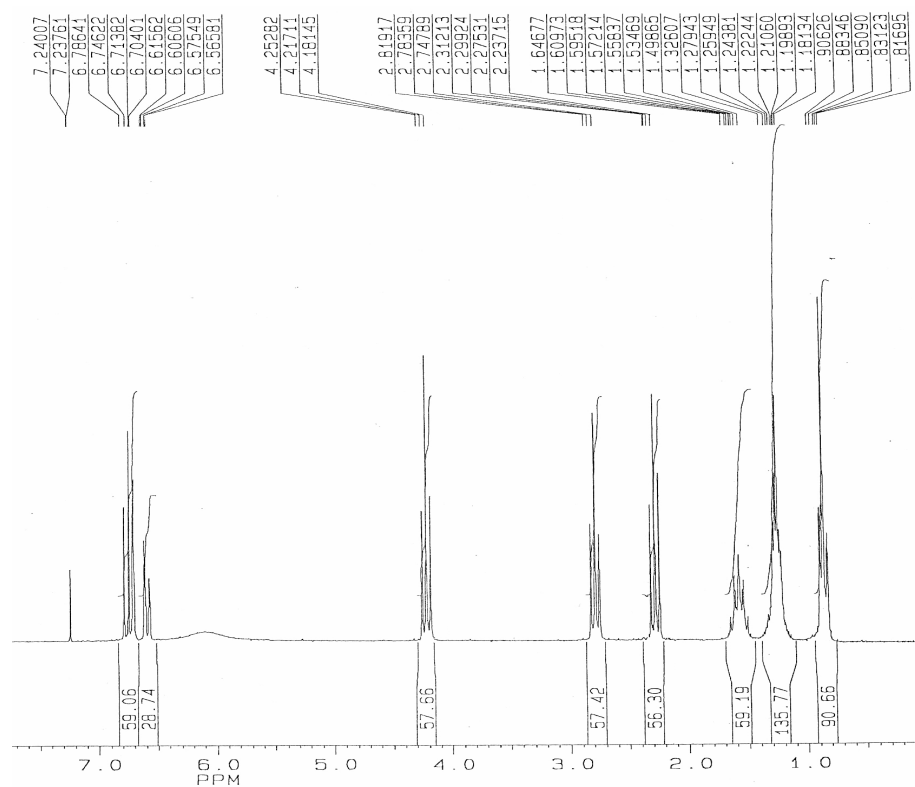


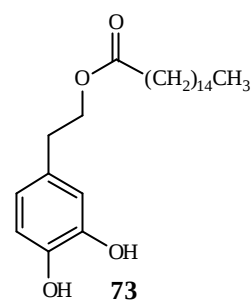


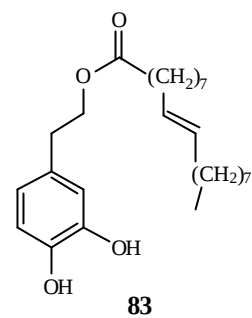
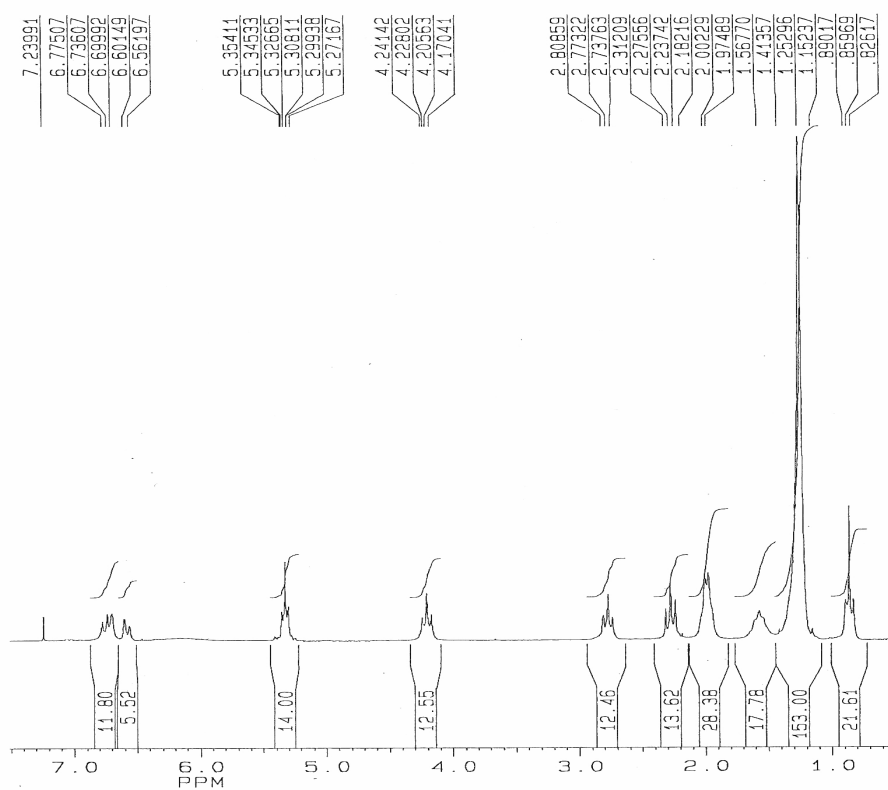
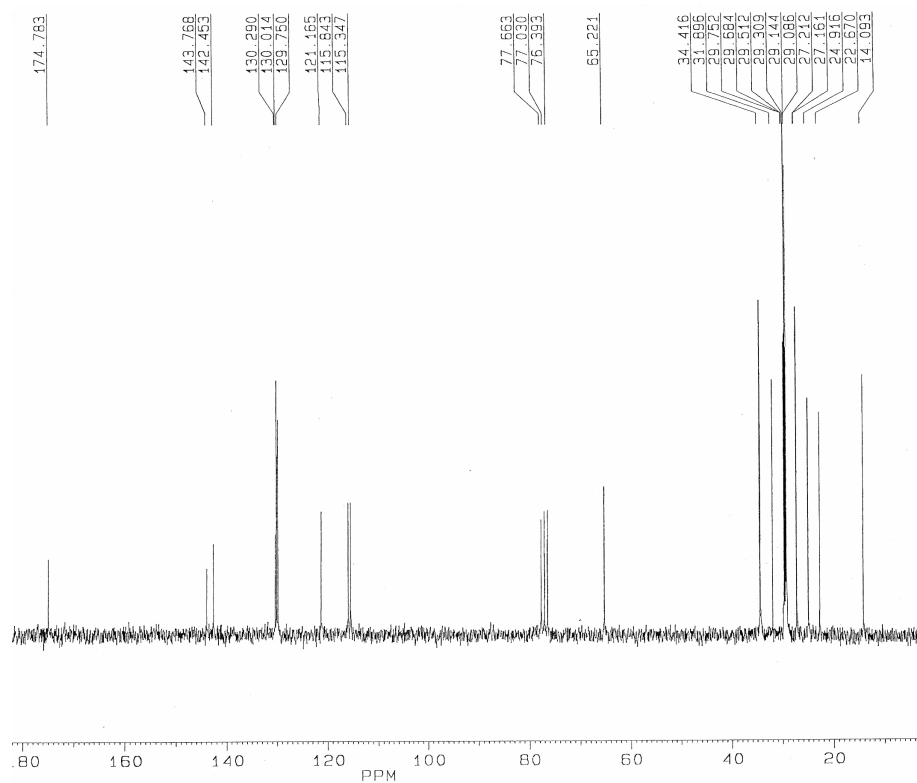
27

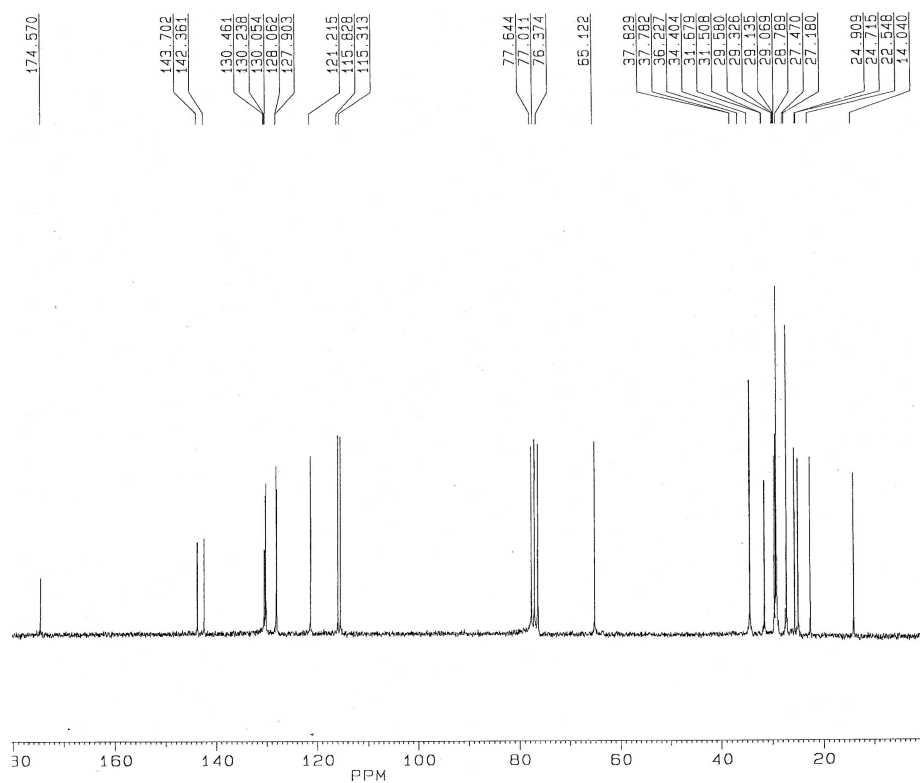
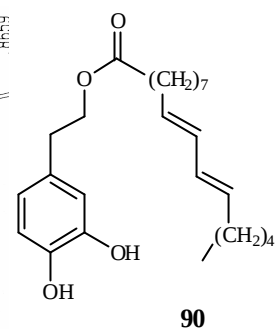
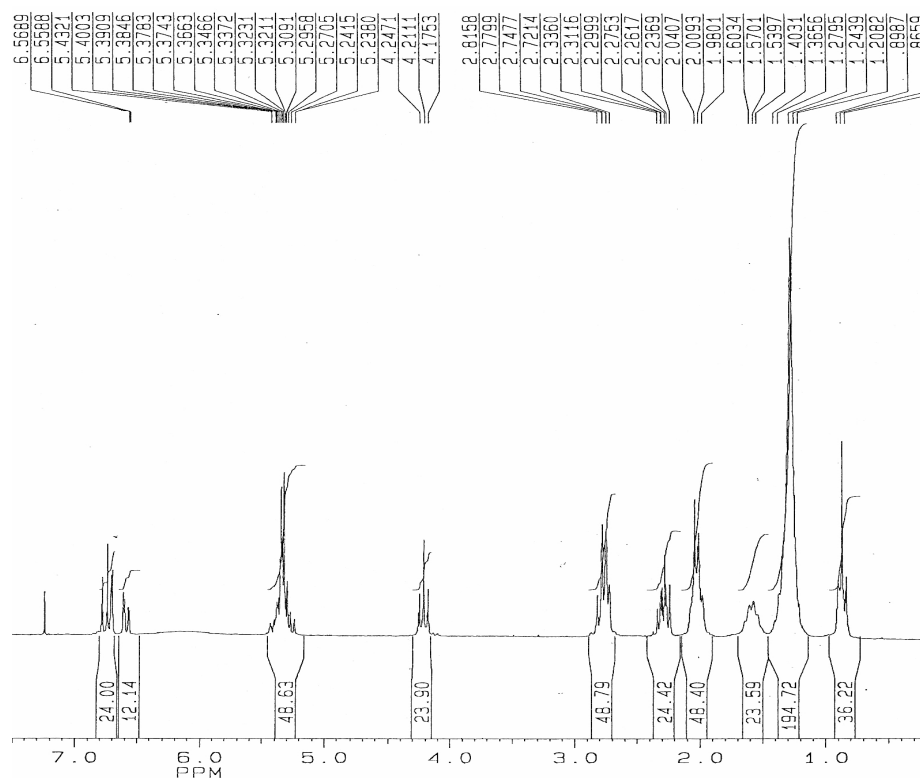


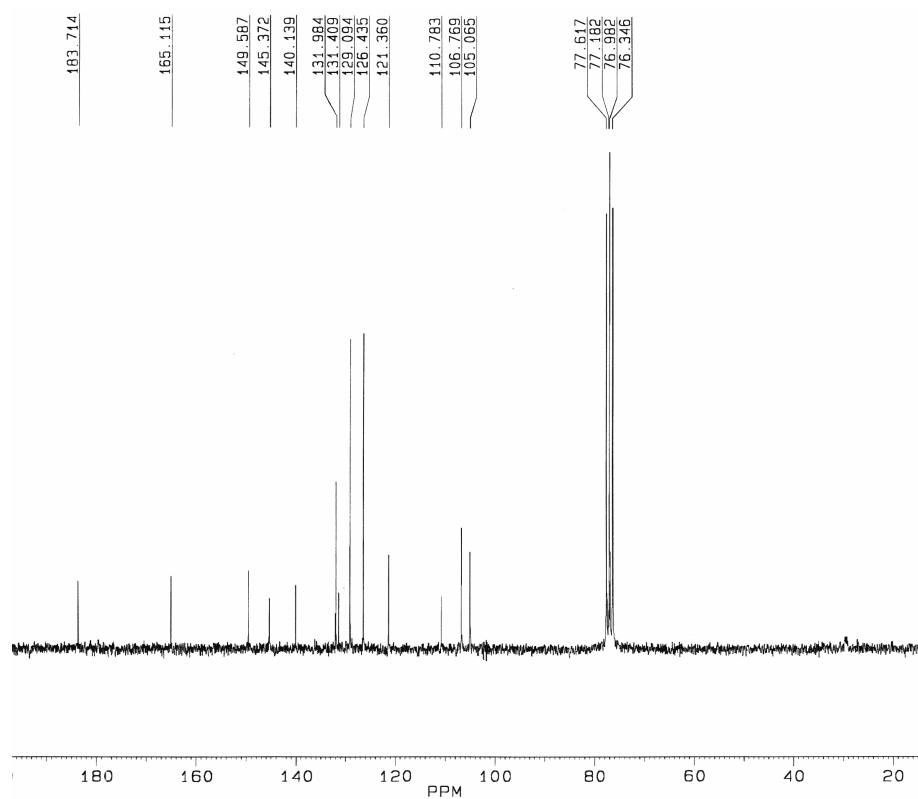
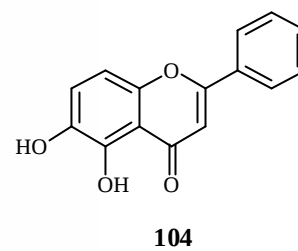


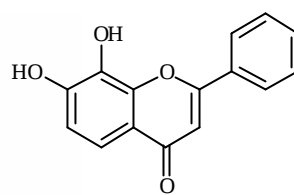
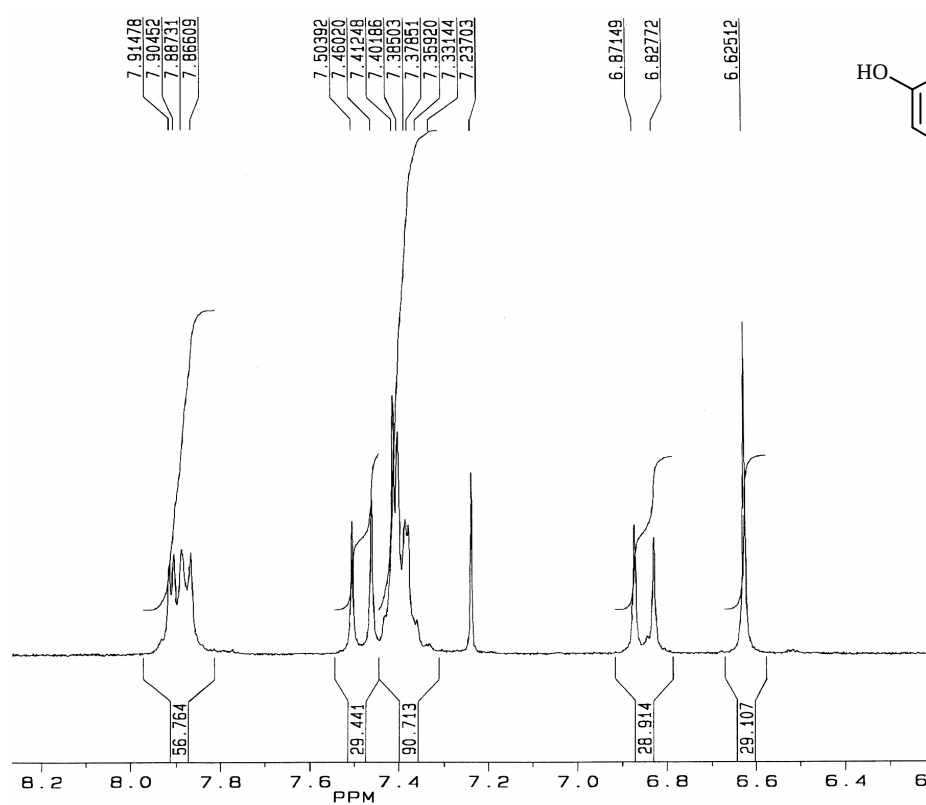




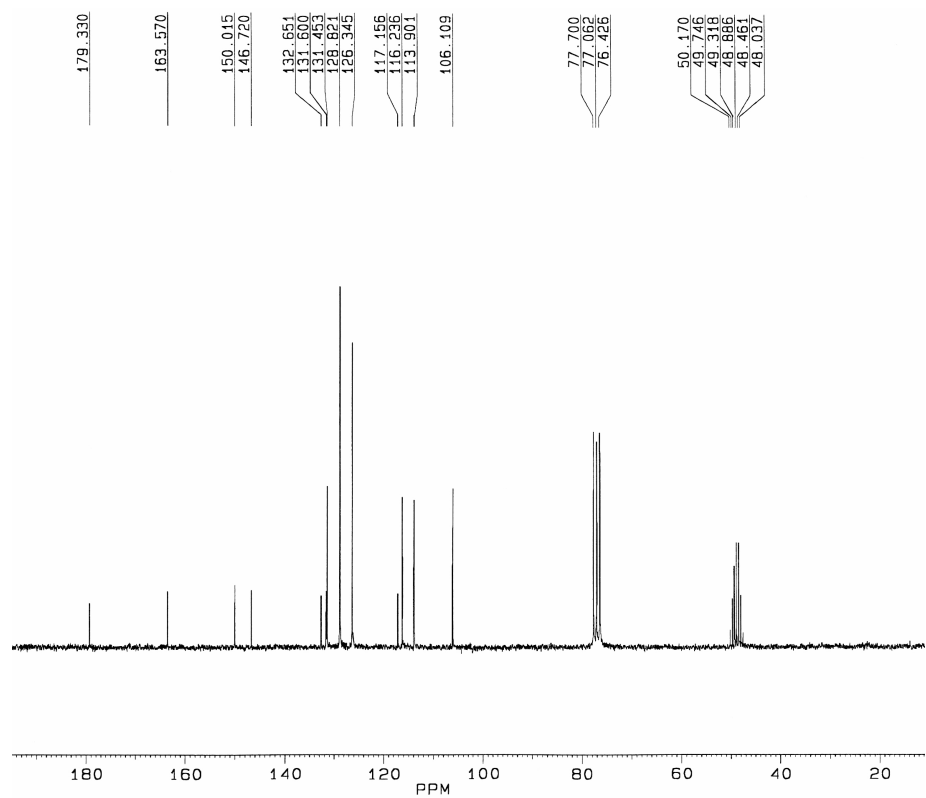


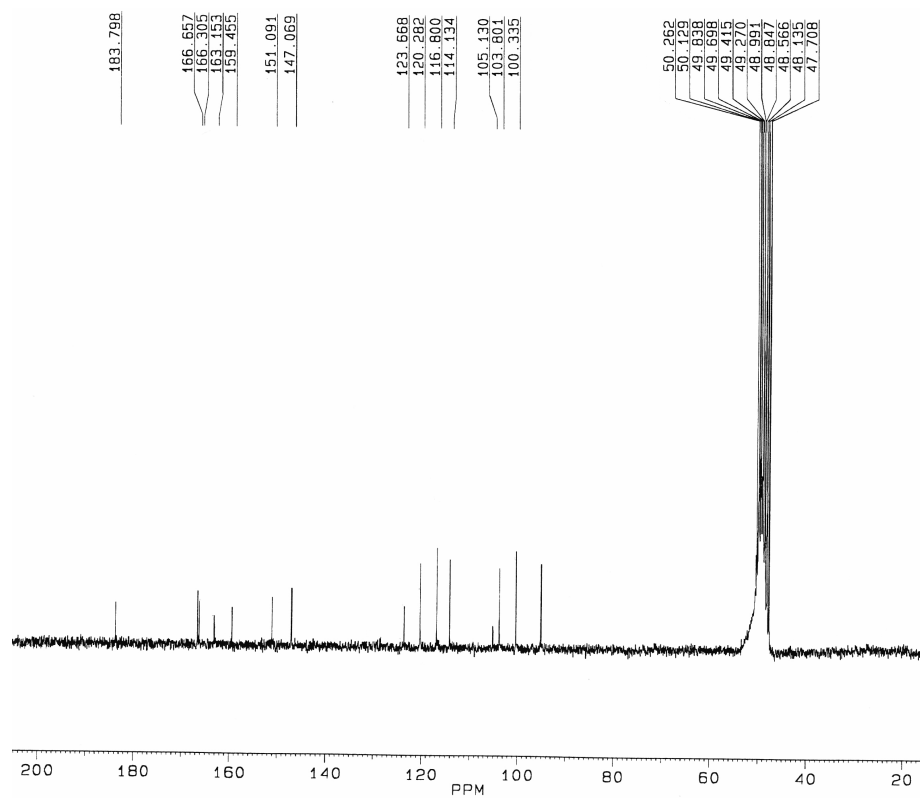
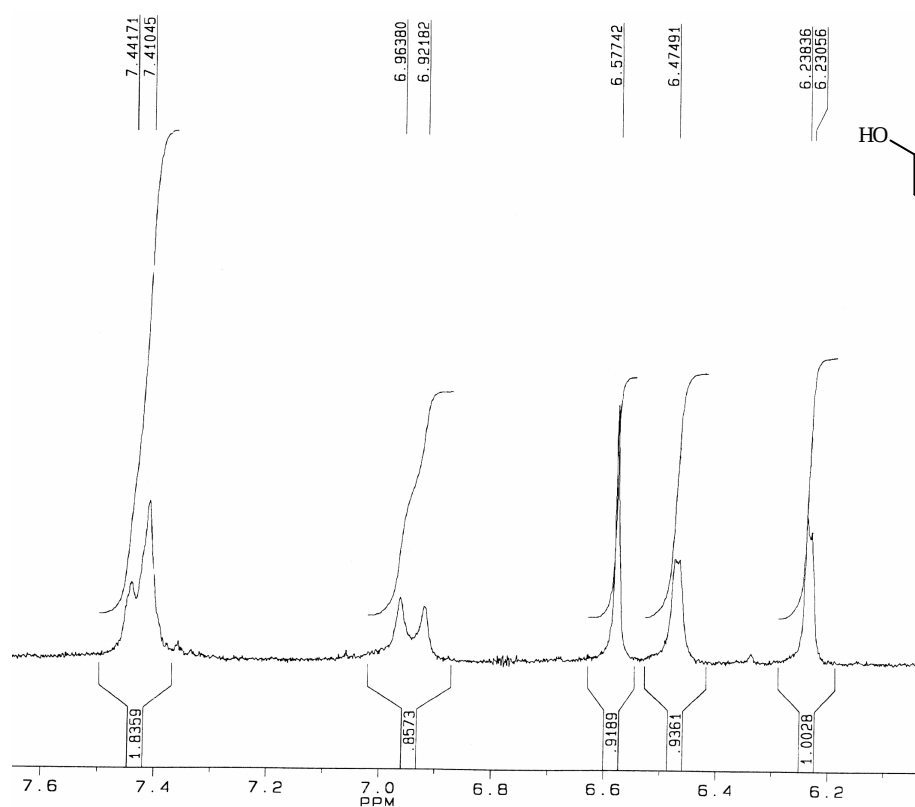


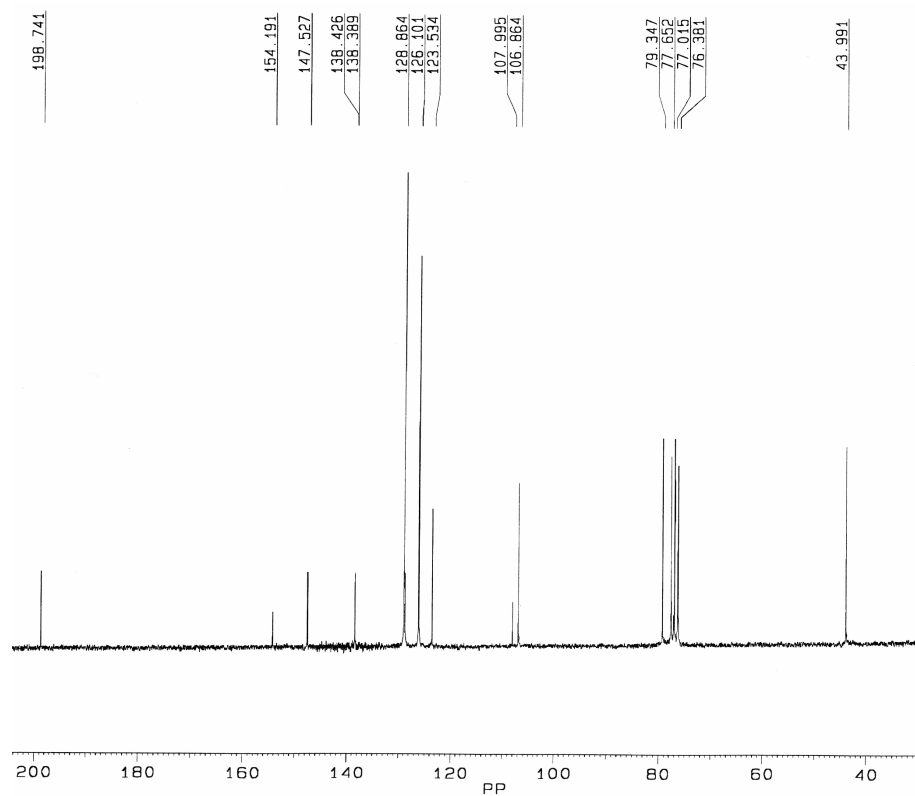
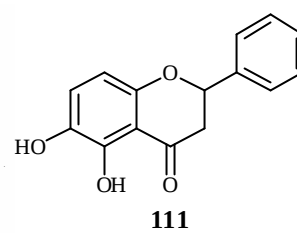
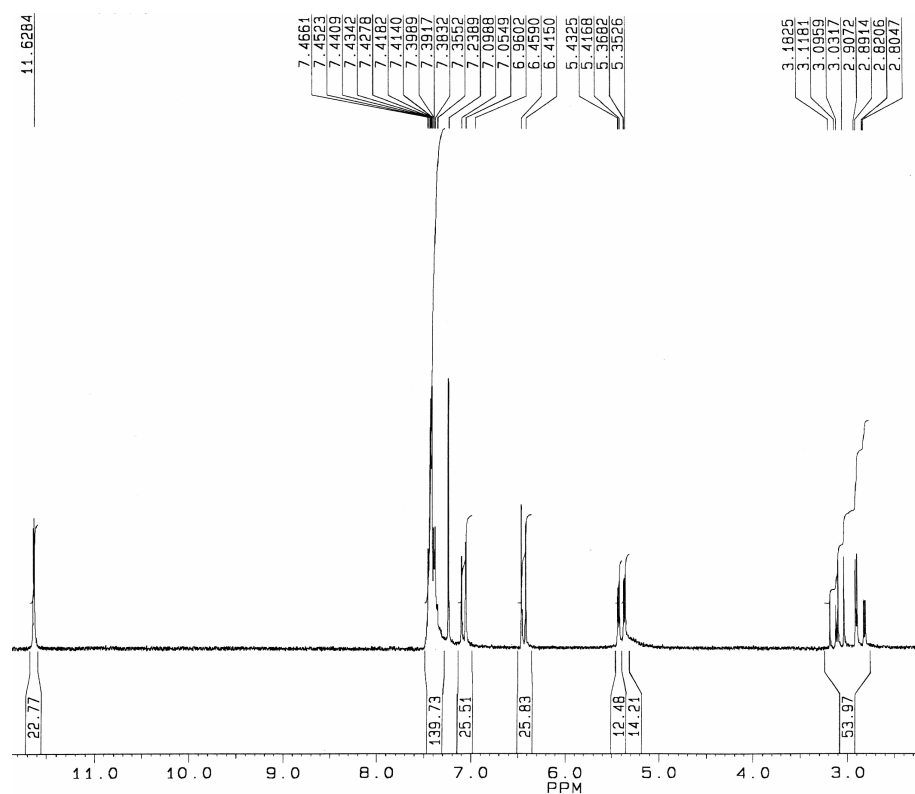


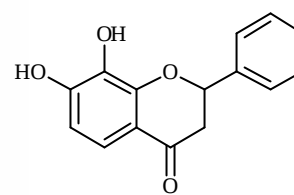
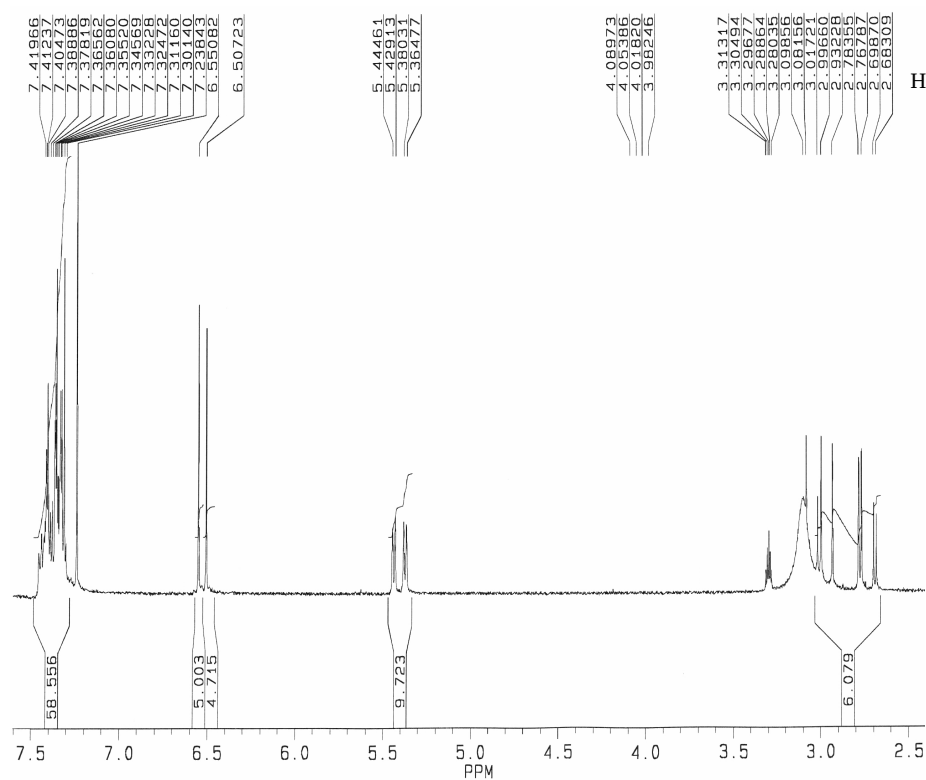


105

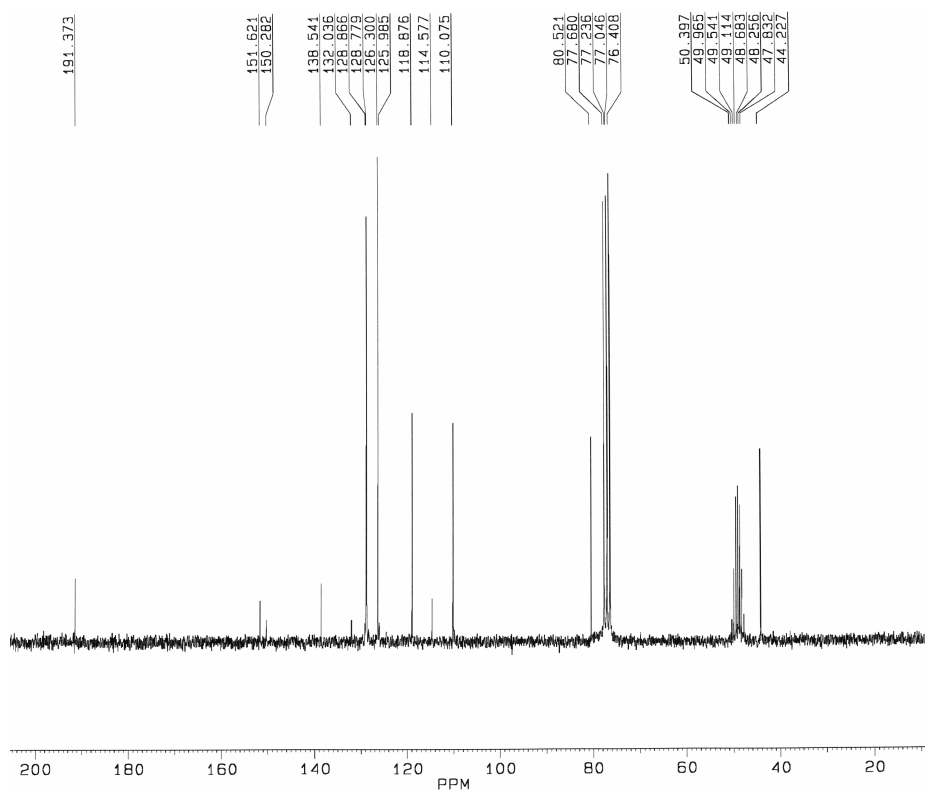


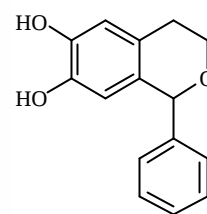
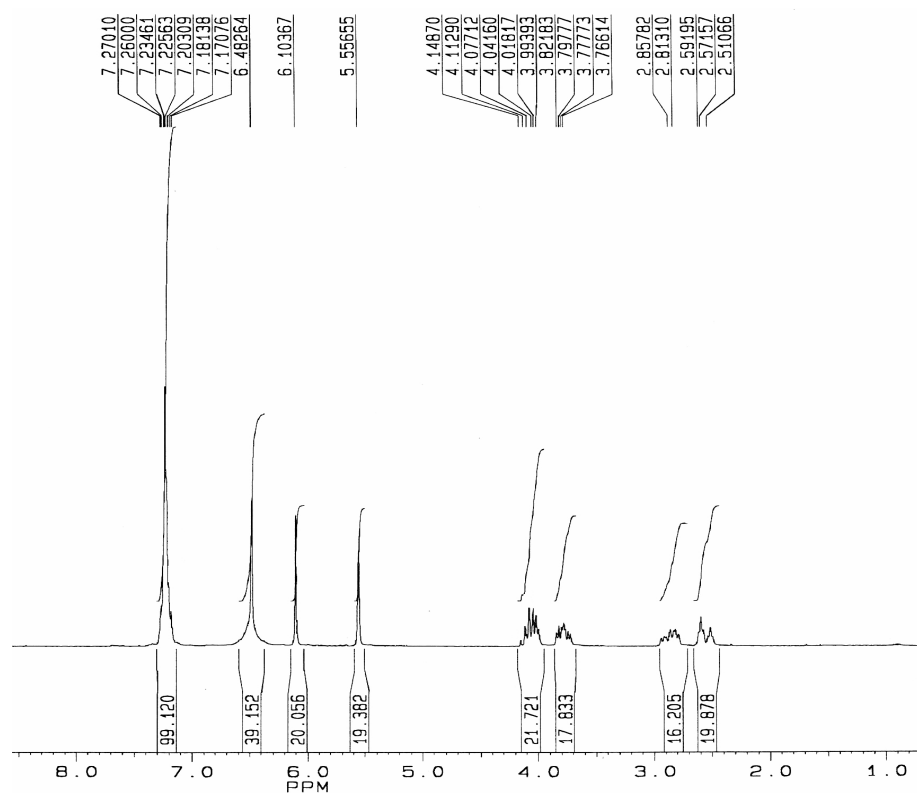




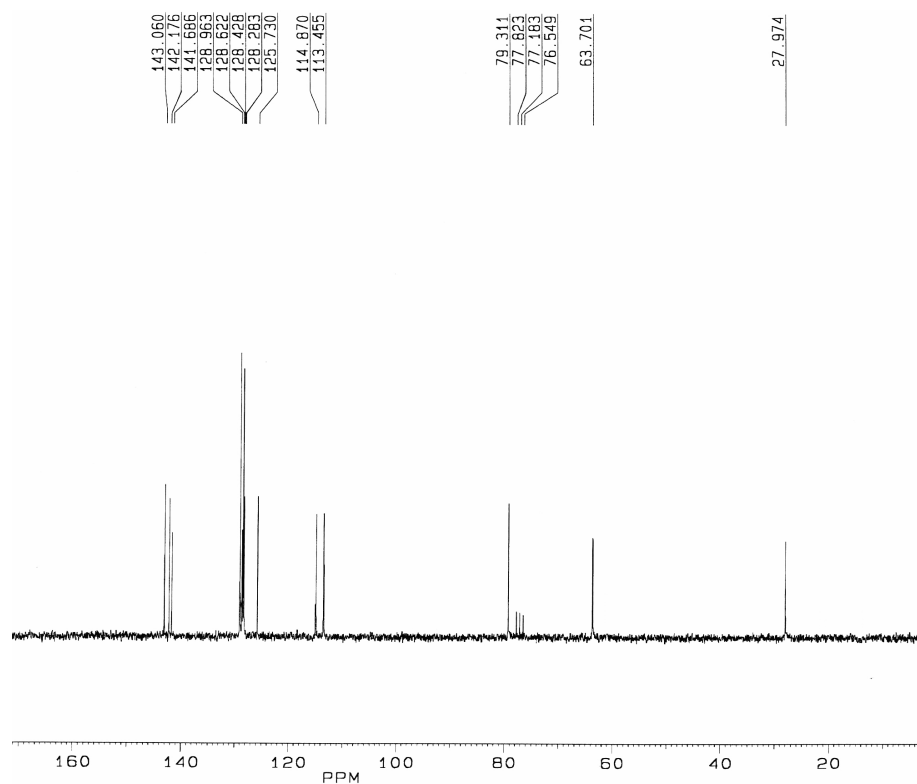


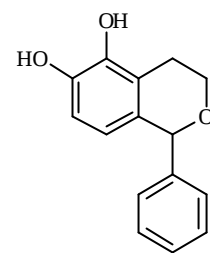
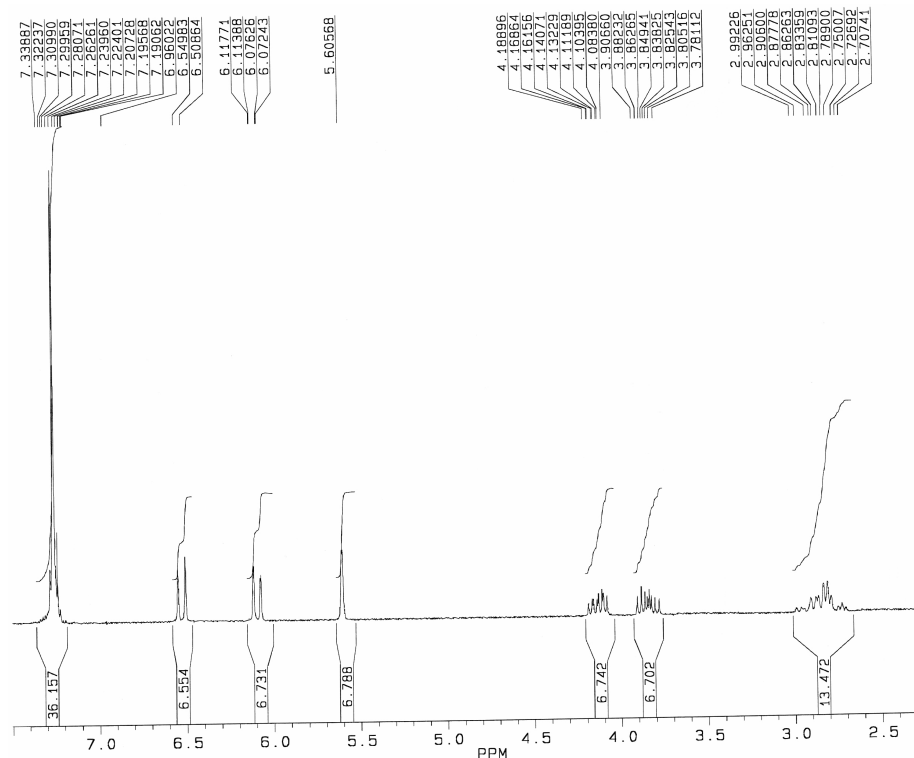
113



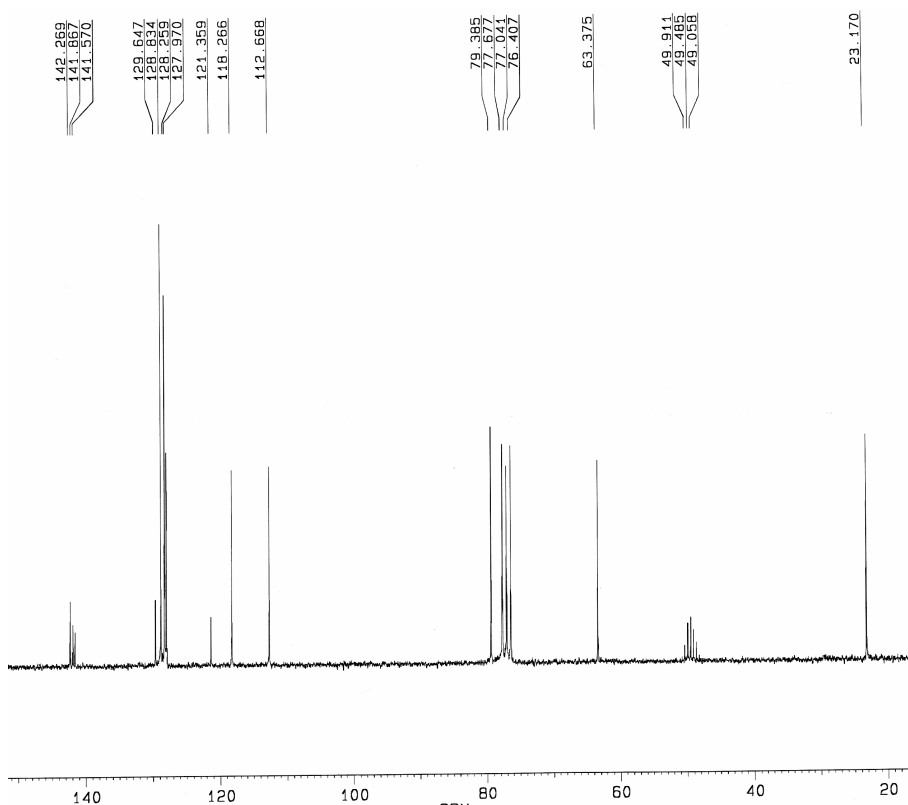


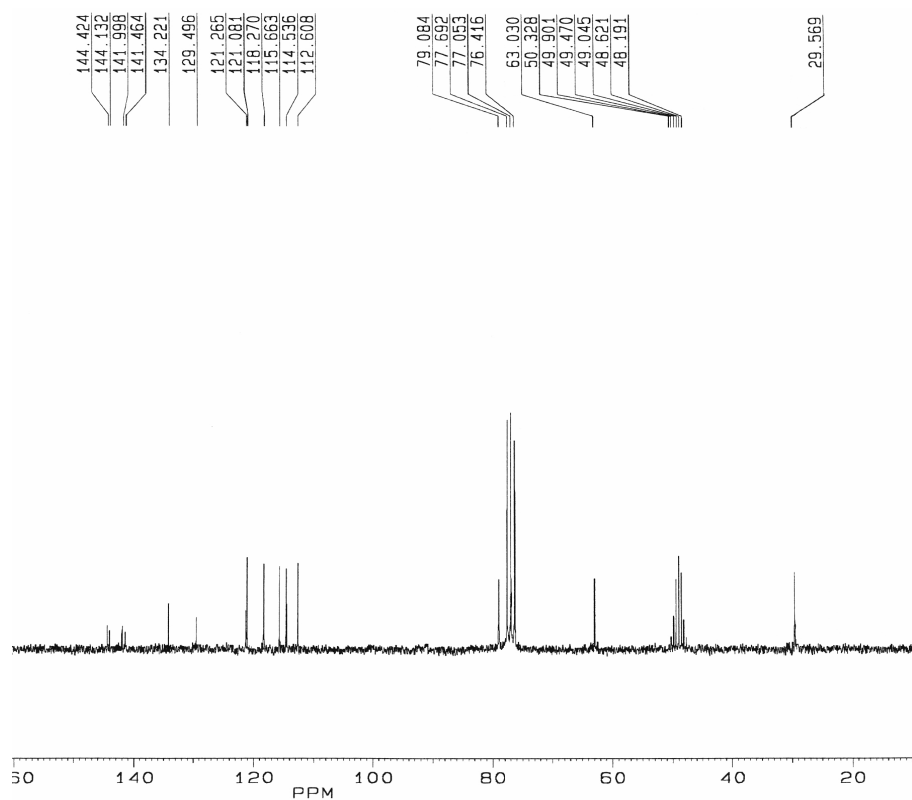
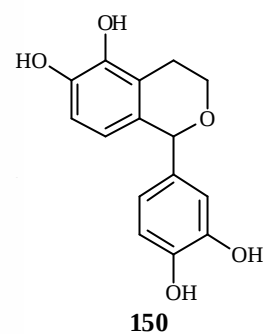
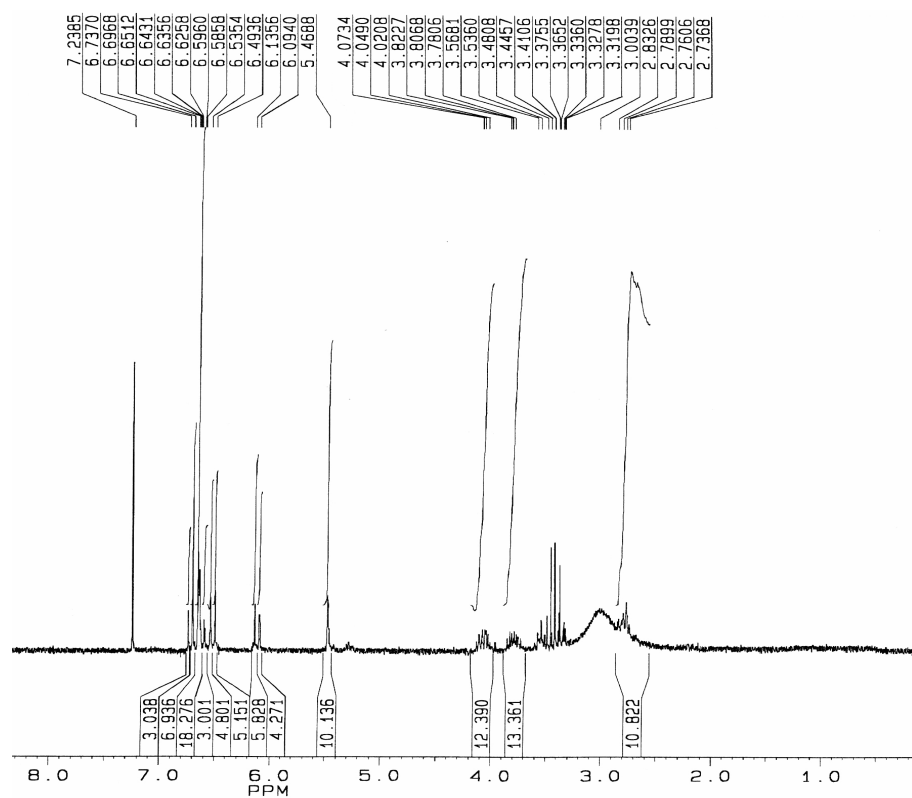
141

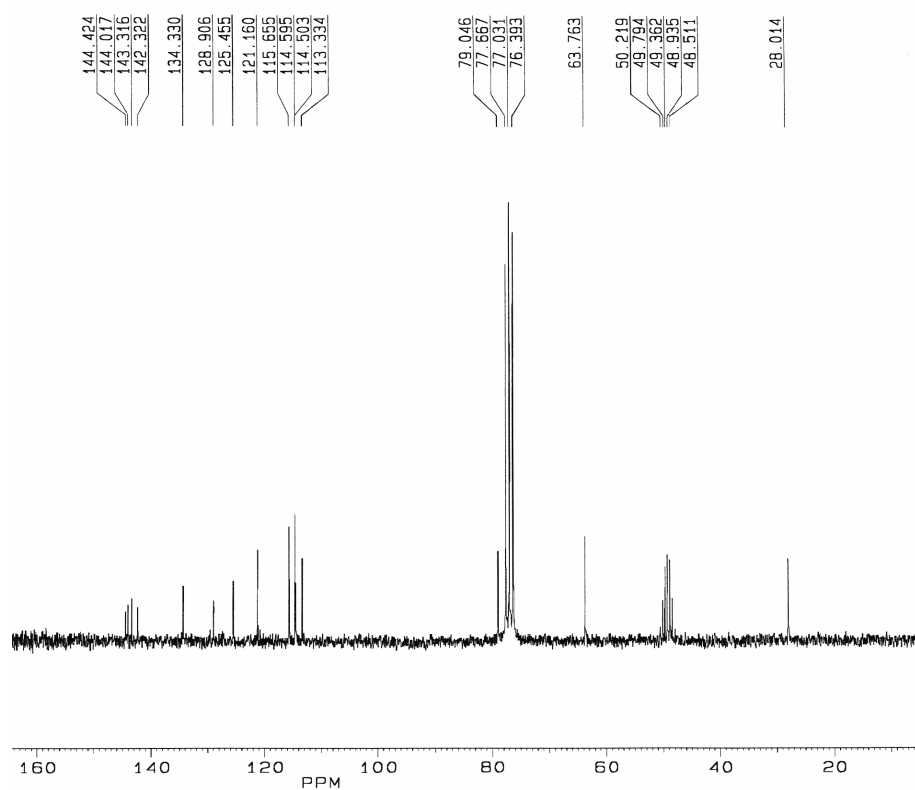
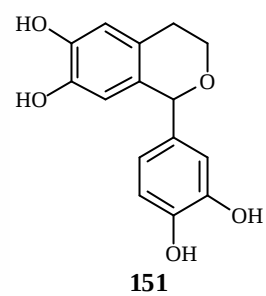
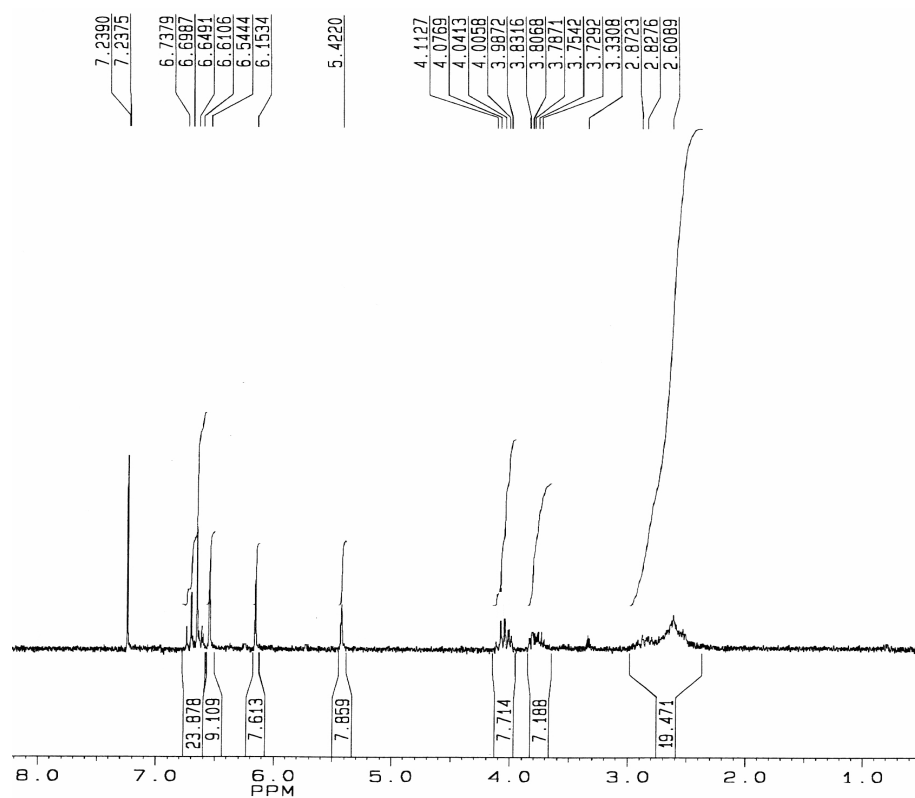


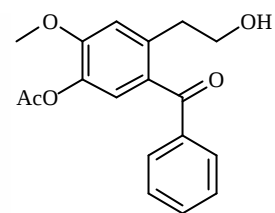
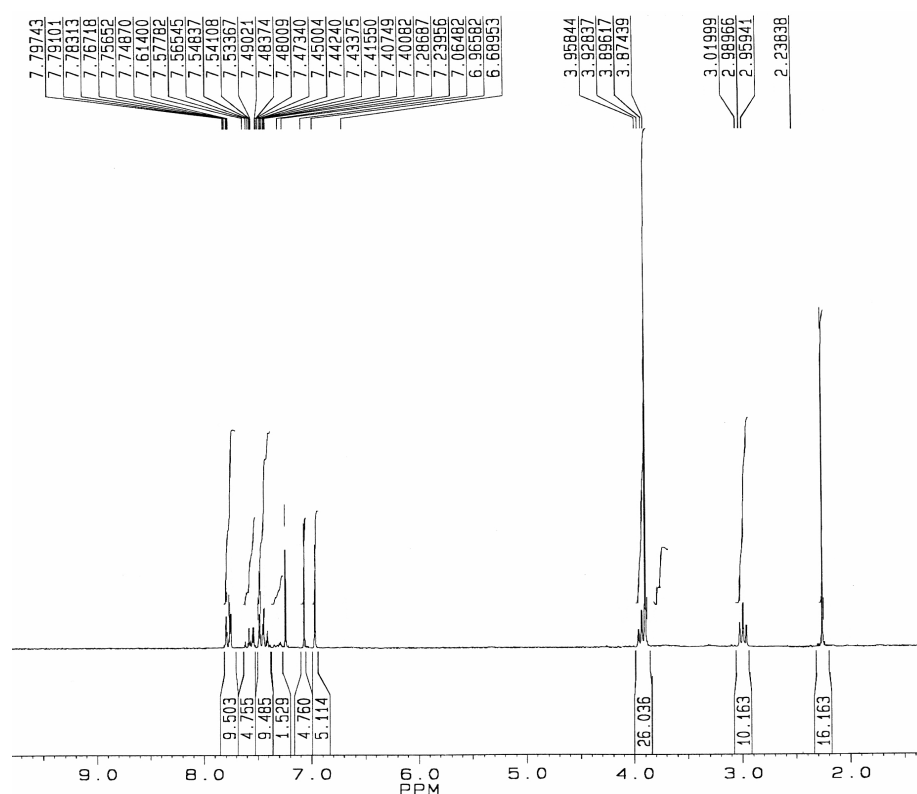


147

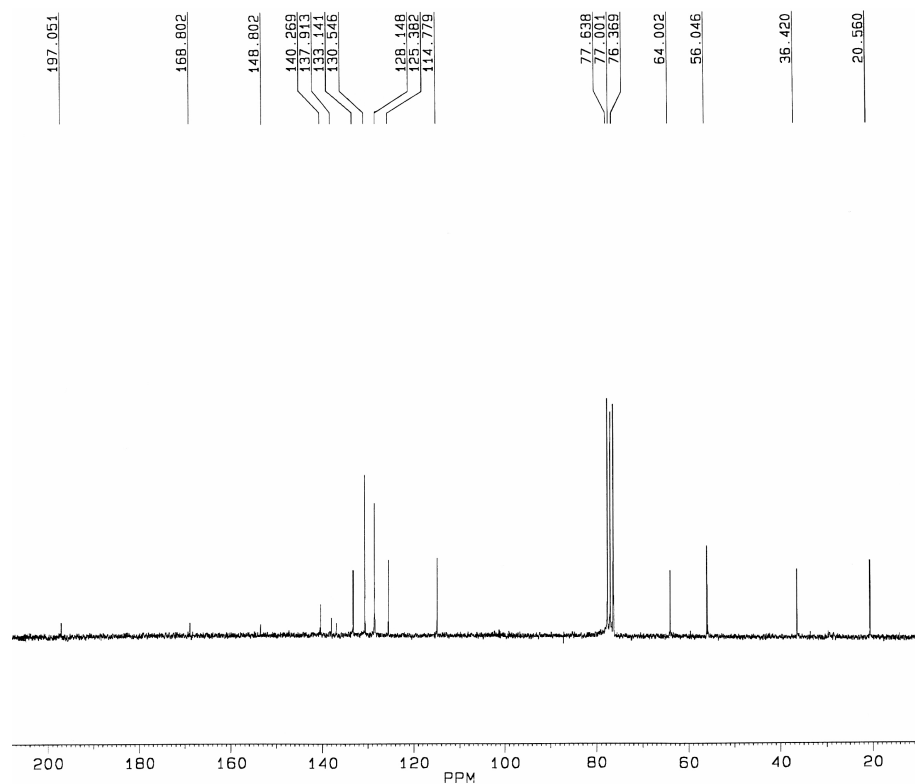


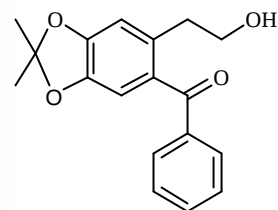
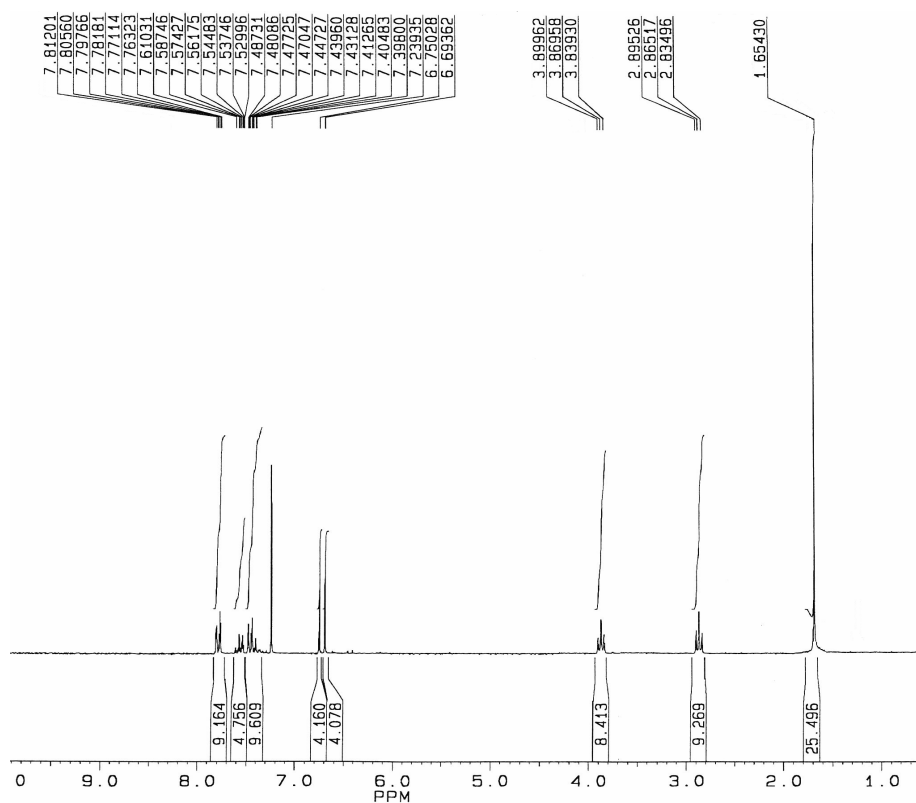




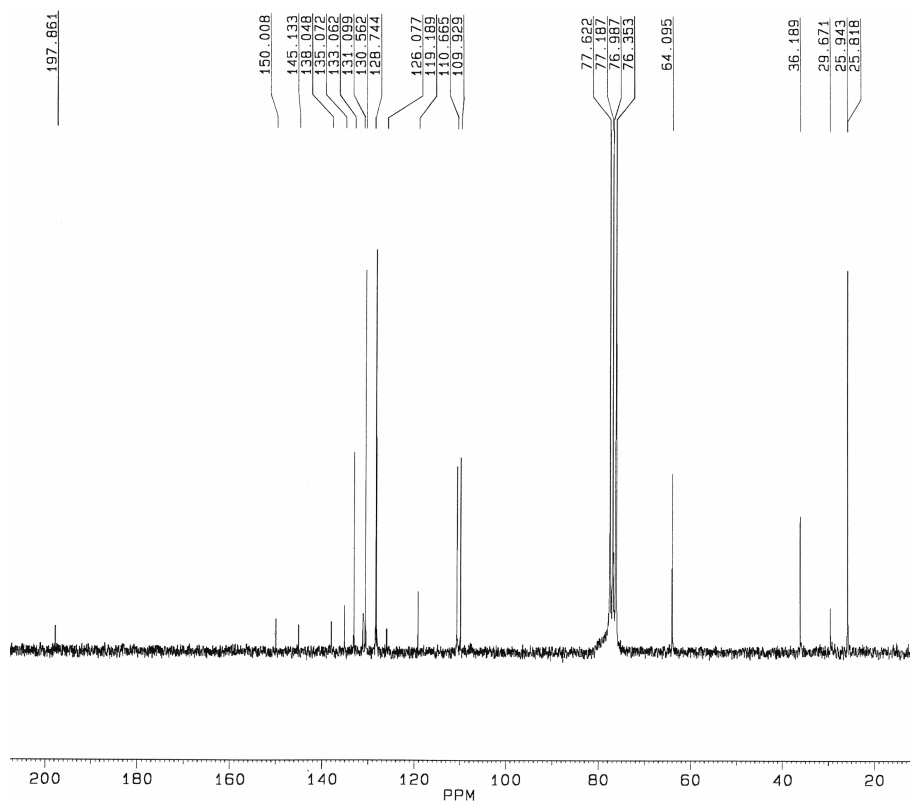


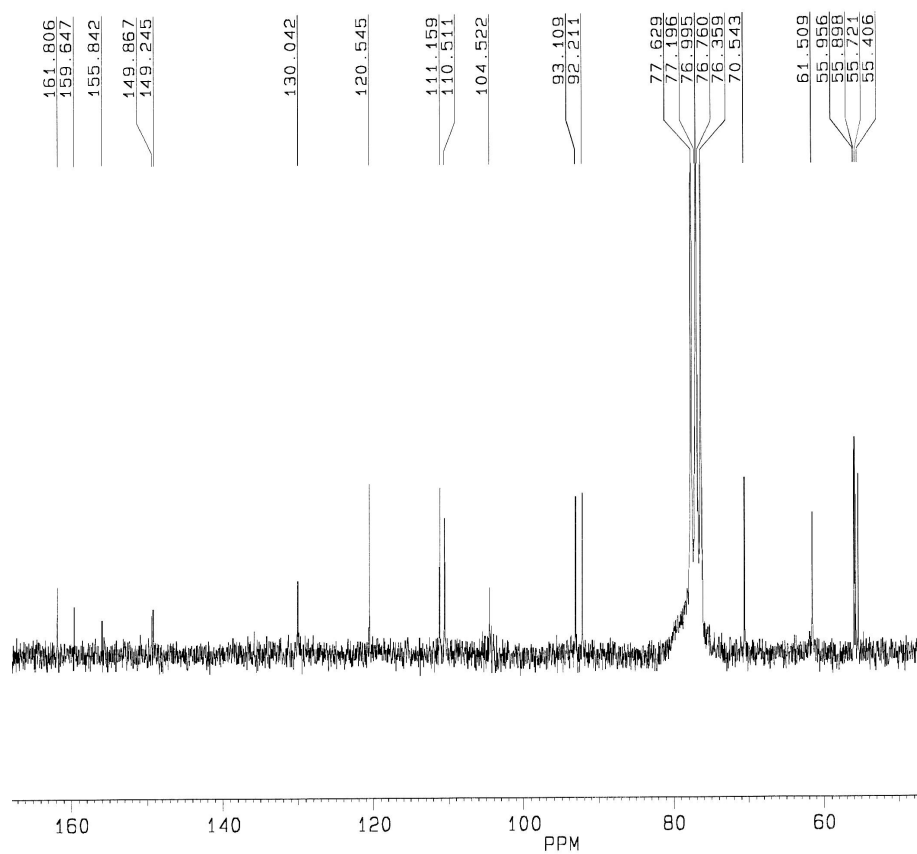
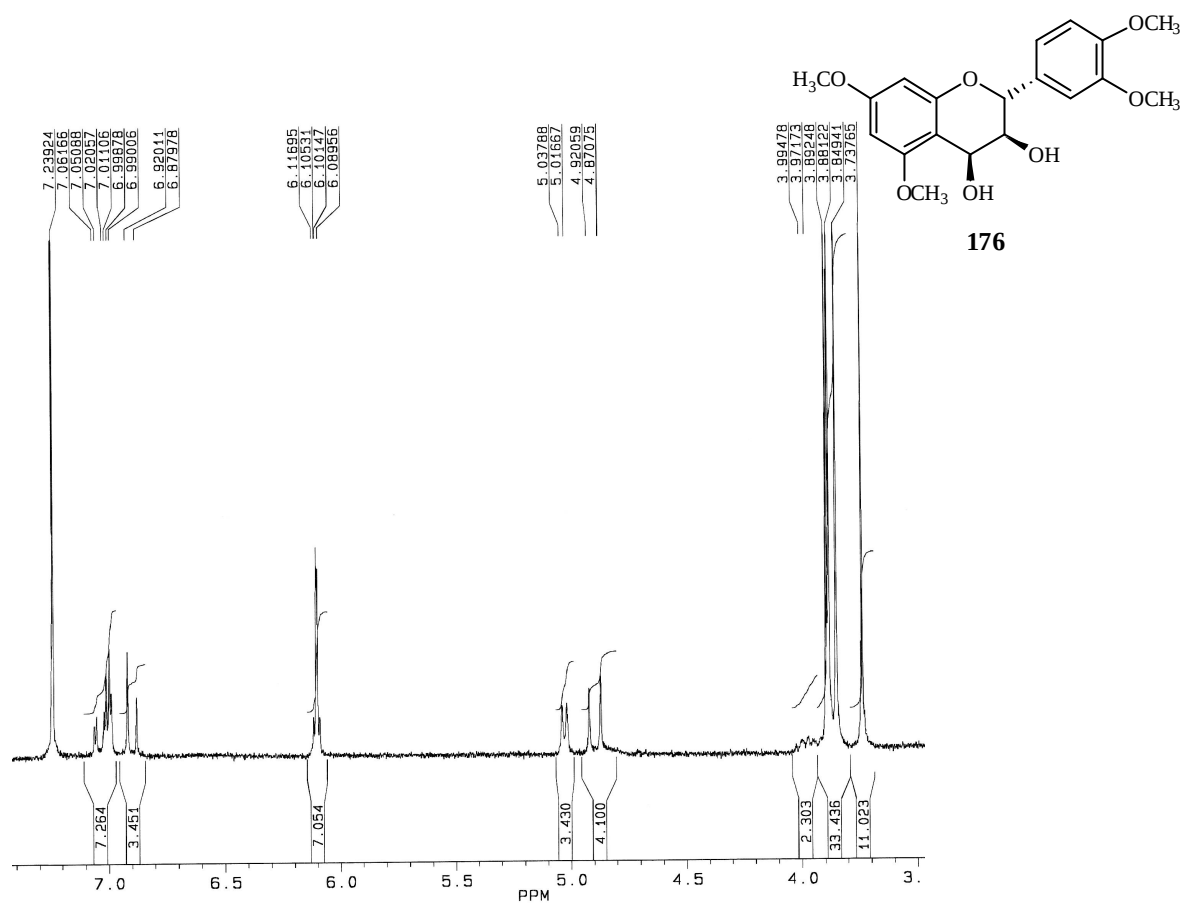
153

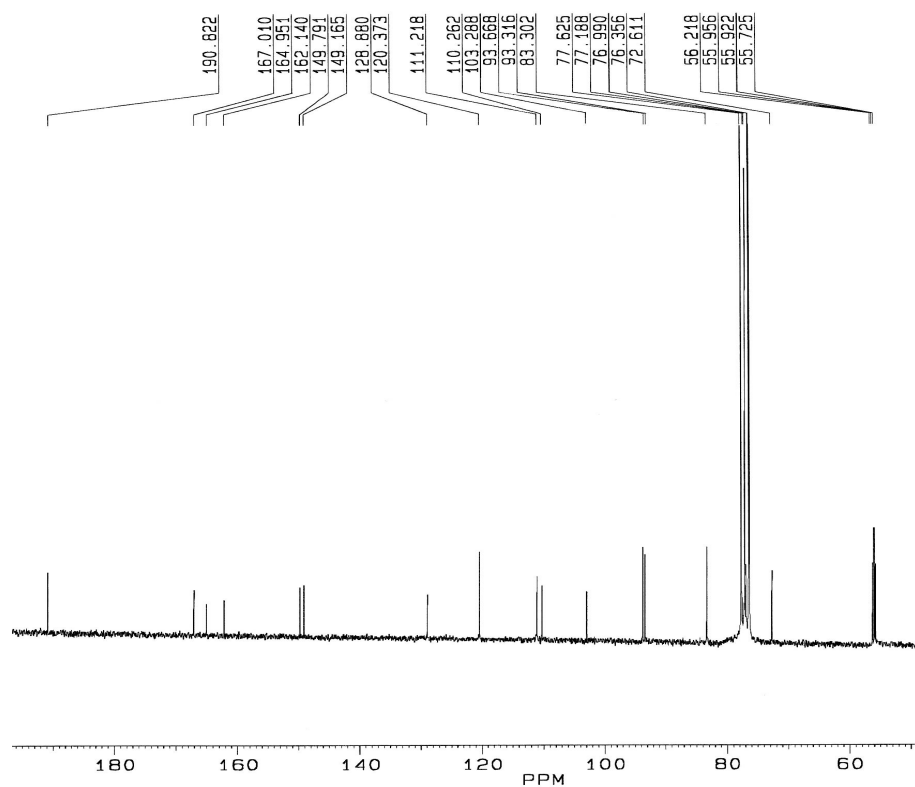
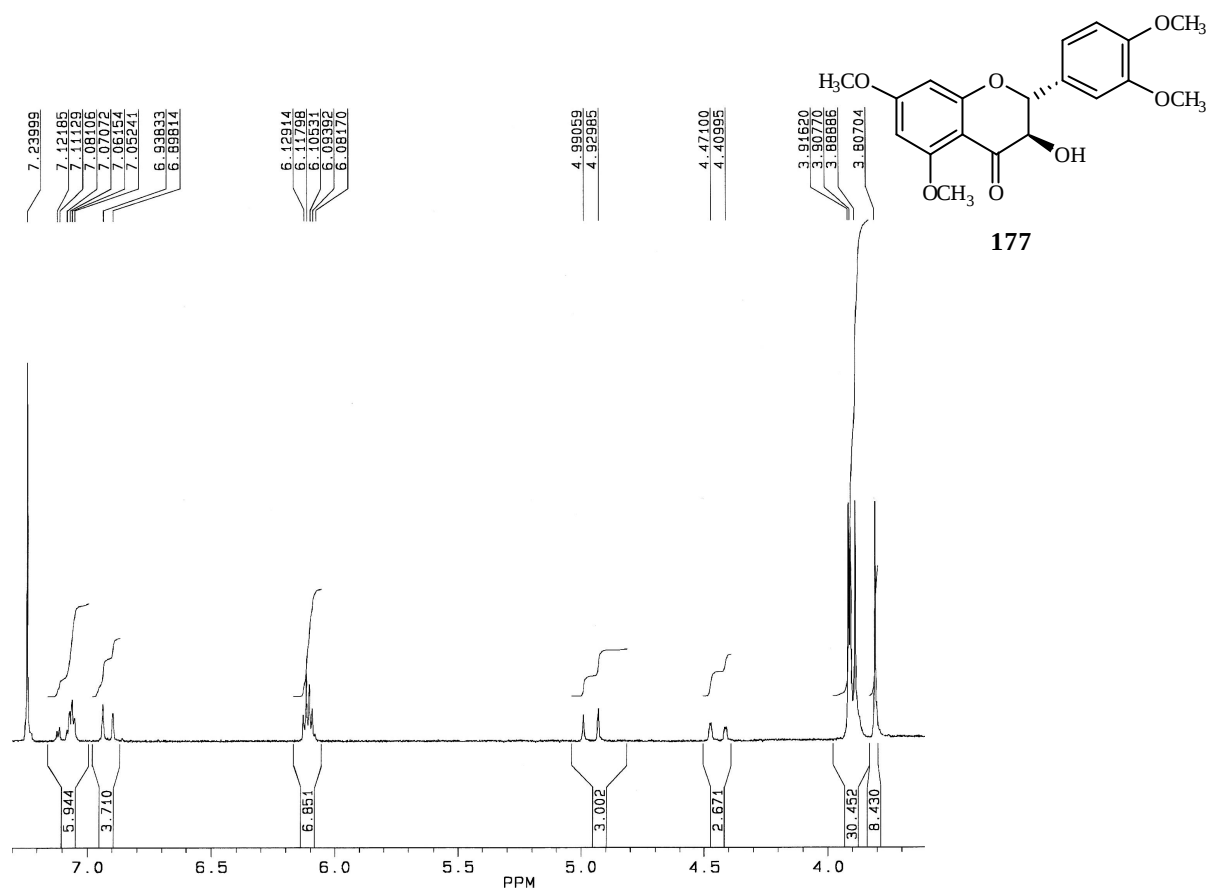


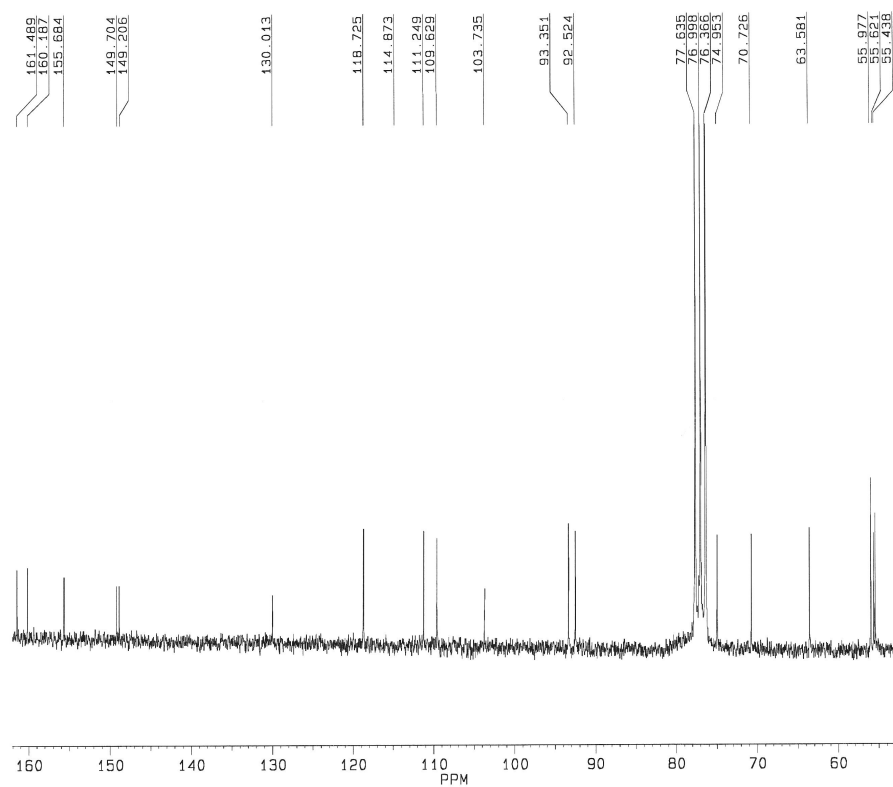
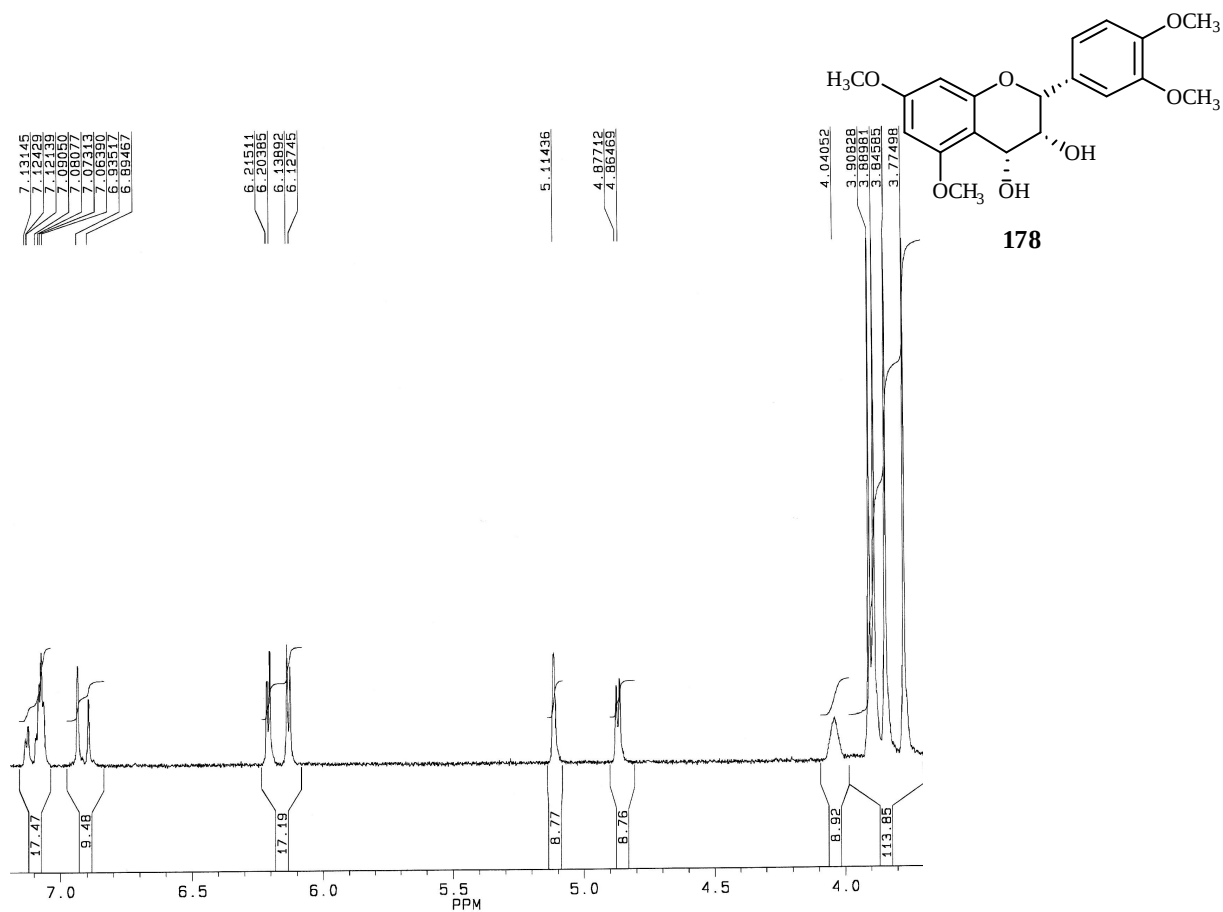


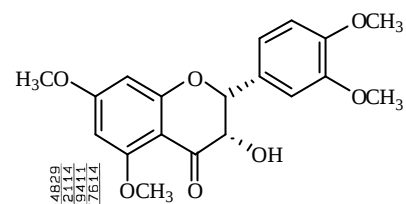
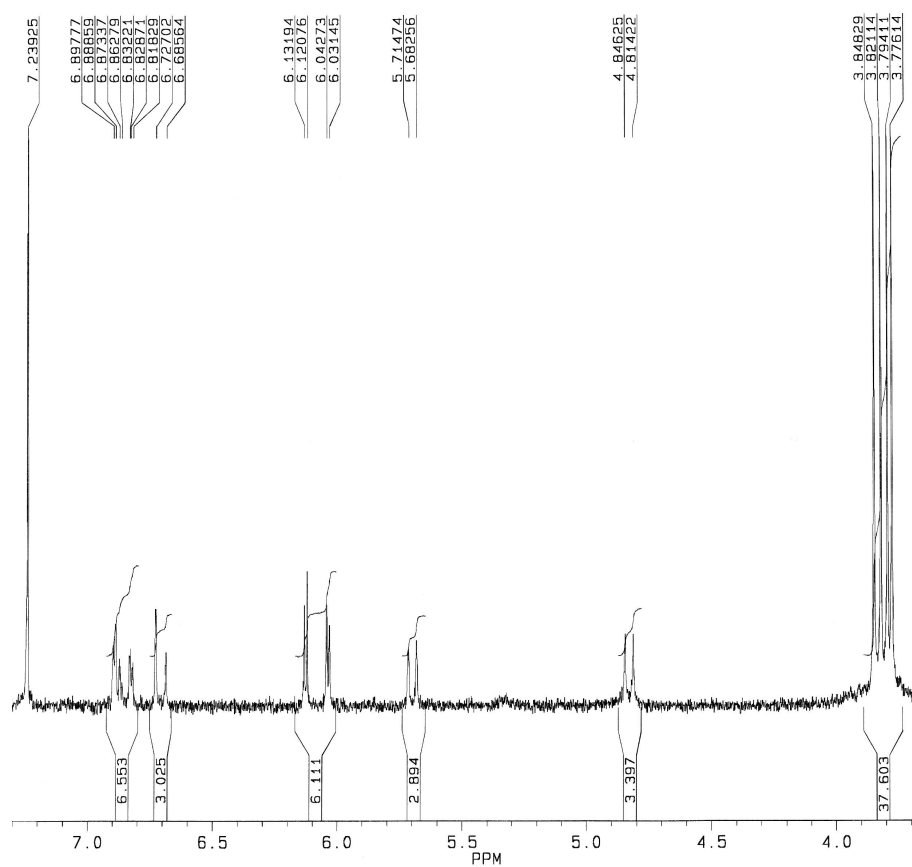
163



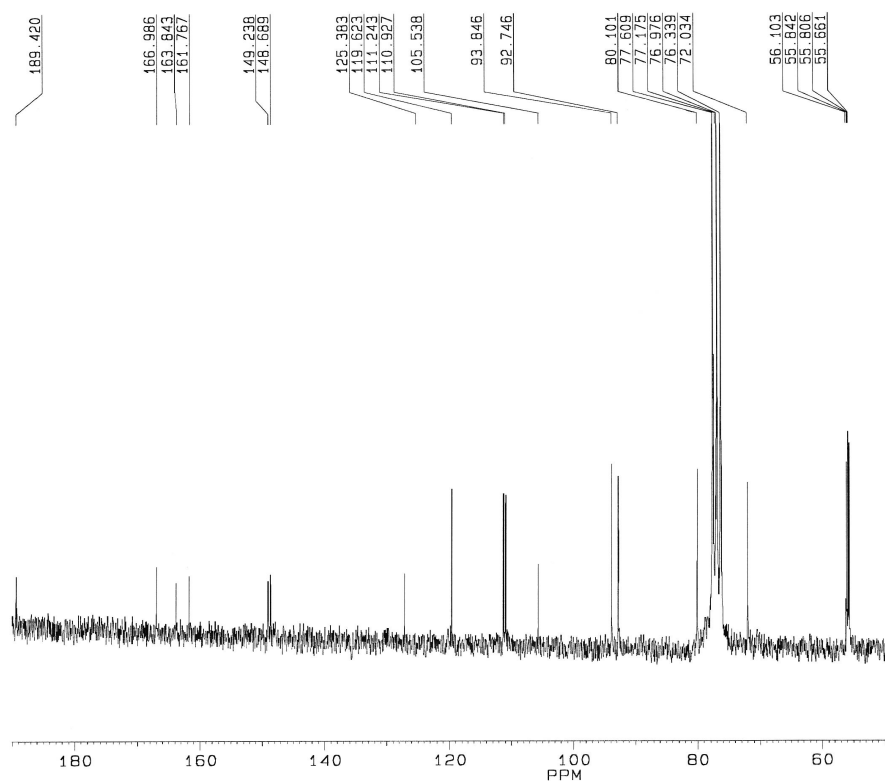








179



7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Hanson, J. R. *Natural Products: The Secondary Metabolites* **2003**.
- ² Dewick, P., M. *Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*, Piccin **2001**.
- ³ Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727-747.
- ⁴ Ramos, S. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, 18, 427-442.
- ⁵ Shahidi, F.; Naczk, M. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*, Lancaster **1995**.
- ⁶ Tomas-Barberan, F. M.; Clifford, M., N. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1024-32.
- ⁷ Clifford, M. N.; Scalbert, A. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 118-1125.
- ⁸ Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G. F.; Morozzi, G. *J. Chromatogr. A* **2004**, 113, 1054.
- ⁹ a) Hernanz, D.; Nunez, V.; Sancho, A. I.; Faulds, C. B.; Williamson, G.; Bartolome, B.; Gomez-Cordoves, C. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4884. b) Bartolome, B.; Gomez-Cordoves, C. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 435.
- ¹⁰ Kim, K.-H.; Tsao, R.; Yang, R.; Cui, S. W. *Food Chem.* **2006**, 95, 466.
- ¹¹ Pedrosa, M. M.; Muzquiz, M.; Garcia-Vallejo, C.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Ayet, G.; Robredo, L. M. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 459.
- ¹² Vuorela, S.; Meyer, A. S.; Heinonen, M. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 8202.
- ¹³ Clifford, M. N. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 362-372.
- ¹⁴ Adlercreutz, H.; Mazur, W. *Ann. Med.* **1997**, 29, 95-120.
- ¹⁵ Soleas, J. G.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. *Clin. Biochem.* **1997**, 30(2), 91-113.
- ¹⁶ King, R. E.; Bomser, J. A.; Min, D. B. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **2006**, 5, 65-70.
- ¹⁷ Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Trends plant sci. (reviews)* **1997**, 2 (4), 152-159.
- ¹⁸ Saraf, S.; Ashawat, M. S.; Saraf, S. *Pharmacognosy Reviews* **2007**, 1(1), 30-40.
- ¹⁹ Tomás-Barberán, F. A.; Clifford, M. N. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1073-1080.
- ²⁰ Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gòmez-Caravasca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. *Molecules* **2007**, 12, 1679-1719.
- ²¹ Bianco, A.; Coccioli, F.; Marra, C. *Food Chem.* **2001**, 77, 405-411.
- ²² Peng, J.; Lu, F.; Ralph, J. *Phytochemistry* **1999**, 50, 659-666.
- ²³ Cowan, M. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 564.
- ²⁴ Grassi, G.; Bridwater, A.V. *Biomass for energy and environmental, agriculture and industry in Europe* **1990**.
- ²⁵ Vassilev, N.; Fenice, M.; Federici, F.; Azcon, R. *Proc. Biochem.* **1997**, 32, 617.
- ²⁶ Petruccioli, G. *Agricoltura ed innovazione* **1989**, 11, 60.
- ²⁷ Sayadi, S.; Ellouz, R. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 1098.
- ²⁸ Amat di San Filippo, P.; Rinaldi, A.; Sanjust di Teulada, E.; Satta, G.; Viola, A. *Riv. Merceol.* **1986**, 25, 183.
- ²⁹ a) Sanjust, E.; Pompei, R.; Rescigno, A.; Rinaldi, A.; Scrugli, S.; Ballero, M. *Mic. Ital.* **1994**, 2, 119. b) Raglione, M.; Bianchi, A. A.; De Simone, C.; Valeriani, V.; Campanelli, G.; Guiducci, M. *Agricoltura Ricerca* **1997**, 168, 31.
- ³⁰ Fki, I.; Allouche, N.; Sayadi, S. *Food Chem.* **2005**, 93, 197.
- ³¹ Bossini, A.; Di Guardo, A.; Mannini, M. *Industrie Agrarie* **1993**, 224.

- ³² a) Borja, R.; Martin, A.; Alonso, V.; Garcia, I.; Banks, C. J. *Water Res.* **1995**, *19*, 489. b) Borja, R.; Alba, J. E.; Banks, C.J. *Proc. Biochem.* **1997**, *32*, 121. c) Beccari, M.; Bonemazzi, F.; Magone, M.; Riccardi, C. *Water Res.* **1996**, *30*, 183.
- ³³ Scalbert, A.; Johnson I. T.; Saltmarsh, M. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S-217S.
- ³⁴ a) Joe, A.; Vinson, Y. H.; Su, X.; Zubik, L. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3630. b) Haslam, E. *J. Nat. Prod. Reviews* **1996**, *59*, 205. c) Kahkonen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954.
- ³⁵ Shinohara, T.; Kubodera, S.; Yanagida, F. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *90*(1), 90.
- ³⁶ Myhrstad, M. C. W.; Carlsen, H.; Nordström, O.; Blomhoff, R.; Moskaug, Ø. *Free Radical Bio. Med.* **2002**, *32*(5), 386-393.
- ³⁷ Morabito, N.; Crisafulli, A.; Vergara, C.; Gaudio, A.; Lasco, A.; Frisina, N.; D'Anna, R.; Corrado, F.; Pizzoleo, M. A.; Cincotta, M.; Altavilla, D.; Ientile, R.; Squadrito, F. *J. Bone Miner. Res.* **2002**, *17*, 1904-1912.
- ³⁸ Sang, S.; Hou, Z.; Lambert, J. D.; Yang, C. S. *Antioxid. Redox Sign.* **2005**, *7*, 1704-1714.
- ³⁹ Ramos, S. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 507-526.
- ⁴⁰ Harman, D. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry J Gerontol* **1956**, *11*(3), 298.
- ⁴¹ Boskou, D. *Trends Food Sci. Tech.* **2006**, *17*, 505-512.
- ⁴² Shahidi, F.; Nacz, M.; *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications (Loose Leaf) Technomic Publishing Co.* **1995**.
- ⁴³ Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.
- ⁴⁴ Wright, J. S.; Johnson, E. R.; Di Labio, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173-1183.
- ⁴⁵ a) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302. b) Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122-3129.
- ⁴⁶ Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 1.
- ⁴⁷ Pokorny, J. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 629-642.
- ⁴⁸ Amatori, R.; Ferrani, F.; Lucarini, M.; Pedulli, G. F.; Valgimigli, L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9295.
- ⁴⁹ Yang, D.-P.; Ji, H.-F.; Tang, G.-Y.; Ren, W.; Zhang, H.-Y. *Molecules* **2007**, *12*, 878-884.
- ⁵⁰ Comba, P.; Knoppe, S.; Martin, B.; Rajaraman, G.; Rolli, C.; Shapiro, B.; Stork, T. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 344-357.
- ⁵¹ Norena-Franco, L.; Hernandez-Perez, I.; Aguilar-Pliego, J.; Maubert-Franco, A. *Catal. Today* **2002**, *75*, 189-195.
- ⁵² Berberian, V.; Allen, C. C. R.; Sharma, N. D.; Boyd, D. R.; Hardacre, C. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 727-739.
- ⁵³ Stiborová, M.; Suchà, V.; Mikšanová, M.; Pàca Jr, M.; Pàca, J. *Gen. Physiol. Biophys.* **2003**, *22*, 167-179.
- ⁵⁴ Ullrich, R.; Hofrichter, M.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 271-293.
- ⁵⁵ a) Saladino, R.; Neri, V.; Mincione, E.; Marini, S.; Coletta, M.; Fiorucci, C.; Filippone, P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, *4*, 581-586. b) Bernini, R.; Coratti, A.; Provenzano, G.; Fabrizi, G.; Tofani, D. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1821-1825. c) Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Fabrizi, G.; Pasqualetti, M.; Tempesta, S. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7733-7737.
- ⁵⁶ a) Bernini, R.; Mincione, E.; Sanetti, A.; Mezzetti, M.; Bovicelli, P. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1087-1090.

- ⁵⁷ a) Hansen, T. V.; Skattebøl, L. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3357-3358. b) Magdziak, D.; Rodriguez, A. A.; Van De Water, R.; Pettus, T. R. R. *Org. Lett.* **2002**, 4(2), 285-288. c) Pezzella, A.; Lista, L.; Napolitano, A.; D'Ischia, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 3541-3544. d) Ozanne, A.; Pouységu, L.; Depernet, D.; François, B.; Quideau, S. *Org. Lett.* **2003**, 5(16), 2903-2906.
- ⁵⁸ Zhdankin, V. V. *Curr. Org. Synth.* **2005**, 2(1), 121-145.
- ⁵⁹ Gougoutas, V. V. *J. Cryst. Struct. Comm.* **1981**, 10, 489.
- ⁶⁰ Boeckman, R. K.; Shao, P.; Mullins, J. J. *Org. Synth.* **2000**, 77, 141.
- ⁶¹ Katritzky, A. R.; Savage, J. P.; Gallos, J. K.; Durst, H. D.; *Org. Prep. Proc. Int.* **1989**, 21, 157.
- ⁶² Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4537-4538.
- ⁶³ Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155.
- ⁶⁴ Reed, N. N.; Delgado, M.; Hereford, K.; Clapham, B.; Janda, K. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2047-2049.
- ⁶⁵ Sorg, G.; Mengel, A.; Jung, G.; Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40 (23), 4395-4397.
- ⁶⁶ a) Nicolau, K. C.; Jung, J.; Yoon, W. H.; Fong, K. C.; Choi, H.-S.; He, Y.; Zhong, Y.-L.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2183-2189. b) Nicolau, K. C.; Baran, P. S.; Zhong, Y.-L.; Fong, K. C.; Choi, H.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2190-2201.
- ⁶⁷ De Munari, S.; Frigerio, M.; Santagostino, M. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 9272-9279.
- ⁶⁸ Nicolaou, K. C.; Zhong, Y.-L.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7596-7597.
- ⁶⁹ Nicolaou, K. C.; Baran, P. S.; Zhong, Y.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3183-3185.
- ⁷⁰ Nicolaou, K. C.; Montagnon, T.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41(6), 993-996.
- ⁷¹ D'Acunzo, F.; Baiocco, P.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 4195.
- ⁷² Ncanana, S.; Baratto, L.; Roncaglia, L.; Riva, S.; Burton, S. G. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1507-1513.
- ⁷³ Yoshida, H. *J. Chem. Soc.* **1883**, 43, 472-486.
- ⁷⁴ D'Acunzo, F.; Baiocco, P.; Galli, C. *New J. Chem.* **2003**, 27, 329-332.
- ⁷⁵ Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 37663.
- ⁷⁶ Huang, H.; Zoppellaro, G.; Sakurai, T. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 32718.
- ⁷⁷ Mayer, A. M.; Staples, R. C. *Phytochemistry* **2002**, 60, 551-565.
- ⁷⁸ Riva, S. *Trends in Biotechnology* **2006**, 24, 219-226.
- ⁷⁹ Claus, H. *Micron* **2004**, 35, 93-96.
- ⁸⁰ Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Manchonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563-2605.
- ⁸¹ Pilz, R.; Scauer, F.; Kragl, U. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 60, 708-712.
- ⁸² Tranchimand, S.; Tron, T.; Gaudin, C.; Iacazio, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 42, 27-31.
- ⁸³ a) Mikolasch, A.; Hammer, E.; Jonas, U.; Popowski, K.; Stielow, A.; Schauer, F. *Tetrahedron* **2002**, 58, 7589-7593. b) Bressler, D. C.; Fedorak, P. M.; Pickard, M. A. *Biotech. Lett.* **2000**, 22, 1119-1125. c) Hublik, G.; Schinner, F. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 330-336. d) Levin, L.; Viale, A.; Forchiassin, A. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2003**, 52, 1-5. e) Fukuda, T.; Uccida, H.; Takashima, Y.; Uwajima, T.; Kawabata, T.; Suzuki, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 284, 704-706. f) Abadulla, E.; Tzanov, T.; Costa, S.; Robra, K. H.; Cavaco, P. A.; Guebitz, G. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 3357-3362. g) Fakoussa, R. M.; Frost, P. J.

- Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 60-65. h) Maceiras, R.; Rodriguez, C. S.; Sanroman, A. *Acta Biotechnol.* **2001**, 21, 255-264. i) Raghukumar, C. *Mycol. Res.* **2000**, 104, 1222-1226.
- ⁸⁴ Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J. F. D.; Eriksson, K. E. L. *FEBS Lett.* **1996**, 391, 144.
- ⁸⁵ Galli, C.; Gentili, P. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 973-977.
- ⁸⁶ Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. *J. Mol. Catal. B: Enzymol.* **2002**, 16, 231-234.
- ⁸⁷ a) Majcherczyk, A.; Johannes, C.; Hüttermann, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 51, 267. b) Muheim, A.; Fiechter, A.; Harvey, P. J.; Schoemaker, H. E. *Holzforschung* **1992**, 46, 121. c) Bourbonnais, R.; Leech, D.; Paice, M. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1379, 381.
- ⁸⁸ a) Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bodie, E.; Borneman, S.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 4627-4632. b) Crestini, C.; Argyropoulos, D. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 2161-2167.
- ⁸⁹ Baiocco, P.; Barreca, A. M.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 191.
- ⁹⁰ Cantarella, G.; Galli, C.; Gentili, P. *New J. Chem.* **2004**, 28, 366-372.
- ⁹¹ Call, H. P.; Mücke, I.; *J. Biotechnol.* **1997**, 53, 163.
- ⁹² Astolfi, P.; Brandi, P.; Galli, C.; Gentili, P. *New J. Chem.* **2005**, 29, 1-10.
- ⁹³ Walle, T.; Ta, N.; Kawamori, T.; Wen, X.; Tsuji, P. A.; Walle, U. K. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 73, 1288-1296.
- ⁹⁴ Wen, X.; Walle, T. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34, 1786-1792.
- ⁹⁵ Tsuji, P. A.; Walle, T. *Carcinogenesis* **2006**, 27(8), 1579-1585.
- ⁹⁶ Walle, T.; *Seminars in Cancer Biology* **2007**, 17, 354-362.
- ⁹⁷ Parmar, V. S.; Jain, R.; Sharma, S. K.; Vardhan, A.; Jha, A.; Taneja, P.; Singh, S.; Vyncke, B. M.; Bracke, M. E.; Mareel, M. M. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83(9), 1217-1221.
- ⁹⁸ Tomas-Barberan, F. A.; Msonthi, J. D.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1988**, 27(3), 753-755.
- ⁹⁹ Kim, N. Y.; Kim, J. H.; Lee, Y. H.; Lee, E. J.; Kim, J.; Lim, Y.; Chong, Y.; Ahn, J.-H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 17(12), 1991-1995.
- ¹⁰⁰ Yu, J.; Smith, G.; Gross, H. B.; Hansen, R. J.; Levenberg, J.; Walzem, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8403-8408.
- ¹⁰¹ Kim, J.; Park, K.-S.; Lee, C.; Chong, Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, 28(12), 2527-2530.
- ¹⁰² Zheng, X.; Meng, W.-D.; Xu, Y.-Y.; Cao, J.-G.; Qing, F.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 881-884.
- ¹⁰³ a) Romano, U.; Rivetti, F.; Di Muzio, N. *U.S. Patent* 4,318,862,1981, C.A. 80141 **1979**. (b) Delledonne, D.; Rivetti, F.; Romano, U. *J. Organomet. Chem.* **1995**, 448, 15.
- ¹⁰⁴ Tundo P.; Perosa, A. *The chemical record* **2002**, 2, 13-23.
- ¹⁰⁵ a) Tundo, P.; Memoli, S.; Hérault, D.; Hill, K. *Green Chem.* **2004**, 6, 609-612. b) Selva, M.; Tundo, P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 8139-8144. c) Tundo, P. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72(9), 1793-1797. d) Bomben, A.; Selva, M.; Tundo, P. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, 38, 2075-2079.
- ¹⁰⁶ Perosa, A.; Selva, M.; Tundo, P.; Zordan, F. *Synlett* **2000**, 272-274.
- ¹⁰⁷ Shieh, Wen-Chung, Dell, S.; Repic, O. *Org. Lett.* **2001**, 3(26), 4279-4281.
- ¹⁰⁸ Shieh, W.-C.; Dell, S.; Repic, O. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2188-2191.
- ¹⁰⁹ a) Bernini, R.; Mincione, E.; Sanetti, A.; Bovicelli, P.; Lupattelli, P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(26), 4651-4654. b) Bernini, R.; Mincione, E.; Cortese, M.; Aliotta, G.; Oliva, A.; Saladino, R.; *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42

- (32), 5401-5404. c) Bovicelli, P.; Bernini, R.; Antonioletti, R.; Mincione, E.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5563-5567. d) Bernini, R.; Mincione, E.; Cortese, M.; Saladino, R.; Gualandi, G.; Belfiore, M. C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4823-4825. e) Bernini, R.; Mincione, E.; Coratti, A.; Fabrizi, G.; Battistuzzi, G.; *Tetrahedron* **2004**, *60* (4), 967-971. f) Bernini, R.; Mincione, E.; Provenzano, G.; Fabrizi, G. *Tetrahedron* **2005**, *46*, 2993-2996. g) Bernini, R.; Mincione, E.; Provenzano, G.; Fabrizi, G.; Tempesta, S.; Pasqualetti, M.; *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7561-7566.
- ¹¹⁰ Briot, A.; Baehr, C.; Brouillard, R.; Wagner, A.; Mioskowski, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 965-967.
- ¹¹¹ Pathak, T.; Waldmann, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*(1), 112-120.
- ¹¹² Jarowicki, K.; Kocienski, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *1*, 1589-1615.
- ¹¹³ a) Torregiani, E.; Seu, G.; Minassi, A.; Appendino, G. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2193.
- ¹¹⁴ Nahmany, M.; Melman, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1563-1572.
- ¹¹⁵ Parrish, J. P.; Salvatore, R. N.; Jung, K. W. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8207-8237.
- ¹¹⁶ Tundo, P.; Trotta, F.; Moraglio, G.; Logorati, F.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **1988**, *27*, 1565.
- ¹¹⁷ Tundo, P.; Rossi, L.; Loris, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2219-2224.
- ¹¹⁸ Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. **15/03/2007**, MI2007A000519.
- ¹¹⁹ Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. **31/05/2007**, MI2007A001110.
- ¹²⁰ Bernini, R.; Mincione, E.; Crisante, F.; Barontini, M.; Fabrizi G.; Gentili, P., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7000.
- ¹²¹ Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F. 2008 PCT/IB2008/000598.
- ¹²² Shaikh, A.-A. G.; Sivaram, S. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 951-976.
- ¹²³ Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 25.
- ¹²⁴ Bernini, R.; Cacchi, S.; Fabrizi, G.; Filisti, E. *Org. Lett.* **2008**, *16*, 3457-3460.
- ¹²⁵ Botta, M.; Quici, S.; Pozzi, G.; Marzanni, G.; Pagliarin, R.; Barra, S.; Geninatti Crich, S. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 570-577.
- ¹²⁶ Kobata, K.; Kawaguchi, M.; Watanabe, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*(2), 319-327.
- ¹²⁷ Lambusta, D.; Nicolosi, G.; Patti, A.; Sanfilippo, C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *22*, 271-277.
- ¹²⁸ Nicolosi, G.; Spatafora, C.; Tringali, C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *16*, 223-229.
- ¹²⁹ Chandra, K. L.; Saravanan, P.; Singh, R. K.; Singh, V. K. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 1369-1374.
- ¹³⁰ Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, A.; Bianchi, F.; Tron, G. C. *Org. Lett.* **2002**, *4*(22), 3839-3841.
- ¹³¹ Ishihara, K.; Kubota, M.; Kurihara, H.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4413-4414.
- ¹³² Dalpozzo, R.; De Nino, A.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Nardi, M.; Bartoli, G.; Romeo, R. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 5621-5624.
- ¹³³ Kanta De, S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2919-2922.
- ¹³⁴ M. H. Gordon, F. Paiva-Martins, and M. Almeida *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2480.
- ¹³⁵ Alcudia, F.; Cert, R.; Espartero, L. J.; Mateos, R.; Trujillo Perez-Lanzac, M. 2004, WO 2004/005237.
- ¹³⁶ Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes De Teran, L.; Espartero, J. L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcudia, F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779.
- ¹³⁷ Pignataro, B.; Sardone, L.; Marletta, G. *Langmuir* **2003**, *19*, 5912-5917.

- ¹³⁸ a) Ragazzi; Veronese *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1973**, 50, 443. b) Chimi, H.; Cillard, J.; Cillard, P.; Rahmani, M. *JAOCs* **1991**, 68, 5. c) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 1571. d) Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Konstantinou, P.; Di Giacini, L. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1802.
- ¹³⁹ a) Vazquez, R. A.; Maestro, D. R.; Graciani, C. E.; *Grasas Aceites* **1974**, 25, 341. b) Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A.; Scognamiglio, F. *Phytochemistry* **1992**, 12, 4125.
- ¹⁴⁰ Briante, R.; La Cara, F.; Febbraio, F.; Patumi, M.; Nucci, R. *J. Biotechnol.* **2002**, 93, 109-119.
- ¹⁴¹ Ryan, D.; Robards, K. *Analyst* **1998**, 123, 31R-44R.
- ¹⁴² Di Tommaso, D.; Calabrese, R.; Rotilio, D. *J. High Resol. Chromatogr.* **2006**, 21, 549-553.
- ¹⁴³ a) Owen, R. W.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Hull, E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. *Eur. J. Cancer Prev.* **2004**, 13(4), 319. b) D'Angelo, S.; Ingrosso, D.; Migliardi, V.; Sorrentino, A.; Donnarumma, G.; Baroni, A.; Masella, L.; Tufano, M. A.; Zappia, M.; Galletti, P.; *Free Radical Bio. Med.* **2005**, 38, 908.
- ¹⁴⁴ Lopez-Huertas, L. E.; Geerlings, A.; Morales Sanchez, J. C.; Boza Puerta, J. *PCT WO 03/082798*, **2003**.
- ¹⁴⁵ Petroni, A.; Balsevich, M.; Salami, M.; Papini, N.; Montedoro, G. F.; Galli, C. *Thromb. Res.*, **1995**, 78, 151-160.
- ¹⁴⁶ a) Assmann, G.; DeBasker, G.; Bagnara, S.; *Europ. J. Cancer Prev.* **1997**, 6, 418. b) Gonzalez, M.; Zarzuelo, A.; Gamez, M. J.; Utrilla, M. P.; Jimenez, J.; Osuna I. *Planta Med.* **1992**, 58(6), 513. c) Cherif, S.; Rahal, N.; Haouala, M.; Hizaoui, B.; Dargouth, F.; Gueddiche, M.; Kallel, Z.; Balansard, G.; Boukef, K. *J. Pharm. Belg.* **1996**, 51(2), 69.
- ¹⁴⁷ a) Aziz, N. H.; Farag, S. E.; Mousa, L. A.; Abo-Zaid, M. A. *Microbios.* **1998**; 93(374), 43. b) Fleming, H. P.; Walter, W. M. Jr.; Etchells, J. L. *Appl. Microbiol.* **1973**, 26(5), 777.
- ¹⁴⁸ Fabiani, R.; De Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servili, M.; Montedoro, G. F.; Morozzi, G. *Eur. J. Cancer Prev.* **2002**, 11(4), 351.
- ¹⁴⁹ a) Yoshihiro, C.; Hiroshi, A.; Akira, Y.; Seika, K.; Kazuhiro, Y.; Kazue, D. *JP2004028636*, **2004**.
- ¹⁵⁰ Crea, R. US00616547, **2000**, 1.
- ¹⁵¹ Capasso, R.; Evidente, A.; Visca, C.; Gianfreda, L.; Maremonti, M.; Greco, G. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, 60, 365.
- ¹⁵² Montedoro, G. F.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 1571.
- ¹⁵³ a) Vazquez, R. A.; Maestro, D. R.; Graciani, C. E.; *Grasas Aceites* **1974**, 25, 341. b) Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A.; Scognamiglio, F. *Phytochemistry* **1992**, 12, 4125.
- ¹⁵⁴ a) Ragazzi; Veronese *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1973**, 50, 443. b) Capasso, R.; Evidente, A.; Visca, C. *Agrochimica* **1994**, 38, 165. c) Capasso, R.; Evidente, A.; Avolio, S.; Solla, F. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1745. d) Visioli; Galli *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4292. e) Allouche, N.; Fki, I.; Sayadi, S. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 267. f) Villanova, L.; Villanova, L.; Fastello, G.; Merendino, A.; Lachifarma S.r.l. **2006**, EP1623960.
- ¹⁵⁵ Schopf, C.; Gottmann, G.; Meisel, E. M.; Neuroth, L. *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 86.
- ¹⁵⁶ Baraldi, P. G.; Simoni, D.; Manfredini, F.; Menziani, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 684.
- ¹⁵⁷ Verhe, R.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols* **1992**, 16, 237.
- ¹⁵⁸ Kellie, L.; Tuck, Hai-Wei, T.; Hayball, P. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 4087.
- ¹⁵⁹ Garcia, P.; Romero, C.; Brenes, M.; Garrido, A. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2101.

-
- ¹⁶⁰ Gambacorta, A.; Tofani, D.; Bernini, R.; Migliorini, A. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3386.
- ¹⁶¹ Espin, J.C.; Soler-Rivas, C.; Cantos, E.; Tomas-Barberan, F. A.; Wichers, H. J. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1187.
- ¹⁶² Bovicelli, P.; Antonioletti, R.; Mancini, S.; Causio, S.; Borioni, G.; Ammendola, S.; Barontini, M. *Synthetic Commun.* **2007**, *37*(23).
- ¹⁶³ Sorg, G.; Mengel, A.; Jung, G.; Rademann, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(23), 4395-4397.
- ¹⁶⁴ Wieder, T.; Prokop, A.; Bagci, B.; Bernicke, D.; Schulze-Osthoff, K.; Dörken, B.; Schmalz, H.-G.; Daniel, P. T.; Henze, G. *Leukemia* **2001**, *15*, 1735-1742.
- ¹⁶⁵ Lin, L.-L.; Lien, C.-Y.; Cheng, Y.-C.; Ku, K.-L. *Journal of Chromatography B* **2007**, *853*, 175-182.
- ¹⁶⁶ Rimando, A. M.; Kalt, W.; Magee, J. B.; Dewey, J.; Ballington, J. R. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4713-4719.
- ¹⁶⁷ Wolter, F.; Clausnitzer, A.; Akoglu, B.; Stein, J. *J. Nutr.* **2002**, 298-302.
- ¹⁶⁸ Lameira, J.; Alves, C. N.; Moliner, V.; Silla, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 616-623.
- ¹⁶⁹ Zhang, S.; Yang, X.; Coburn, R. A.; Morris, M. E. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 627-639.
- ¹⁷⁰ Seyoum, A.; Asres, K.; El-Fiky, F. K. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2058-2070.
- ¹⁷¹ Xu, Y. C.; Leung, S. W. S.; Yeung, D. K. Y.; Hu, L. H.; Chen, G. H.; Che, C. M.; Man, R. Y. K. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1179-1188.
- ¹⁷² Plochmann, K.; Korte, G.; Koutsilieri, E.; Richling, E.; Riederer, P.; Rethwilm, A.; Schreier, P.; Scheller, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *460*, 1-9.
- ¹⁷³ Lee, H. H.; Tan, C. H. *J. Chem. Soc.* **1965**, 2743.
- ¹⁷⁴ Bose, P. K.; Chakrabarti, P.; Sanyal, A. K. *J. Indian Chem. Soc.* **1971**, *48*, 1163.
- ¹⁷⁵ De la Torre, M. D. L.; Marcorin, G. L.; Pirri, G.; Tomé, A. C.; Silva, A. M. S.; Cavaleira, J. A. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1689-1691.
- ¹⁷⁶ Wallén, E. A. A.; Dahlén, K.; Grøtli, M.; Luthman, K. *Org. Lett.* **2007**, *9*(3), 389-391.
- ¹⁷⁷ Li, S.; Pan, M.-H.; Lai, C.-S.; Lo, C.-Y.; Dushenkov, S.; Ho, C.-T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3381-3389.
- ¹⁷⁸ Hans, N.; Grover, S. K. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1021-1023.
- ¹⁷⁹ Mallik, U. K.; Saha, M. M.; Mallik, A. K. *Indian J. Chem.* **1989**, *28B*, 970.
- ¹⁸⁰ Gobbi, S.; Rampa, A.; Bisi, A.; Belluti, F.; Piazzzi, L.; Valent, P.; Caputo, A.; Zampiron, A.; Carrara, M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3662-3760.
- ¹⁸¹ Zwaagstra, M. E.; Timmerman, H.; van de Stolpe, A. C.; de Kanter, F. J. J.; Tamura, M.; Wada, Y.; Zhang, M.-Q. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1428-1438.
- ¹⁸² Akama, T.; Shida, Y.; Sugaya, T.; Ishida, H.; Gomi, K.; Kasai, M. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3461-3469.
- ¹⁸³ Pfister, J. R.; Wymann, W. E.; Schuler, M. E.; Roszkowski, A. P. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 335-338.
- ¹⁸⁴ Jung, S.-H.; Cho, S.-H.; Dang, T. H.; Lee, J.-H.; Ju, J.-H.; Kim, M.-K.; Lee, S.-H.; Ryu, J.-C.; Kim, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 537-545.
- ¹⁸⁵ Ahmed, N.; Ali, H.; van Lier, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 253-256.
- ¹⁸⁶ Zhou, Z.; Peiliang, Z.; Huang, W.; Yang, G. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 63-67.
- ¹⁸⁷ Kostrzewa-Suslow, E.; Dmochowska-Gładysz, J.; Bialonska, A.; Ciunik, Z.; Rymowicz, W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 18-23.

-
- ¹⁸⁸ Lorenz, P.; Zeh, M.; Martens-Lobenhoffer, J.; Schmidt, H.; Wolf, G.; Horn, F. W. *Free Radical Res.* **2005**, 39(5), 535-545.
- ¹⁸⁹ Togna, G. I.; Togna, A. R.; Franconi, M.; Marra, C.; Guiso, M. *J. Nutr.* **2003**, 133(8), 2532-2536.
- ¹⁹⁰ Ramana, C. V.; Suryawanshi, S. B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 445-448.
- ¹⁹¹ Bianchi, D. A.; Rúa, F.; Kaufman, T. S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 411-415.
- ¹⁹² Lorenz, P. *DE102005221* **2007**.
- ¹⁹³ Elger, B.; Huth, A.; Neuhaus, R.; Ottow, E.; Schneider, H.; Seilheimer, B.; Turski, L. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4618-4627.
- ¹⁹⁴ Micale, N.; Zappalà, M.; Grasso, S. *Il Farmaco* **2003**, 58, 351-355.
- ¹⁹⁵ Suzuki, T.; Tanemura, K.; Horaguchi, T.; Kaneko, K. *Tetrahedron* **2006**, 62, 3739-3751.
- ¹⁹⁶ Guiso, M.; Marra, C.; Cavarischia, C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6531-6534.
- ¹⁹⁷ Saito, A.; Takayama, M.; Yamazaki, A.; Numaguchi, J.; Hanzawa, Y. *Tetrahedron* **2007**, 63, 4039-4047.
- ¹⁹⁸ Elger, B.; Huth, A.; Neuhaus, R.; Ottow, E.; Schneider, H.; Seilheimer, B.; Turski, L. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4618-4627.
- ¹⁹⁹ Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Crescenzi, B.; Sanetti, A.; Bernini, R. *Tetrahedron* **1999**, 55, 14719-14728.
- ²⁰⁰ Cantarella, G.; d'Acunzo, F.; Galli, C. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 82(4), 395-398.
- ²⁰¹ Yee, Y.-K.; Koo, M. W.-L. *Aliment. Pharm. Therap.* **2000**, 14, 635-638.
- ²⁰² Kurisawa, M.; Chung, J. E.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *Macromol. Biosci.* **2003**, 3, 758-764.
- ²⁰³ Shibuya, H.; Agusta, A.; Ohashi, K.; Maehara, S.; Simanjuntak, P. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 866-867.
- ²⁰⁴ Agusta, A.; Maehara, S.; Ohashi, K.; Simanjuntak, P.; Shibuya, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 1565-1569.
- ²⁰⁵ Turnbull, J. J.; Nagle, M. J.; Seibel, J. F.; welford, R. W. D.; Grant, G. H.; Schofield, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3853-3857.
- ²⁰⁶ Saito, A.; Nakajima, N.; Tanaka, A.; Ubukata, M. *Tetrahedron* **2002**, 58, 7829-7837.
- ²⁰⁷ Tukavkina, N. A.; Rulenko, I. A.; Kolesnik, Y. A. *Voprosy Pitaniya* **1996**, 33.
- ²⁰⁸ Teselkin, Y. O.; Zhambalova, B. A.; Babenkova, I. V.; Klebanov, G. I.; Tukavkina, N. A. *Biophysics* **1996**, 41, 620.
- ²⁰⁹ a) Habtemariam, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 775-778. b) Chu, S. C.; Hsieh, Y. S.; Lin, J. Y. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 179-183. c) Kandaswami, C.; Perkins, E.; Drzewiecki, G.; Soloniuk, D. S.; Middleton, E. J. *Anticancer Drugs* **1992**, 3, 525-530. d) Devi, M. A.; Das, N. P. *Cancer Lett.* **1993**, 69, 191-196.
- ²¹⁰ Huang, M. T.; Wood, A. W.; Newmark, H. L.; Sayer, J. M.; Yagi, H.; Jerina, D. M.; Conney, A. H. *Carcinogenesis* **1983**, 4, 1631-1637.
- ²¹¹ Biziagos, E.; Crance, J. M.; Passagot, J.; Deloince, R. *J. Med. Virol.* **1987**, 22, 57-66.
- ²¹² Bronner, C.; Landry, Y. *Agents Actions* **1985**, 16, 147-151.
- ²¹³ Matsuda, M.; Otsuka, Y.; Jin, S.; Wasaki, J.; Watanabe, J.; Watanabe, T.; Osaki, M. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2008**, 366, 414-419.