

***“Identification of polyphenols in grape pomace and newsynthetic approaches to 2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofurans, useful active ingredients against degenerative diseases”***

Teresa LAURITA

*Dipartimento di Chimica e Biologia, Università di Salerno*

Il progetto di dottorato si articola in due studi principali, il primo relativo all'identificazione dei polifenoli nelle vinacce e il secondo allo sviluppo di nuovi approcci sintetici per l'ottenimento di 2,3-diidrobenzofurani-2,3-disostituiti.

Le vinacce (una miscela costituita principalmente da buccia e semi) sono i sottoprodotti più abbondanti del processo di vinificazione, e ciò comporta dei problemi riguardo la loro trasformazione ed eliminazione sia dal punto di vista ecologico che economico. Tuttavia esse rappresentano una ricca fonte a basso costo di composti fenolici naturali che posseggono innumerevoli proprietà benefiche per la salute umana. Per tale motivo le vinacce possono essere utilizzate nell'industria farmaceutica ed alimentare per l'ottenimento di nuovi medicinali ed integratori.

In questo contesto, l'obiettivo del primo studio, svolto presso Osun Solution S.r.l. (Lauria, Italia), è stato quello di analizzare il contenuto dei composti polifenolici totali e del *trans*-resveratrolo in tre diverse varietà di vinacce (“Aglanico del Vulture”, “Yuko” e “Piedirosso”) la cui estrazione è stata effettuata con due metodologie differenti: la prima, in laboratorio, utilizzando le classiche condizioni acquose alcoliche a reflusso; la seconda, in industria, realizzata mediante microincapsulazione spray-drying utilizzando la maltodestrina come materiale essiccante. La quantità di polifenoli solubili totali è stata effettuata mediante il metodo Folin-Ciocalteu e per tutti e tre gli estratti è risultata molto buona, quindi questi sottoprodotti del vino potrebbero essere potenziali matrici per la formulazione di nuovi farmaci e integratori alimentari.

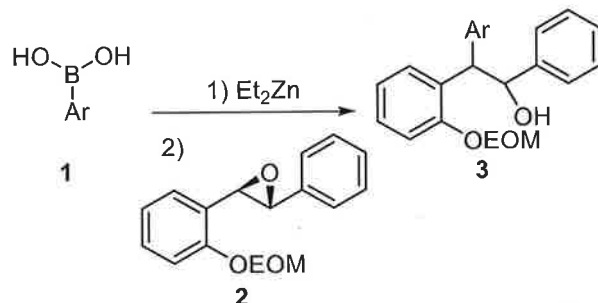
Il metodo HPLC-UV applicato per la quantificazione del *trans*-resveratrolo nei tre estratti di vinacce ha dato una separazione nelle corse cromatografiche da pessima a abbastanza buona. Questo metodo, anche se dovrà essere ottimizzato, è l'unico, tra i tanti metodi testati, che ha consentito una valutazione quantitativa preliminare del *trans*-resveratrolo negli estratti di vinacce. In particolare, nella corsa cromatografica delle vinacce di “Piedirosso” il picco del *trans*-resveratrolo risulta completamente mascherato dalla banda sottostante e per questo motivo non è stato possibile valutare con precisione il contenuto di *trans*-resveratrolo ottenuto. Una migliore separazione è stata ottenuta nelle corse cromatografiche delle vinacce di “Aglanico del Vulture” e il contenuto di *trans*-resveratrolo risulta essere abbastanza in accordo con i risultati ottenuti in precedenti ricerche su diverse vinacce. Infine, la migliore separazione è stata ottenuta nelle corse cromatografiche delle vinacce di “Yuko, il picco del *trans*-resveratrolo risulta abbastanza risolto e il contenuto ottenuto molto elevato.

Il sistema 2,3-diidrobenzofuranico costituisce il motivo strutturale chiave di numerosi composti biologicamente attivi, come i dimeri del resveratrolo. Questi composti naturali, che posseggono un ampio spettro di effetti benefici, sono presenti in piccolissime quantità nelle piante e per questo hanno ricevuto negli ultimi anni una notevole attenzione da parte della comunità scientifica per ottenerli sinteticamente e i loro derivati.

In questo contesto, l'obiettivo del secondo studio svolto presso l'“Università della Basilicata” (Potenza, Italia) e l'“Università di Strasburgo” (Strasburgo, Francia), ha riguardato lo sviluppo di due nuovi approcci sintetici per la sintesi stereo- ed entantioselettiva di sistemi *trans*-2,3-diaryl-2,3-diidrobenzofuranici, il

primo tramite arilazione regio- e diastereoselettiva di *trans*-2,3-diarilossirani e il secondo tramite funzionalizzazione C-H catalizzata da metalli della diarilacetaldeide.

Presso l'Università della Basilicata, sfruttando i buoni risultati preliminari ottenuti nella fenilazione regio- e stereoselettiva di *trans* 2,3-diarilossirani *orto*-oxo-sostituiti con il sistema acido fenilboronico/dietilzinco, si è deciso di testare il grado di applicabilità di questa reazione utilizzando vari acidi arilboronici (Schema 1).



**Schema 1** Reazione di apertura dell'anello epossidico con diversi acidi arilboronici

La reazione di apertura del *trans* 2,3-diarilossirano modello 2 si è rivelata abbastanza generale in termini di regio- e stereoselettività utilizzando diversi acidi arilboronici come fonte nucleofila, fornendo i *syn*-arilalcoli 3 con buone rese.

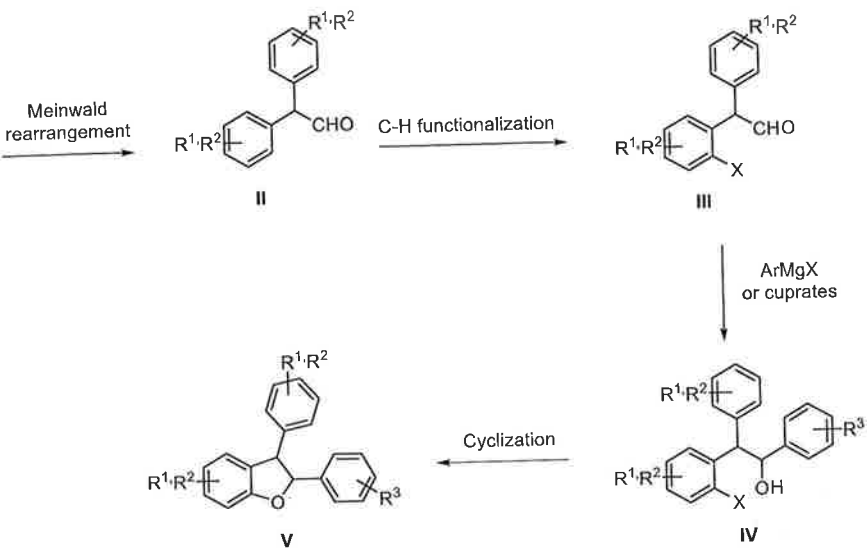
Inoltre, la via sintetica precedentemente sviluppata durante il mio periodo di tesi magistrale per la preparazione del *trans*-2,3-difenil-2,3-diidrobenzofurano, il cui approccio retrosintetico è illustrato nello Schema 2, è stata applicata con successo per la preparazione di nuovi sette *trans*-2,3-diaril-2,3-diidrobenzofurani metossi-bromo derivati del e per la preparazione di tre intermedi polifunzionalizzati della Gnetina C e  $\epsilon$ -Viniferina, anche in forma enantioarricchita.



**Schema 2** Approccio retrosintetico al *trans* 2,3-diaril-2,3-diidrobenzofurano

I sette *trans*-2,3-diaril-2,3-diidrobenzofurani metossi-bromo derivati sono stati testati come antinfiammatori nelle cellule U937. Tutti i composti hanno mostrato un ruolo significativo nell'inibire la via NF- $\kappa$ B e sono stati in grado di ripristinare il normale livello di ROS e NO. Inoltre, per quanto riguarda l'inibizione di ACLY e la riduzione della produzione di prostaglandine E2, il *trans* 5-metossi-2,3-difenil-2,3-diidrobenzofurano enantioarricchito ha mostrato una maggiore inibizione rispetto alla controparte racemica, suggerendo così un'interazione stereoselettiva significativa.

Alla "Università di Strasburgo" sono state studiate condizioni idonee per eseguire la funzionalizzazione C-H catalizzata da metalli sulle diarilacetaldeidi che potrebbero essere un nuovo potenziale intermedio chiave per una via sintetica alternativa ai 2,3-diaril-2,3-diidrobenzofurani (Schema 3).



### 3 Via sintetica alternativa ai 2,3-diaril-2,3-dihydrobenzofurani

La strategia del gruppo orientante transitorio chirale (cTDG) utilizzando L-  
 catalizzatore chirale catalitico per la formazione in situ di un ausiliario chirale  
 efficiente DG per coordinarsi con il catalizzatore metallico, per consentire la  
 garantire induzione chirale durante o dopo la fase di scissione. Purtroppo,  
 vi, si sono ottenuti solo prodotti di degradazione probabilmente a causa della  
 intermedia tra l'amminoacido e la difenilacetaldeide, che è fondamentale per

nale per la C-H funzionalizzazione catalizzata da metalli che utilizza l'8-  
 donatore esterno (DG) ha fornito risultati interessanti. La C-H olefinizzazione  
 nil-N-(8-chinolinil)acetammide ha portato ad un prodotto derivante da una  
 na reazione di tipo Heck con l'alchene e una successiva ciclizzazione  
 tossilazione catalizzata da Pd usando  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  come agente acetossilante e la  
 ata da Pd usando NIS come agente iodurante della difenil-N-(8-  
 rtato a prodotti in cui è avvenuta la funzionalizzazione C-H su l'aminochinolina.

## Abstract

### ***“Identification of polyphenols in grape pomace and newsynthetic approaches to 2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofurans, useful active ingredients against degenerative diseases”***

Teresa LAURITA

*Department of Chemistry and biology, University of Salerno*

The PhD project is divided in two main studies, the first concerning in the identification of polyphenols in Grape Pomace and the second in developing new synthetic approaches to 2,3-disubstituted-2,3-dihydrobenzofurans.

The Grape Pomace (a mixture of mainly skins and seeds) is one of the most abundant by-products of the winemaking process, which represents a waste management issue both ecologically and economically. However, it is considered a potential source of bioactive phenolic compounds that, thank to thanks to their innumerable beneficial properties for human health, it can be applied in the food and pharmaceutical industries.

In this context, the aim of the first study, carried out at *Osun Solution S.r.l.* (Lauria, Italy), was analyzed the content of total polyphenol compounds and of *trans*-resveratrol into three different varieties of grape pomace (*“Aglianico del Vulture”*, *“Yuko”* and *“Piedirosso”*) using two different extraction procedures, the first one using classical alcoholic aqueous conditions, the second one carried out by spray-drying microencapsulation using maltodextrin as carrier material.

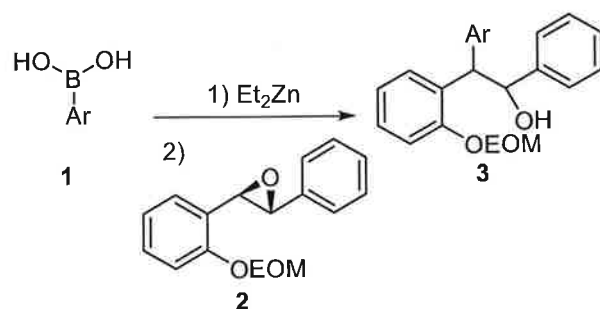
The amount of the total soluble polyphenols obtained in all three extracts, using the *Folin-Ciocalteau (FC)* method, was very good, so these wine byproducts could be a potential matrices for the formulation of new drugs and supplements food.

The HPLC-UV method applied for the quantification of *trans*-resveratrol in the three GP extracts gave a bad to quite good separation in the chromatographic runs. This method, although it will need to be optimized, is the only one, among the many methods tested, to allow a preliminary quantitative evaluation of *trans*-resveratrol in the GP extracts. In the GP from *“Piedirosso”* analysis the peak of *trans*-resveratrol was not much resolved and for this reason the content of *trans*-resveratrol obtained could not be accurately evaluated. A better separation was obtained in the chromatographic runs of GP from *“Aglianico del Vulture”* and the content of *trans*-resveratrol was found quite in agreement with the results obtained in previous research on different red grape. Finally, the best separation was obtained in the chromatographic runs of GP from *“Yuko”*, in which the peak of *trans*-resveratrol was quite resolved and the content obtained very high.

The 2,3-dihydrobenfuran-2,3-disubstituted system constitute the key structural motif of numerous biologically active compounds, as resveratrol dimers. These natural compounds, that have a broad spectrum of beneficial effect, are present in very small quantities in plants and for this reason they have recently received significant attention from the scientific community in order to obtain them and their derivatives synthetically.

In this context, the aim of the second study carried out at *“University of Basilicata”* (Potenza, Italy) and at *“Université de Strasbourg”* (Strasbourg, France), was focused on the development of two new synthetic approach for stereo- and entantioselective synthesis of *trans*-2,3-diaryl- 2,3-dihydrobenzofurans systems, the first one *via* regio- and diastereoselective arylation of *trans* 2.3-diaryloxiranes and the second one *via* metal-catalyzed C- H functionalisation of diarylacetaldehyde.

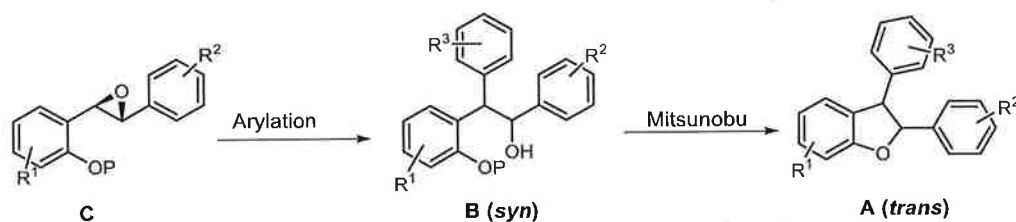
At “University of Basilicata” taking advantage of the good preliminary results obtained in the regio- and stereoselective phenylation of oxo-substituted *trans* 2,3-diaryloxiranes with the phenylzinc reagent, the scope of this reaction using various aryl boronic acid was investigated (Scheme 1).



**Scheme 1** Ring-opening reaction of epoxide with different arylboronic acids

The ring-opening reaction of *ortho*-substituted *trans* 2,3-diaryloxiranes proved to be quite general in terms of regio- and stereoselectivity using different aryl boronic acids as nucleophile source, affording the *syn* aryl alcohols in good yields.

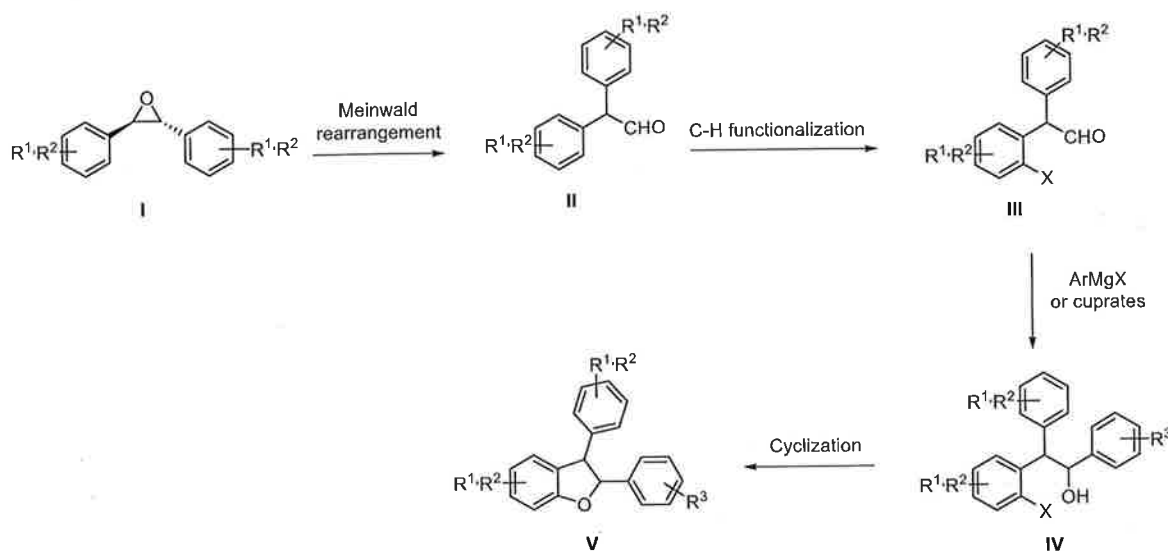
Furthermore, the synthetic route previously used for the preparation of *trans* 2,3-diphenyl-2,3-dihydrobenzofuran, whose retrosynthetic approach is depicted in Scheme 2, was successfully applied for the preparation of new seven methoxy-bromo derivatives of *trans*-2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofuran and for the preparation of three polyfunctionalized intermediates bearing 2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofuran structure towards the synthesis of Gnetin C and  $\epsilon$ -Viniferin, even in enantioenriched form.



**Scheme 2** Retrosynthetic approach to *trans* 2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofuran

The seven methoxy-bromo derivatives of *trans*-2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofuran was tested as anti-inflammatories in U937 cells. All compounds showed a significant role in inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway and were able to restore normal ROS and NO level upon LPS activation. Moreover, regarding inhibition of ACLY and reduction of prostaglandin E2 production, enantioenriched *trans* 5-Methoxy-2,3-diphenyl-2,3-dihydro-benzofuran showed more potency than the racemic counterpart, thus suggesting a stereoselective interaction in this pathway.

At “Université de Strasbourg” was investigated suitable conditions to perform the metal-catalyzed C-H functionalization on the diaryl acetaldehydes which could be a new potential key intermediate for alternative route to 2,3-diaryl- 2,3-dihydrobenzofurans (Scheme 3).



**Scheme 3** Alternative route to 2,3-diaryl-2,3-dihydrobenzofuranes

Firstly was utilized the chiral transient directing group (cTDG) strategy using *L-tert-leucine* as catalytic chiral organocatalyst for the *in situ* formation of a transient chiral auxiliary, which serves as an efficient DG to coordinate with metal catalyst to enable C-H cleavage and ensure chiral induction during or after the C-H cleavage step. Unfortunately, despite numerous attempts, was obtained only degradation products because the reaction of amino acid with the diphenylacetaldehyde did not form the fundamental imine intermediate for the catalytic cycle.

Instead, the traditional metal catalyzed reaction using 8-aminoquinoline as external donating group (DG) provided interesting results. The Pd-catalyzed C-H olefination of diphenyl-*N*-(8-quinolinyl)acetamide led to a product in which there was double C-H activation: the Heck type reaction with the alkene and the subsequent intramolecular cyclization. The Pd-catalyzed C-H acetoxylation using  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  as acetoxyating agent and the Pd-catalyzed C-H iodination using NIS as iodinating agent of diphenyl-*N*-(8-quinolinyl)acetamide led to a products in which there were the C-H functionalization on the aminoquinoline. Finally the Pd-catalyzed C-H iodination of diphenyl-*N*-(8-quinolinyl)acetamide using  $\text{I}_2$  as iodinating agent afforded the desired iodinated product in good yield.

In summary, the use of 8-aminoquinoline as bidentate system has large potential for the exploration of other type of C-H activation reactions that have not been achieved by the transient directing group strategy.