



**ESTUDIS SOBRE DESSATURASES D'ÀCIDS GRASSOS D'INSECTES.
IMPLICACIONS EN LA BIOSÍNTESI D'ESFINGOLÍPIDS**

Memòria presentada
per a optar al títol de doctor en química per

Gemma Villorbina Noguera

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ORGÀNICA

FACULTAT DE QUÍMICA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de Doctorat de Química Orgànica

Bienni 2002-2004

**ESTUDIS SOBRE DESSATURASES D'ÀCIDS GRASSOS D'INSECTES.
IMPLICACIONS EN LA BIOSÍNTESI D'ESFINGOLÍPIDS**

Memòria presentada per *Gemma Villorbina Noguera*
per a optar al títol de Doctor en Química

Barcelona, Novembre de 2004

Directors:

Antonio Delgado i Cirilo

Professor Titular
Dpt de Farmacologia i Química Terapèutica
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona

Tutor:

Angel Montaña i Pedrero

Professor Titular
Dpt de Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

Gemma Fabriàs i Domingo

Investigadora Científica
Dpt de Química Orgànica Biològica
Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals
de Barcelona (I.I.Q.A.B.-C.S.I.C.)

Als meus pares

Al Jordi

*El temps se'n va. No el podem aturar;
i el que fem, cada gest,
cada paraula; no tornaran.
Cal però deixar l'empremta de tot allò important,
de tot el que cal recordar.*

AGRAÏMENTS

Bé, un cop escrita aquesta tesi arriba la part més complicada d'escriure, ja que és molt fàcil oblidar algú, amb el qual, segurament, he compartit unes bones estones, però cal entendre que després de tants anys pel CSIC ha passat moltíssima gent i és normal que la memòria falli.

En primer lloc, vull agrair al Prof. Francesc Camps. Primer, per ser la persona gràcies a la qual he pogut realitzar la tesi en el departament de química orgànica biològica del IIQAB-CSIC; i després, pels seus grans consells, sobretot en la primera part d'aquest treball.

Als meus directors de tesi moltíssimes gràcies per tot el que han fet per a mi. A la Dra. Gemma Fabriàs pel seu apassionament per la química i la seva gran vitalitat! Gràcies a la seva insistència i la seva confiança he arribat a escriure aquesta tesi. A l'Antonio Delgado per la seva franquesa i pels seus consells cedits amb el seu "humor" que el caracteritza. He après moltíssim al costat d'aquesta parella i, a part de ser els meus "jefes", he trobat uns grans companys tan a dins com a fora del laboratori.

Agraeixo al Dr. Àngel Motaña, de la Univesitat de Barcelona, el fet d'haver acceptat la tutoria d'aquesta tesi.

Al Dr. Amadeu Llebaria i al Dr. Jesús Joglar, gràcies al seus grans consells i l'orientació en els aspectes més experimentals d'aquest treball. I a la Dra. Fina Casas i al Dr. Pere Clapés, pel seu gran ajut davant el "monstre" de l'HPLC, sense el qual la segona part d'aquesta tesi no hauria tingut sentit.

I, en definitiva, a tots aquells que en un moment o altre m'han ajudat en alguna de les parts d'aquest treball, com són la Roser i la Dori (imprescindibles en els meus assaigs de CG-EM), el Dr. Francisco Sanchez (amb les seves llargues explicacions sobre l'equip i els experiments de RMN), la Montse Sindreu (amb el seu gran ajut en la RMN i per les llargues converses...), la Pilar Domènec i el seu equip de Microanàlisi, sense oblidar-me de les "secres".

Ara només em queden els meus companys... sense els quals no hagués pogut gaudir de tan bones estones... Gràcies!

D'entre tots aquests bons companys, permeteu-me fer una petita distinció pel Sergi, la Carme i l'Oscar. Amb ells he pogut gaudir d'uns meravellosos anys. M'han fet costat en tot moment, ajudant-me amb el que fes falta, algunes vegades abusant de la seva confiança... quina cara que tinc! Crec que ens ho hem passat molt bé, però... també

hem treballat moltíssim! Espero que això només sigui l'inici d'una gran amistat. Tampoc no puc oblidar-me de les dos Lídiés (la gran i la petita) que m'han ajudat moltíssim en el treball diari i pel seu gran afecte. Gràcies per ser tal com sou tots plegats!

Com també he d'agraïr la companyia de tota la gent que ha passat pel laboratori, el Carles (espero que segueixis tan feliç com sempre), la Neus, la Berta, el German, la Laia, la Victòria, el Xavier, la Montse i, òbviament al José Luis (cariñosament, Jlas), per les seves llargues explicacions.

No puc oblidar-me dels companys del laboratori 314, com la Tania, la Marta, la Lourdes, el Jorge, la Itziar i al "gran" biòleg Pep Bau, el pelut. I una salutació als components del grup Rubam, com el Pedro, la Gemma, la Carma, la Isabel, la Marta, la Meri, la desapareguda Lilly, el Santi, la Patricia, i un llarg etc, sense oblidar-me del gran company de viatge a través de l'apassionant món de la fase sòlida, el David, per les gràcies i desgràcies compartides amb alegria, sobretot! I com no, als companys de la tercera planta, com l'Anna, la M^a Carme, la Núria i el Roger.

En cap moment he oblidat la presència d'un parell de pibes argentins, com l'Hector i la Paola, mai una estada tan curta havia generat una forta amistat com aquesta... Un fort petó per tots dos i molta sort!

Com tampoc no puc oblidar-me de la gent que va estudiar amb mi, per les estones compartides a les aules de la facultat i fora d'aquestes. Especialment, a l'Eli, la Carol, l'Oscar i la Mire, gràcies per les llargues visites al pis. I a la gent de la meva terra, gràcies per tot.

I a una companyia molt especial com el Xusco i el Lenin, amb els quals he compartit llargues hores davant de l'ordinador.

Per acabar, em queda la gent més propera a mi, sense els quals no seria on sóc. Als meus pares, pel seu suport amb tot el que han pogut i més al llarg de la meva vida. I, al meu Jordi, pel seu entusiasme en la recerca de nous sentiments... gràcies per ser aquí!

Gràcies a tots! Una abraçada molt forta i petonets!

ÍNDEX

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS GENERALS----- 3

1.1	INTRODUCCIÓ	3
1.1.1	ÀCIDS GRASSOS	13
1.1.2	ESFINGOLÍPIDS	15
1.1.2.1	La ceramida, els glicoesfingolípids i l'esfingosina-1-fosfat	18
1.1.3	LES DESSATURASES	23
1.1.3.1	Tipus de dessaturases	24
1.1.3.2	Característiques bioquímiques	25
1.1.3.2.1	Sistemes de transport electrònic	26
1.1.3.2.2	Cofactor metàl·lic: presència de dos àtoms de ferro	27
1.1.3.2.3	Presència de tres regions conservades d'histidines	28
1.1.3.2.4	Mecanisme catalític	29
1.1.3.3	Especificitat de substrat	31
1.1.3.4	Les dessaturases d'àcids grassos d'insectes	33
1.1.3.5	La dihidroceramida dessaturasa	34
1.2	OBJECTIUS GENERALS	35

2. ESTUDI COMPARATIU DE LA BIOSÍNTESI DE LES FEROMONES SEXUALS DE THAUMETOPOEA PITYOCAMPA I THAUMETOPOEA PROCESSIONEA ----- 39

2.1	INTRODUCCIÓ	39
2.1.1	LA PROCESSIONÀRIA DEL PI	40
2.1.2	LA PROCESSIONÀRIA DEL ROURE	42
2.2	OBJECTIUS	43
2.3	RESULTATS	44
2.3.1	ESTUDIS DE MARCATGE	44
2.3.2	FORMACIÓ DE L'ENÍ V EN <i>T. PROCESSIONEA</i>	50
2.3.3	CONVERSIÓ DELS ÀCIDS 11-HEXADECINOIC I (Z)-13-HEXADECEN-11-INOIC EN ELS CORRESPONENTS ACETATS EN <i>T. PROCESSIONEA</i>	51
2.3.4	FORMACIÓ DE L'ÀCID (Z)-9-TRIDECEN-11-INOIC, 51 , A PARTIR DE L'ÀCID 11-TRIDECINOIC, 49 , EN <i>S. LITTORALIS</i>	53
2.4	DISCUSSIÓ	55

3. CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI DE LA Δ^{11} -DESSATURASA DE LEPIDÒPTERS: REQUERIMENTS ESTRUCTURALS DEL SUBSTRAT ----- 63

3.1	INTRODUCCIÓ	63
3.1.1	LA FEROMONA SEXUAL DE L'ESPÈCIE PLAGA <i>SPODOPTERA LITTORALIS</i>	63
3.2	OBJECTIUS	65
3.3	RESULTATS	68
3.3.1	SÍNTESI DELS ÀCIDS GRASSOS	68
3.3.1.1	Síntesi dels àcids ramificats 12 i 18	68
3.3.1.1.1	Síntesi de l'àcid 11-metiltetradecanoic, 12	69
3.3.1.1.1.1	Intents de síntesi de l'àcid 12 via deshidratació del 15,17-dioxa-4-metil-4-octadecanol, 5	69
3.3.1.1.1.2	Síntesi de 12 via hidrogenació del 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, 7f	73
3.3.1.1.2	Síntesi de l'àcid 11-metilhexadecanoic, 18	74
3.3.1.2	Síntesi dels derivats ciclopropànics 25 , 28:Me , 45-47	75

3.3.1.2.1	Síntesi de l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, 25	75
3.3.1.2.2	Síntesi del 11-ciclopropilidenundecanoat de metil, 28:Me	76
3.3.1.2.3	Síntesi dels àcids ciclopropànics disubstituits, 45-47	77
3.3.2	ESTUDIS DE METABOLISME DELS ÀCIDS 12, 18, 25 I 45-47 PER LA Δ^{11} -DESSATURASA DE <i>S. LITTORALIS</i>	78
3.3.2.1	Àcid 11-metiltetradecanoic, 12	78
3.3.2.2	Àcid 11-metilhexadecanoic, 18	79
3.3.2.3	Àcid 11-ciclopropilundecanoic, 25	80
3.3.2.4	Àcids 11-(cis-2-alkilciclopropil)undecanoic, 45a-47a	86
3.3.2.5	Àcids 11-(trans-2-alkilciclopropil)undecanoics, 45b-47b	88
3.4	DISCUSSIÓ	90

4. ESFINGOLÍPIDS ----- **97**

4.1	INTRODUCCIÓ	97
4.1.1	SÍNTESI D'ANÀLEGS D'ESFINGOLÍPIDS	97
4.1.1.1	Antecedents en la síntesi d'esfingolípids	98
4.1.2	INTRODUCCIÓ A LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA	104
4.1.3	INTRODUCCIÓ A LA QUÍMICA COMBINATÒRIA	107
4.2	OBJECTIUS	109
4.3	SÍNTESI D'ANÀLEGS D'ESFINGOLÍPIDS EN FASE SÒLIDA	110
4.3.1	SÍNTESI DE L'AMIDA DE WEINREB, 54	112
4.3.2	PREPARACIÓ DE LA RESINA D'ELLMAN, E	112
4.3.3	ANCORATGE DE L'AMIDA DE WEINREB 54 SOBRE LA RESINA D'ELLMAN	113
4.3.4	POSTA A PUNT DE LA SÍNTESI EN FASE SÒLIDA	114
4.3.4.1	Alquilació amb el bromur de metilmagnesi	115
4.3.4.2	Reducció de la cetona e55	116
4.3.4.2.1	Resultats de la reducció de la cetona e55	119
4.3.4.3	Desprotecció de l'amina	122
4.3.4.4	Acilació de l'amina e57	122
4.3.4.4.1	Acilació de l'amina amb un èster activat	123
4.3.4.4.2	Acilació de l'amina e57 sota condicions de Schotten-Baumann	125
4.3.5	DISSENY DE LA QUIMIOTECA D'ANÀLEGS DE CERAMIDA	126
4.3.5.1	Formació de les cetones e55, e60 - e64	127
4.3.5.2	Reducció de les cetones e55, e60 - e63	128
4.3.5.3	Desprotecció dels grups carbamats de e56, e65 - e68	129
4.3.5.4	Acilació i desancoratge de les amines e57, e69 - e72	130

5. PART EXPERIMENTAL ----- **137**

5.1	QUÍMICA	137
5.1.1	DADES GENERALS	137
5.1.2	SÍNTESI DELS ÀCIDS 12 I 18	140
5.1.2.1	12,14-Dioxa-1-bromopentadecà, 1	140
5.1.2.2	12,14-Dioxapentadecanal, 2	140
5.1.2.3	15,17-Dioxa-4-octadecanol, 3	141
5.1.2.4	15,17-Dioxa-4-octadecanona, 4	142
5.1.2.5	15,17-Dioxa-4-metil-4-octadecanol, 5	142
5.1.2.6	Reaccions de deshidratació de l'alcohol 5	143
5.1.2.6.1	Reacció amb SiO ₂ activada amb FeCl ₃ ·6H ₂ O	143
5.1.2.6.2	Reacció amb MeOH/HCl	144
5.1.2.6.2.1	MeOH/HCl 20%	144
5.1.2.6.2.2	MeOH/HCl concentrat.	145

5.1.2.6.2.3	MeOH/HCl concentrat i tamisos	145
5.1.2.6.3	I ₂ /toluè	146
5.1.2.6.4	SOCl ₂ /piridina	146
5.1.2.7	Intents d'hidrogenació	147
5.1.2.7.1	Hidrogenació amb Pd/C 10%-MeOH	147
5.1.2.7.2	Hidrogenació amb PtO ₂ /AcOH	147
5.1.2.8	13,15-Dioxa-2-propil-1-hexadecè, 7f	148
5.1.2.9	2,4-Dioxa-15-metiloctadecà, 10	149
5.1.2.10	11-Metil-1-tetradecanol, 11	149
5.1.2.11	Àcid 11-metiltetradecanoic, 12	150
5.1.2.12	17,19-Dioxa-6-eicosanol, 13	151
5.1.2.13	17,19-Dioxa-6-eicosanona, 14	151
5.1.2.14	13,15-Dioxa-2-pentil-1-hexadecè, 15	152
5.1.2.15	2,4-Dioxa-15-metileicosà, 16	152
5.1.2.16	11-Metil-1-hexadecanol, 17	153
5.1.2.17	Àcid 11-metilhexadecanoic, 18	153
5.1.3	PREPARACIÓ DE L'ÀCID 11-CICLOPROPILUNDECANOIC, 25	154
5.1.3.1	12-Bromo-1-dodecanol, 19	154
5.1.3.2	13,15-Dioxa-1-bromohexadecà, 20	155
5.1.3.3	13,15-Dioxa-hexadecanal, 21	155
5.1.3.4	14,16-Dioxa-1-heptadecè, 22	156
5.1.3.5	11-Ciclopropil-1-undecanol, 24	156
5.1.3.6	Àcid 11-ciclopropilundecanoic, 25	157
5.1.4	PREPARACIÓ DE L'11-CICLOPROPILIDENUNDECANOAT DE METIL, 28:ME	158
5.1.4.1	15-Ciclopropiliden-2,4-dioxaundecà, 26	158
5.1.4.2	11-Ciclopropiliden-1-undecanol, 27	159
5.1.4.3	Àcid 11-ciclopropilidenundecanoic, 28	159
5.1.4.4	11-Ciclopropilidenundecanoat de metil, 28:Me	160
5.1.5	PREPARACIÓ DELS ACETILENS 30, 31 i 32	160
5.1.5.1	2,4-Dioxa-16-heptadecí, 29	160
5.1.5.2	Formació dels acetilens 30, 31 i 32	161
5.1.6	PREPARACIÓ DELS ÀCIDS 45A, 46A i 47A	162
5.1.6.1	Formació de les olefines de configuració <i>Z</i>	162
5.1.6.2	Formació dels àcids 36a, 37a i 38a	164
5.1.6.3	Esterificació dels àcids 36a, 37a i 38a	166
5.1.6.4	Formació dels ciclopropans 42a, 43a i 44a	167
5.1.6.5	Formació dels àcids 45a, 46a, 47a	169
5.1.7	PREPARACIÓ DELS ÀCIDS 45B, 46B i 47B	170
5.1.7.1	Formació de les olefines de configuració <i>E</i>	170
5.1.7.2	Formació dels àcids 36b, 37b i 38b	172
5.1.7.3	Esterificació dels àcids 36b, 37b i 38b	173
5.1.7.4	Formació dels ciclopropans 42b, 43b i 44b	174
5.1.7.5	Formació dels àcids 45b, 46b, 47b	176
5.1.8	SÍNTESI D'ANÀLEGS D'ESFINGOLÍPIDS	177
5.1.8.1	Síntesi de l'èster metílic de la <i>L</i> -Serina, 52	177
5.1.8.2	Síntesi del (<i>S</i>)-2-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-3-hidroxiopropionat de metil, 53	178
5.1.8.3	Síntesi del (<i>S</i>)- <i>N</i> -metoxi- <i>N</i> -metil-2-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-3-hidroxiopropionamida, 54	178
5.1.8.4	Síntesi del benzoat de <i>p</i> -nitrofenil, 59	179
5.1.8.5	Síntesi de la resina d'Ellman, e	180
5.1.8.6	Ancoratge i desanoratge de l'amida de Weinreb 54 a la resina d'Ellman, e	180
5.1.8.6.1	Ancoratge	180
5.1.8.6.2	Desanoratge	181
5.1.8.7	Síntesi de les resines metilcetona, e55 , hexilcetona, e60 , octilcetona, e61 , dodecilcetona, e62 , i fenilcetona, e63	182

5.1.8.8	Síntesi de les resines metilalcohol, e56 , hexilalcohol, e65 , octilalcohol, e66 , dodecilalcohol, e67 , i fenilalcohol, e68 -----	185
5.1.8.9	Síntesi de les resines metilaminoalcohol, e57 , hexilaminoalcohol, e69 , octilaminoalcohol, e70 , dodecilaminoalcohol, e71 i fenilaminoalcohol, e72 per desprotecció de les corresponents resines Fmoc.-----	187
5.1.8.10	Acilacions de les amines de les resines e57 , e69 - e72 i desancoratge amb TFA ---	188
5.1.8.10.1	Clorur de benzoil com agent acilant-----	189
5.1.8.10.2	Clorur de 4-heptilbenzoil com agent acilant -----	190
5.1.8.10.3	Clorur d'isovaleril com agent acilant -----	192
5.1.8.10.4	Clorur de 3-ciclopentilpropionil com agent acilant -----	194
5.1.8.10.5	Clorur de 1-naftoil com agent acilant -----	195
5.1.8.10.6	Clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil com agent acilant -----	197
5.2	ASSAIGS BIOLÒGICS -----	199
5.2.1	PRODUCTES-----	199
5.2.2	INSECTES-----	199
5.2.3	DISSECCIÓ DE LES GLÀNDULES FEROMONALS-----	199
5.2.4	INCUBACIÓ DE LES GLÀNDULES FEROMONALS IN VITRO-----	199
5.2.5	METANÒLISI BÀSICA -----	200
5.2.6	ANÀLISI INSTRUMENTAL PER CG-EM-----	200

6. CONCLUSIONS----- 203

7. BIBLIOGRAFIA ----- 207

1.- INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS GENERALS

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS GENERALS

1.1 INTRODUCCIÓ

Sota el terme lípids s'han inclòs clàssicament un grup de substàncies naturals que són solubles en hidrocarburs i insolubles en aigua. Aquesta família compren una gran varietat d'estructures químiques, com poden ser els àcids grassos lliures, els glicèrids, les ceres, els fosfolípids, els esfingolípids (incloent els glicoesfingolípids), els esterols, etc.

Durant molts anys, els lípids foren considerats com a reservori d'energia del metabolisme, exhibint un rol conservatiu en l'activitat cel·lular. Anys després, estudis més acurats establiren altres funcions vitals dels lípids, com el de ser els principals components estructurals de les membranes cel·lulars¹. A partir de la dècada dels 90, diferents estudis realitzats mostraren que alguns lípids actuaven com a importants reguladors i mediadors de diferents processos biològics vitals dels organismes, com ara en la resposta immunològica, actuant com a transmissors de la informació neuronal, en la regulació del to muscular i dels vasos sanguinis, en la homeostasis, en les inflamacions, etc., o bé com a missatgers secundaris, facilitant l'entrada de diversos compostos a l'interior de la cèl·lula, i, simultàniament, actuant com a mediadors intracel·lulars²⁻⁷.

La classificació dels lípids es difícil degut a la seva heterogeneïtat estructural. Com que l'extracció del component lipídic d'una mostra biològica es pot realitzar amb dissolvents orgànics i sotmetre'ls a una posterior reacció de saponificació, aquest fet permet classificar-los en dos tipus, saponificables i insaponificables.

1) Saponificables: inclouen els derivats de tipus èster d'àcids grassos. Aquest grup inclou:

- **Àcids grassos i els seus derivats**, dels quals en parlarem ampliament més endavant.
- **Eicosanoids**: Aquest terme agrupa a una sèrie de compostos derivats d'àcids grassos poliinsaturats de 20 àtoms de carboni (d'aquí se'n deriva el seu nom), com l'àcid araquidònic. Tots presenten una ampla gama d'activitats biològiques, com ara senyalitzadors químics (hormones) o reguladors fisiològics (en processos inflamatoris). Són el prototip de

mediadors locals, alliberats in situ davant diversos estímuls. En aquesta categoria es troben les prostaglandines, els tromboxans i els leucotriens.

- **Lípids neutres:** Són èsters d'àcids grassos amb alcohols. En la natura en trobem dos tipus:

- *Acilglicerols o glicèrids:* Aquests compostos són considerats la major font d'energia i els principals derivats neutres del glicerol trobats en els animals, i estan constituïts per un esquelet de glicerol, esterificat amb tres àcids grassos (Figura 1.1). En els animals, es poden trobar, principalment en el teixit adipós, considerat la zona d'emmagatzemament dels lípids. El glicerol o propantriol presenta tres grups hidroxil, que poden estar esterificats total o parcialment, donant lloc a monoacilglicerols (monoglicèrids), diacilglicerols (diglicèrids) y triacilglicerols (triglicèrids). En general, el grup hidroxil secundari està esterificat amb àcids de 18 àtoms de carboni, en canvi, en el grups hidroxils primaris poden haver-hi d'altres àcids grassos. Normalment els glicèrids es presenten com a trièsters, encara que els mono i diacilglicerols, intermediaris en la biosíntesi o degradació de triglicèrids, són importants missatgers secundaris. Els triglicèrids són molècules molt hidrofòbiques, mentre que els mono i diacilglicerols presenten un caràcter anfipàtic degut als grups OH no esterificats.

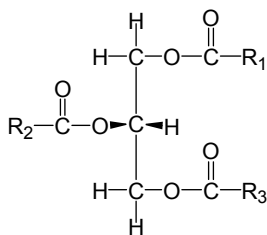


Figura 1.1 Estructura general dels triacilglicerols o triacilglicèrids

- *Ceres:* Són èsters d'àcids grassos amb alcohols primaris saturats de cadena llarga (entre 14 i 32 àtoms de carboni), també anomenats alcohols grassos. Des del punt de vista químic, són compostos bastant inerts. La seva funció principal

és estructural, cobrint i protegint diverses estructures i contribuint al caràcter hidrofòbic dels teguments d'animals i plantes.

- **Lípids amfipàtics:** Quan la molècula d'un lípid presenta un grup molt polar a més de la cadena hidrocarbonada hidrofòbica es diu que es tracta d'un lípid amfipàtic. Tal com es mostra a la Figura 1.2, es representen de forma esquemàtica com una o dues línies rectes o fraccionades (que representen les cadenes hidrocarbonades hidrofòbiques), que acaben en un cercle (que representa el cap polar, hidrofílic).

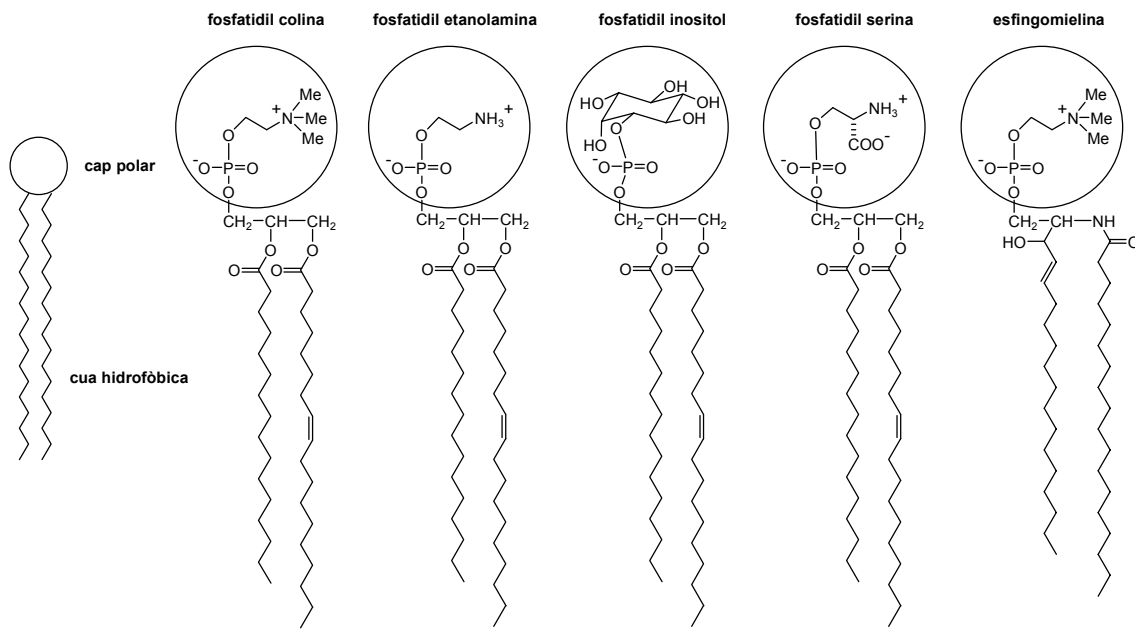


Figura 1.2 Representació esquemàtica dels lípids amfipàtics

En presència d'aigua, les cues hidrofòbiques tendeixen a interaccionar entre si, creant un espai hidrofòbic d'on s'exclou l'aigua i on poden quedar atrapades d'altres molècules hidrofòbiques, mentre que el cap polar interacciona amb l'aigua i es troba solvatat, evitant que la part hidrofòbica entri en contacte amb el medi aquós. Aquest és l'anomenat efecte hidrofòbic, responsable de que els lípids amfipàtics, en presència d'aigua, tinguin la propietat d'autoestructuració, que dóna lloc a tres tipus d'estructures diferents com són les monocapes, les bicapes i les micelles. En funció del grup polar, els lípids amfipàtics es classifiquen de

diferents formes. Una d'elles és en funció de la naturalesa de l'alcohol que esterifica els àcids grassos, que permet diferenciar entre dos grans grups:

- *Glicerolípids*: Formats pel glicerol esterificat a les posicions *sn*-1 i *sn*-2 amb àcids grassos. El grup OH de la posició *sn*-3 es pot trobar unit amb un sucre, donant lloc als glicoglicerolípids, o esterificat amb àcid ortofosfòric, generant els fosfoglicerolípids. En els glicoglicerolípids, l'enllaç glicosídic es forma amb la posició 1 d'un monosacàrid, si bé en alguns casos, el component glicosídic de la molècula és un disacàrid o un trisacàrid. Un dels glicoglicerolípids més abundant és el β -galactosildiàcilglicerol (Figura 1.3), que es troba present a les membranes dels cloroplasts.

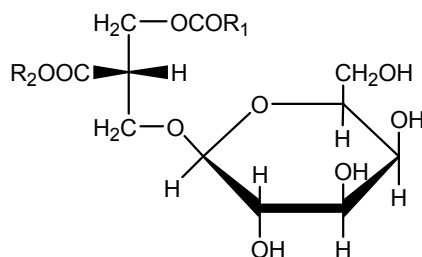


Figura 1.3 Estructura del β -galactosildiàcilglicerol

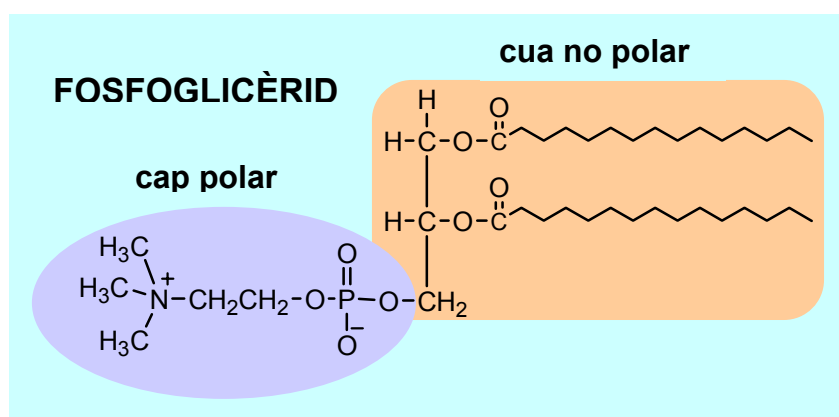


Figura 1.4 Esquema general d'un fosfoglicerolípíd

En els fosfoglicerolípid o fosfolípids (Figura 1.4), en la posició *sn-3* del glicerol està esterificada amb un àcid ortofosfòric. El membre més senzill d'aquesta família és l'àcid fosfatídic. Membres més complexos d'aquest grup presenten un segon enllaç fosfat amb la colina, la etanolamina o la serina, per exemple. Els compostos resultants són, respectivament, la fosfatidilcolina (o lecitina), la fosfatidiletanolamina (o cefalina) i la fosfatidilserina (Figura 1.5). La presència de poliols cíclics en el segon enllaç fosfat és també comú a la natura, com és el cas del fosfatidilinositol. Aquest conjunt de lípids formen part de les membranes, i en ser hidrolitzats per les fosfolipases, alliberen missatgers secundaris que són fonamentals en la senyalització cel·lular.

El segon èster fosfòric també pot establir-se amb una altra molècula de glicerol, originant els fosfatidilglicerols (Figura 1.5) o amb una altra molècula de fosfatidilglicerol, obtenint un difosfatidilglicerol o cardiolipina (Figura 1.5), que són molt abundants a les membranes bacterianes i a la membrana interna mitocondrial.

Per hidròlisi d'un dels èsters (*sn-1* i *sn-2*) els fosfoglicerolípid generen un lisofosfoglicerolípid (o lisolecitina). Les lisolecitines tenen activitat detergent i destrueixen les estructures de les membranes. La lisofosfatidilcolina i la lisofosfatidiletanolamina en són els exemples més representatius (Figura 1.5).

En alguns casos, els grups OH de les posicions *sn-1* i *sn-2* del glicerol no formen èsters, sinó enllaços del tipus 1-alquenilèter, formant els anomenats plasmalògens. Els plasmalògens són abundants a les membranes del retícle sarcoplàsmic. El factor activador de les plaquetes (PAF) (Figura 1.5), és un plasmalògen de la colina on el C2 del glicerol està esterificat amb un àcid acètic en lloc d'un àcid gras.

Finalment, hi ha casos on són alcohols grassos els que s'uneixen al glicerol mitjançant enllaços de tipus èter, formant

els èters fosfatídics, que es troben a la membrana plasmàtica de bacteries termòfiles i halòfiles, i són extraordinàriament resistents a les reaccions d'hidròlisis.

- *Esfingolípids*: Els àcids grassos es troben esterificats amb la esfingosina. D'aquest grup, juntament amb els àcids grassos, en parlarem ampliament més endavant.

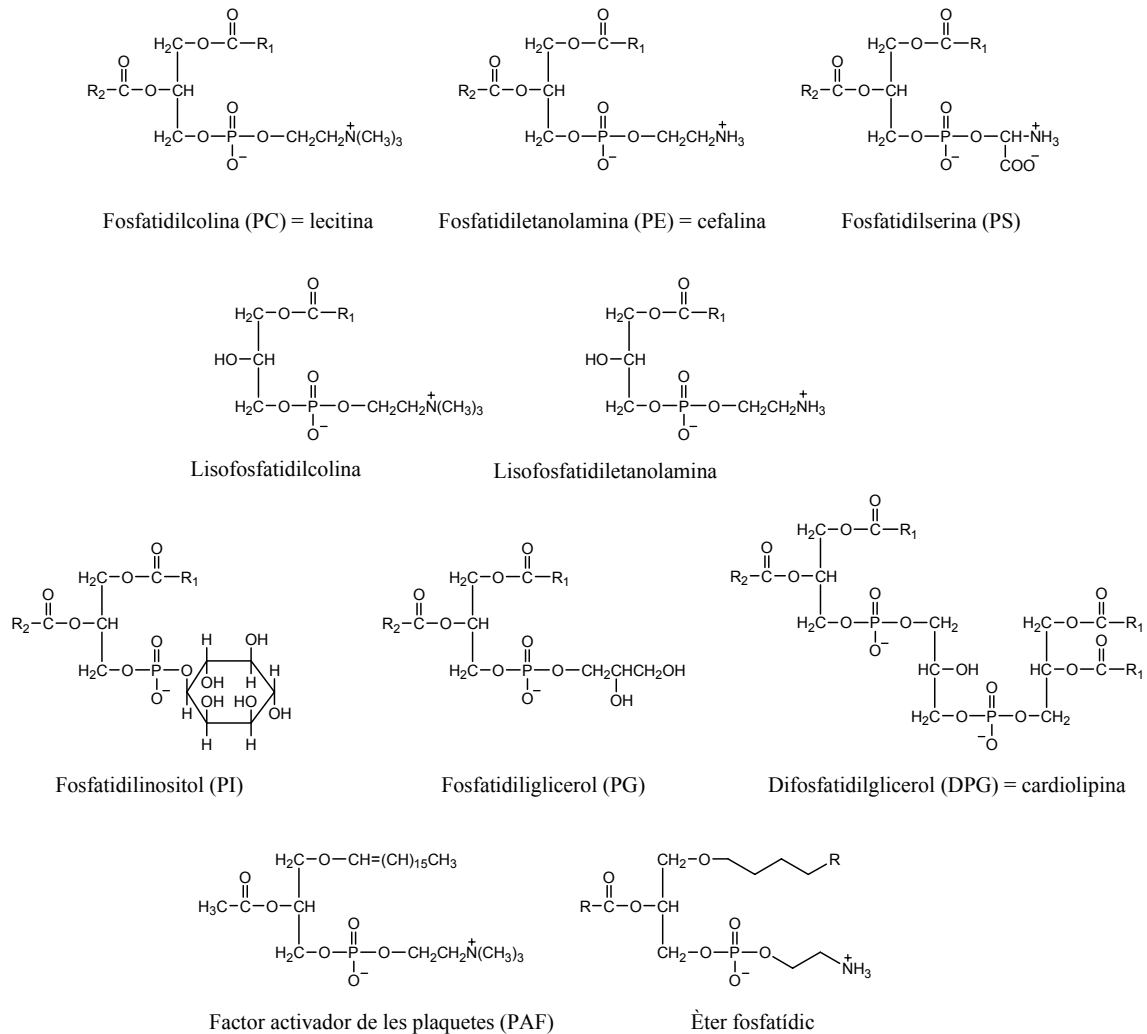


Figura 1.5 Estructures de la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, la lisofosfatidilcolina, la lisofosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol, el fosfatidilglicerol i el difosfatidilglicerol, el PAF i l'èter fosfatídic

- 2) Insaponificables: Són compostos derivats de la unió de varies unitats isoprèniques, i es sintetitzen a partir d'una unitat bàsica de 5 àtoms de carboni: l'isoprè. En aquest grup de lípids s'inclouen:

- **Terpens:** Molècules formades per condensació d'algunes unitats d'isoprè. Químicament, la majoria són hidrocarburs, malgrat que alguns continguin funcions oxidades. Moltes d'aquestes molècules són vitamines liposolubles. Són freqüents en els olis essencials de plantes. En aquest grup es troben:
 - *Retinoides:* És un alcohol tetraprenoid, en el qual es distingeix un anell de β -ionona i una cadena lateral de poliprenoid (Figura 1.6). També s'anomena *vitamina A*, i és indispensable per a evitar trastorns com la ceguesa nocturna (falta d'acomodació visual a la obscuritat), la xeroftalmia (queratinització de l'epiteli de la conjuntiva de l'ull) i la sequetat dels epitelis. El retinal i l'àcid retinoic són derivats del retinol que a part de presentar una certa activitat vitamínica es troben implicats en processos com la visió i el control de la transcripció gènica.
 - *Carotenoids:* Són derivats octaprenoids que constitueixen un gran nombre de pigments vegetals, com el β -carotè (Figura 1.6) o la cantaxantina. El β -carotè és un precursor del retinal, per això també s'anomena provitamina A.
 - *Tocoferols:* Són una família de compostos poliprenoids, l'estructura dels quals consta d'un sistema cíclic i una cadena de poliprenoid saturada. Els diferents tocoferols es caracteritzen pels substituents que presenten a l'anell. Els tocoferols són agents antioxidants potents, i prevenen les reaccions de peroxidació de lípids. Un dels tocoferols més abundants és l' α -tocoferol o vitamina E (Figura 1.6), que en rates evita l'esterilitat.
 - *Naftoquinones:* Els compostos anomenats quinones es troben sovint a la natura com a cofactors en reaccions d'oxidació-reducció (ubiquinones en mitocondries i plastoquinones en cloroplasts), ja que la reducció de l'anell quinònic és reversible. Les naftoquinones (vitamina K) presenten acció vitamínica, essent imprescindibles en el procés de coagulació sanguínia.

- *Dolicols*: Són compostos poliprenoids no vitamínics. Es tracta d'una família d'alcohols isoprenoids de cadena llarga (de 80 a 100 àtoms de carboni), derivats de 17-21 unitats d'isoprè (Figura 1.6). Normalment, els dolícols es troben en forma d'èster fosfòric (el grup fosfat s'esterifica amb el grup OH del dolícol). El fosfat del dolícol intervé en la síntesi dels oligosacàrids presents en les glicoproteïnes.
- **Esteroides**: Són compostos derivats del perhidrociclopenta[a]fenantrè, un sistema tetracíclic que es forma a partir de l'escualè (Figura 1.6). Els diferents esteroides es distingeixen per:
 - el grau de saturació del sistema cíclic
 - la existència de cadenes laterals diverses
 - la existència de grups funcionals (hidroxil, oxo o carbonil)

Existeixen tres grups d'esteroides:

- *Esterols*: Són els més abundants. El colesterol (Figura 1.6) és l'esteroide més comú en els animals, ja que és un dels components majoritaris de les membranes plasmàtiques, i també el precursor d'altres esteroides animals. El seu grup OH li dona un dèbil caràcter amfifílic, mentre que el sistema d'anells fusionats li atribueix major rigidesa que els altres lípids de membrana, determinant de forma important les propietats físico-químiques d'aquesta. També és abundant en les lipoproteïnes del plasma sanguini, esterificat en un 70 % amb àcids grassos de cadena llarga formant èsters de colesterol, i és considerat el precursor metabòlic d'altres esteroides com els calciferols, les hormones esteroides i els àcids biliars. Un cop sintetitzat, l'organisme animal és incapaç de trencar el sistema policíclic, de tal manera que s'excreta com a tal. Per aquest motiu, en ser poc soluble, el colesterol tendeix a precipitar en l'endoteli dels vasos sanguinis, formant les plaques d'ateroma que causen l'arterioesclerosis.

- *Àcids i sals biliars:* Són molt abundants a la bilis. El més característic és l'àcid còlic (Figura 1.6), que amb freqüència està conjugat amb els aminoàcids glicina i taurina, formant els àcids taurocòlic i glicocòlic (Figura 1.6). Les sals biliars, que són les sals sòdiques o potàssiques dels àcids taurocòlics o glicocòlics, són molècules anfipàtiques que l'organisme les utilitza com a emulsionants per facilitar la digestió i absorció dels lípids intestinals.
- *Hormones esteroidees:* Són substàncies produïdes per les glàndules endocrines que es distribueixen pel corrent sanguí i realitzen funcions de regulació metabòlica en teixits específics. Es distingeixen 4 famílies d'hormones esteroidees, els estrògens, els andrògens, els gestàgens i els corticoides.

Existeixen d'altres lípids insaponificables que no estan relacionats estructuralment amb l'isoprè, com ara els hidrocarburs i els lípids pirròlics.

- **Hidrocarburs:** Alguns hidrocarburs de cadena lineal o ramificada solen estar presents en vegetals i llevats, formant mescleres complexes. El seu paper fisiològic no està clar, es creu que són substàncies de reserva.
- **Lípids pirròlics:** Es distingeixen compostos mono, di i tetrapirròlics. Dels compostos tetrapirròlics de cadena tancada en cal destacar la protoporfirina IX (Figura 1.6), a partir de la qual s'origina el grup hemo (Figura 1.6), un compost de coordinació amb ferro que és el grup prostètic de les proteïnes com la hemoglobina, mioglobina, catalases i peroxidases. Dels compostos de cadena oberta se'n destaquen els pigments biliars (bilirrubina i biliverdina), que són productes de degradació de l'anell porfirínic. Així, la bilirrubina (Figura 1.6) és un producte de degradació de la hemoglobina.

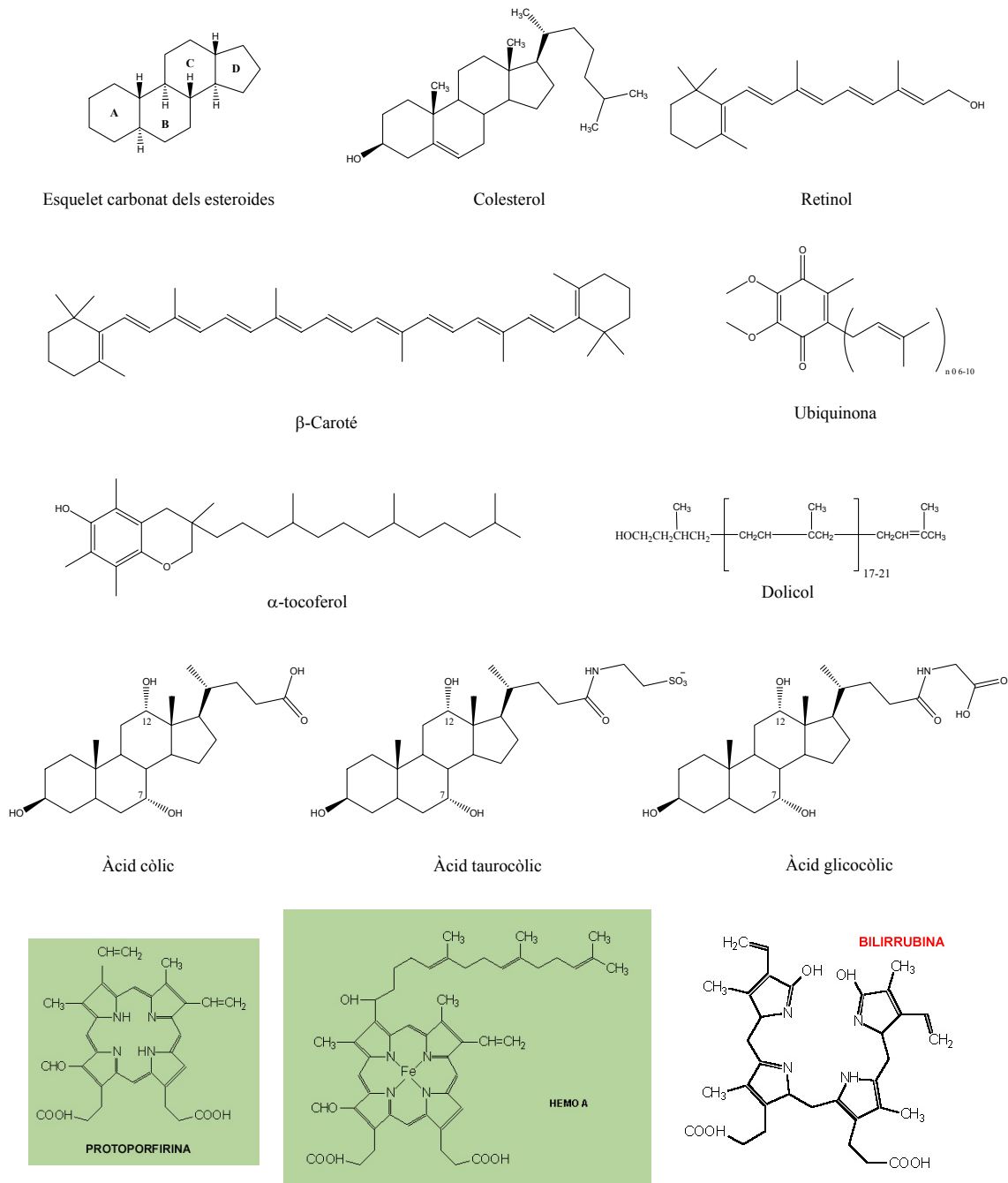


Figura 1.6 Esquelet carbonat dels esteroides i estructura del colesterol, del retinoid, del β-caroté, del α-tocoferol, de la ubiquinona, del dolicol, de l'àcid còlic, de l'àcid taurocòlic, de l'àcid glicocòlic, de la protoporfirina IX, del grup hemo i de la bilirrubina.

1.1.1 Àcids grassos

Taula 1.1 Àcids grassos més comuns

Nº de Carbonis	Nom comú	carbonis: insaturacions	Estructura
Àcids grassos saturats			
12	àcid làuric	12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14	àcid mirístic	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16	àcid palmític	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18	àcid esteàric	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20	àcid araquídic	20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22	àcid behènic	22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24	àcid lignocèric	24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Àcids grassos insaturats (<i>cis</i>)			
16	àcid palmitoleic	16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18	àcid oleic	18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18	àcid linoleic	18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18	àcid α -linoleic	18:3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18	àcid γ -linoleic	18:3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20	àcid araquidònic	20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
24	àcid nervònic	24:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

Els àcids grassos són àcids carboxílics de cadena hidrocarbonada de tipus alifàtic, amb un nombre parell d'àtoms de carboni. Els més abundants en plantes superiors i en animals són els de 16 i 18 àtoms de carboni (àcids palmític, oleic, linoleic i esteàric) (Figura 1.7). Se'n coneixen, però, molts més (Taula 1.1), els quals es poden classificar en dos grans grups, en funció de la presència o no de dobles enllaços a l'estructura:

- 1) Saturats: Només presenten enllaços simples entre àtoms de carboni.
- 2) Insaturats: Contenen un o més dobles enllaços, normalment de configuració *cis* (tot i que són menys abundants, també n'hi ha de configuració *trans*), que es poden trobar conjugats o no.

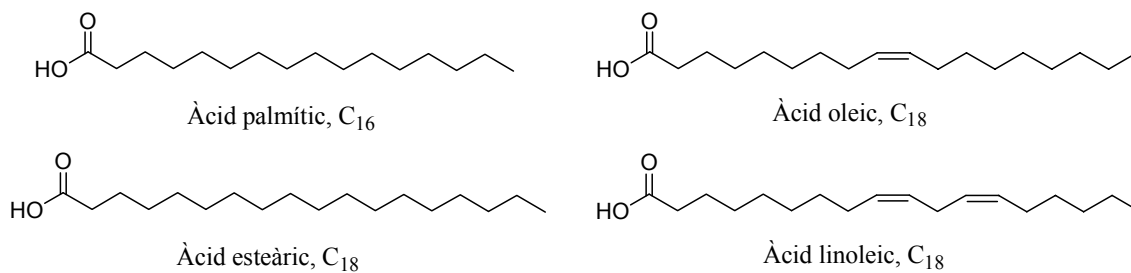


Figura 1.7 Estructura dels àcids grassos més abundants

Les propietats físiques d'aquests compostos varien en funció del grau d'insaturació. En aquest sentit, els àcids grassos saturats són més flexibles, degut a la rotació relativament lliure dels enllaços carboni-carboni. Una altra de les característiques bàsiques a considerar de caràcter estructural és la variació del punt de fusió amb el número d'insaturacions. Així, en els àcids grassos insaturats s'ha comprovat que un augment del grau d'insaturació implica una disminució de la temperatura de transició de l'estat gel (sòlid) a la fase líquida-cristal·lina. En aquest context, donat que aquestes estructures formen part de les membranes cel·lulars, un augment del grau d'insaturació provoca un augment de la seva fluïdesa amb les repercussions que comporta des del punt de vista del funcionament cel·lular. A temperatures fisiològiques, els lípids polars que contenen només àcids grassos saturats no poden formar la bicapa lipídica, que és l'estructura fonamental de les membranes biològiques. La introducció d'un número apropiat d'insaturacions, tal com s'ha esmentat anteriorment, proporciona a la membrana la fluïdesa necessària per portar a terme nombrosos processos bioquímics com ara l'activació d'un gran nombre d'enzims lligats a aquesta.

La introducció d'insaturacions a les cadenes alifàtiques d'un àcid gras té lloc mitjançant una reacció enzimàtica catalitzada per enzims especialitzats anomenats dessaturases. Aquesta reacció és essencial en la biosíntesi d'àcids grassos per garantir un funcionament correcte de les membranes⁸. En aquest sentit, juga un paper molt important en la biosíntesi d'àcids grassos poliinsaturats (PUFAs), que són utilitzats com a precursors de molècules biològicament actives (eicosanoids, reguladors del creixement, hormones). La modulació de la biosíntesi d'aquests PUFAs presenta una importància rellevant en el tractament de determinades malalties cròniques com ara l'artritis, la diabetis, les inflamacions, el càncer i les malalties cardiovasculars, entre

d'altres⁹. A més, la dessaturació d'àcids grassos és també fonamental en la biosíntesi de productes naturals que se'n deriven, com són les feromones sexuals d'insectes.

Els àcids grassos són poc abundants en la seva forma lliure i normalment provenen de la hidròlisi de lípids. No obstant, cal destacar que els àcids grassos en forma lliure poden actuar com a moduladors de l'activitat de diversos enzims com ara fosfolipases, canals iònics, ATPases, proteïnes G o proteïna quinases, entre d'altres. Aquests enzims són considerats dianes de gran importància en el tractament de determinades malalties, tal com s'ha esmentat anteriorment. A més, els àcids grassos són intermedis de la biosíntesi de diferents productes naturals, com són, per exemple, les prostaglandines i les feromones sexuals dels lepidòpters.

1.1.2 Esfingolípid

Des del punt de vista estructural, els esfingolípid (SLs) són derivats de bases esfingoides^{10,11}. Les bases esfingoides són compostos alifàtics de cadena llarga que contenen generalment la funcionalitat 2-amino-1,3-diol amb estereoquímica 2*S*,3*R*. Les més freqüents en els teixits dels mamífers són l'esfingosina (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooctadecè-1,3-diol), l'esfinganina (2*S*,3*R*)-2-amino-1,3-octadecandiol) i la 4-hidroxiesfinganina (2*S*,3*S*,4*R*)-2-amino-1,3,4-octadecantriol), també anomenada fitoesfingosina, que és molt abundant en llevats i plantes (Figura 1.8). Aquests aminodiols poden existir en forma lliure, els liso esfingolípid, units a un àcid gras a través d'un enllaç amida per a formar les ceramides o, en els derivats 1-fosfat, poden presentar un grup 1-*O*-fosfat. D'aquests fosfats, a la cèl·lula es troba principalment l'esfingosina-1-fosfat, SoP, i l'esfinganina-1-fosfat, SaP (Figura 1.8)). A partir de la ceramida es formen els SLs complexos, que poden estar fosforilats com l'esfingomielina, SM (Figura 1.8), o glicosilats en C1-OH amb una o més unitats de monosacàrids (fins a 30), tant neutres com àcids (gangliòsids).

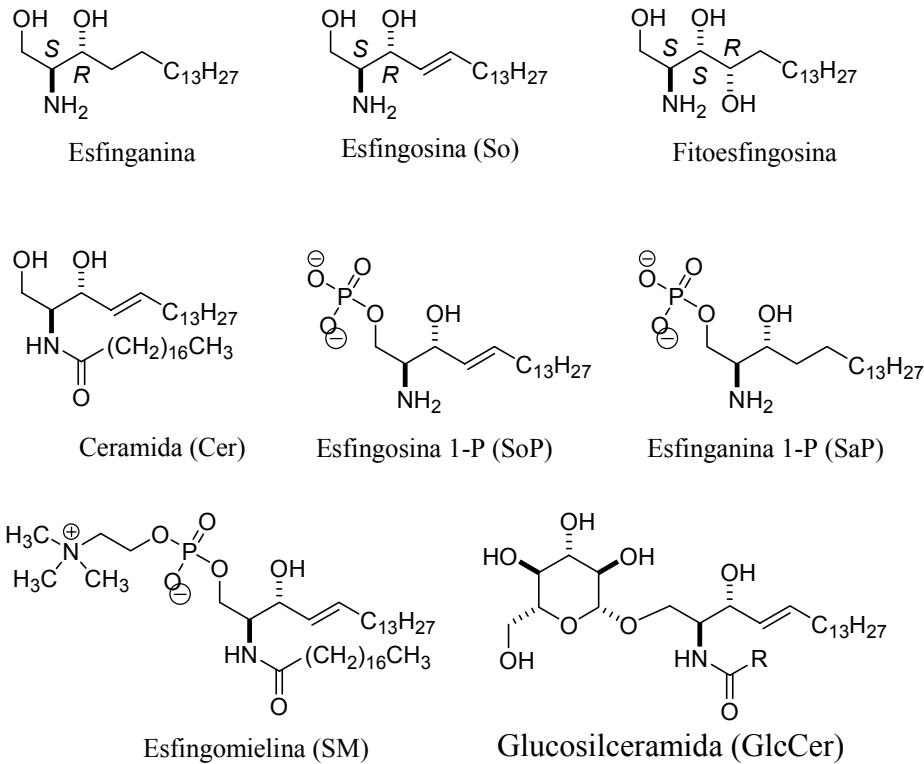


Figura 1.8 Estructura química de l'esfinganina, l'esfingosina, la fitoesfingosina, la ceramida, l'esfingosina 1-P, l'esfinganina 1-P, l'esfingomielina i la glucosilceramida

La variabilitat estructural dels SLs és molt elevada, doncs poden combinar-s'hi més d'una dotzena de bases esfingoides, diferents grups *N*-acil i més de 100 caps polars¹⁰ (Figura 1.9). Aquesta variabilitat estructural es tradueix en una gran diversitat d'efectes biològics.

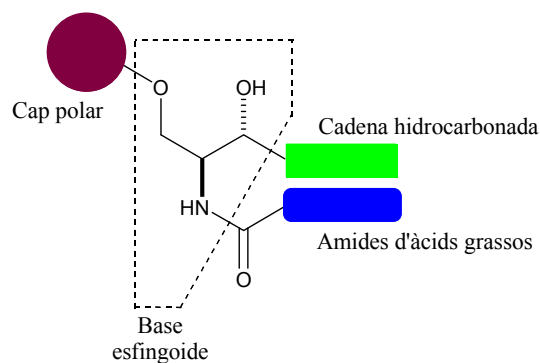


Figura 1.9 Esquema general de l'estructura dels SLs

En la Figura 1.10 es presenta l'esquema de la biosíntesi dels SLs i els GSLs, així com alguns dels inhibidors dels enzims que hi intervenen.



Figura 1.10 Biosíntesi dels SLs i els GSLs

Els esfingolípids foren descrits per primera vegada a la segona meitat del segle XIX. El físic alemany J. L. W. Tudichum va aïllar, per cristal·lització fraccionada d'un extracte de cervell, una base orgànica que contenia sucres i àcids grassos, i la va anomenar esfingosina (del llatí “*esfingos*”:ocult) degut a les seves propietats enigmàtiques, ja que, tot i estar formada per alcohols i amines, era insoluble en aigua¹². Malgrat que l'estructura fou elucidada per Carter el 1947¹³, l'aïllament i la nomenclatura d'aquests lípids fou atribuït a Tudichum¹⁴.

Els esfingolípids són uns dels constituents principals de les membranes plasmàtiques cel·lulars i són considerats la segona família més gran i diversa de lípids.

Els primers estudis realitzats sobre aquests compostos indicaven que la principal funció en cèl·lules era purament estructural, formant una capa mecànicament estable i químicament resistent, a la part exterior de la bicapa lipídica (Figura 1.11).

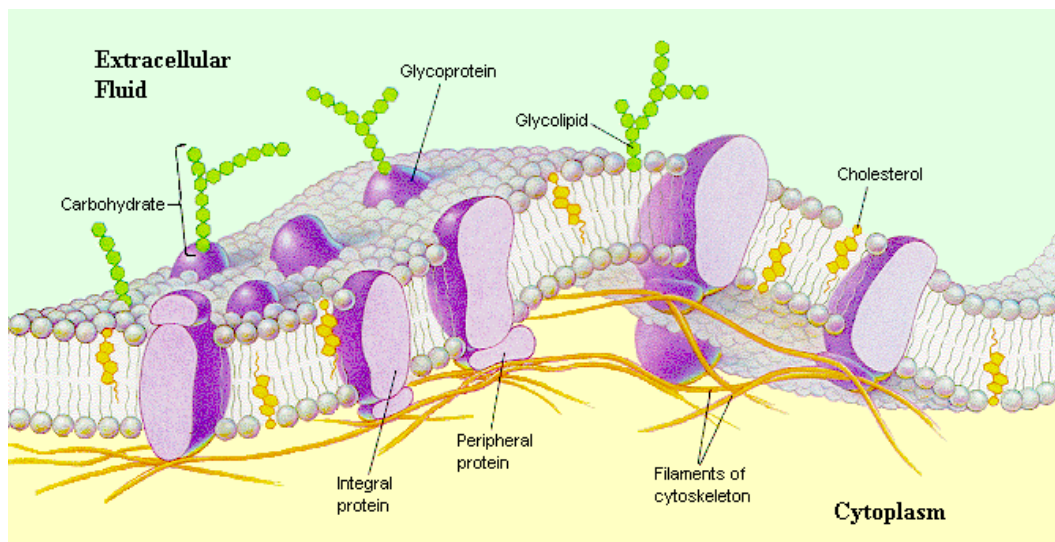


Figura 1.11 Esquema de la membrana lipídica cel·lular

Estudis més recents han revelat que els SLs més complexos (esfingomielina, cerebròsids, gangliòsids) estan implicats tant en la senyalització intracel·lular, com en el reconeixement i en l'adhesió intercel·lulars¹⁵. D'altres estudis han descobert els papers essencials com a mediadors en les cascades de senyalització d'apoptosi, proliferació cel·lular i resposta a l'estrès de la Cer, la SoP o So (Figura 1.8)^{16,17}.

Per tots aquests motius, els SLs constitueixen objectius de recerca i l'aportació d'estrís químic que contribueixin a aclarir el seu paper en biologia cel·lular, tant en condicions fisiològiques com patològiques, són de gran interès.

1.1.2.1 La ceràmida, els glicoesfingolípidos i l'esfingosina-1-fosfat

Fins fa poc la recerca en el camp dels SLs s'havia centrat exclusivament en els membres més complexos, com ara la SM, els cerebròsids i els gangliòsids, degut a l'important paper que juguen en l'estructura cel·lular i les interaccions cèl·lula-cèl·lula¹⁸. En els últims anys, però, l'interès pels SLs més senzills (Figura 1.8) com la Cer¹⁶ i la SoP¹⁷ i també pels GSLs, ha augmentat molt, doncs s'ha comprovat que tenen un paper molt important en la regulació del creixement, la diferenciació i la mort cel·lular.

La ceramida (Figura 1.8) és el SL més abundant, sobretot en la pell humana. Constitueix aproximadament el 35% total de lípids de la capa apical de la pell¹⁹⁻²², on juga un paper de manteniment de la barrera hidrofòbica i de les propietats d'unió de l'aigua a la capa més externa de la pell^{23,24}. La seva estructura química consisteix en una base esfingoide de cadena llarga (en cèl·lules de mamífers hi predominen les de 18 carbonis) unida a un àcid gras mitjançant un enllaç amida. Una característica estructural és la presència d'un doble enllaç de configuració *trans*²⁵ en les posicions C4-C5. Aquesta insaturació és un requeriment crucial que confereix a la ceramida la capacitat de modular tot un seguit de funcions biològiques fonamentals²⁶.

La Cer de la membrana actua influenciant l'ordenació lipídica, afectant tant la seva porositat²⁷ com la seva permeabilitat²⁸. A part de tots els papers metabòlics i estructurals, la Cer també té una important funció com a segon missatger, especialment a través de les vies que s'inicien per estímuls d'estress^{6,27,29,30}.

Els GSLs contenen una part lipídica (Cer) que actua com a ancoratge a la membrana i un carbohidrat (mono o oligosacàrid) orientat extracel·lularment. La seva variabilitat estructural pot venir tant del fragment de carbohidrat, com de la longitud de la cadena del lípid ancorat, com del grau d'insaturació o hidroxilació d'aquest lípid. Recentment, s'ha demostrat que aquests compostos són importants en diversos fenòmens biològics com el reconeixement i l'adhesió cel·lular³¹. La composició en GSLs depèn de cada espècie i també del tipus de cèl·lula. Així, els gangliòsids són molt abundants en les cèl·lules neuronals³².

Quan existeixen variacions importants dels nivells de GSLs es produeixen malalties com, per exemple, les glicoesfingolipidosis. Aquestes malalties, poc freqüents però generalment mortals, estan causades per deficiències en els enzims degradatius, que comporten una acumulació de GSLs en les cèl·lules³³. Aquesta acumulació ocasiona una sèrie de trastorns a nivell neuronal que condueixen a la mort del pacient als pocs anys de vida. També la metàstasi tumoral està associada a alteracions en el metabolisme de GSLs, que promouen l'adhesió i migració cel·lulars i la formació de tumors secundaris.

El GSL més senzill, la Glucosilceramida (GlcCer) (Figura 1.8), es biosintetitzava a partir de la Cer per transferència d'una unitat de UDP-Glucosa a l'hidroxil del C1 de la Cer³⁴. La formació de GlcCer es produeix a la cara citosòlica de l'aparell de Golgi o en el compartiment de Pre-Golgi³⁵ (Figura 1.12), de manera que la Cer, i en part també la dihidroceramida (DHCer), han de ser transportades del reticle endoplasmàtic a l'aparell

de Golgi. La introducció d'una unitat de galactosa a la GlcCer per a formar la lactosilceramida (LacCer) i la formació posterior dels gangliòsids es produeix al mateix aparell de Golgi però a la cara luminal. Els gangliòsids es formen a partir dels GSLs, per introduccions successives d'àcid siàlic en diferents posicions, generalment prenent com a punt de partida la molècula de LacCer o d'altres, conduint a diferents combinacions de productes.

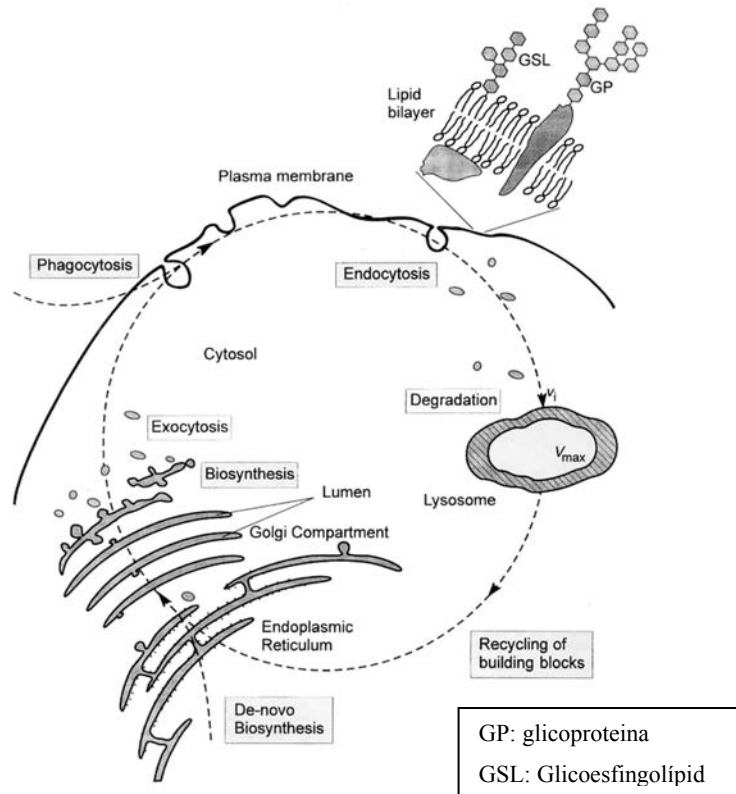


Figura 1.12 Diagrama del fluxe metabòlic intracel·lular de SLs

Un cop sintetitzats, els GSLs són transportats a través de l'aparell de Golgi fins a la membrana plasmàtica mitjançant vesícules³⁶.

Els GSLs, juntament amb les glicoproteïnes (GP) i glicosaminoglicans, formen una capa a l'exterior de la cèl·lula que la protegeix de la degradació i la fusió incontrolada de membranes^{37,38}. Els derivats glicosilats presents a la membrana poden canviar amb el creixement cel·lular, la diferenciació, la transformació viral o l'oncogènesi³⁹ i poden també promoure la interacció amb virus, toxines i bacteris a la superfície cel·lular.

Pel que fa a la SoP (Figura 1.8), té un doble paper de segon i primer missatger¹⁷. La SoP realitza la seva funció de primer missatger actuant extracel·lularment com a lligand en els receptors EDG (ara anomenats receptors SP1-5) situats a la superfície

cel·lular⁴⁰. Aquests receptors s'expressen de manera diferent segons el teixit i es troben acoblats a un tipus de proteïna G, que regulen diverses vies de transducció de senyals. Com a resultat de la unió, la SoP pot activar diverses vies de transducció segons quina sigui la cèl·lula o fins i tot, dins la mateixa cèl·lula, provocant diferents efectes.

La implicació de la SoP com a segon missatger es realitza a través d'un mecanisme intracel·lulars implicats en processos de proliferació cel·lular i en la supressió de l'apoptosi⁴¹. Per exemple, es coneix que una gran varietat de factors de creixement, citoquines i oncoproteïnes, que presenten una funció reconeguda com a inductors de la proliferació cel·lular i/o de la diferenciació, activen l'esfingosina quinasa provocant un augment en els nivells intracel·lulars de SoP.

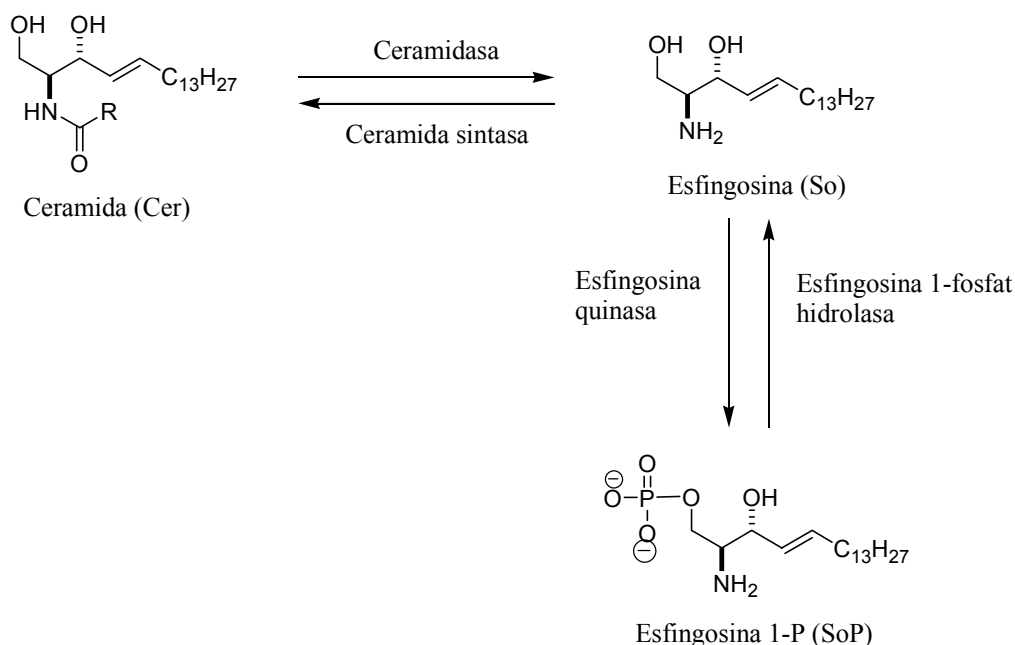


Figura 1.13 Via de reciclatge i formació de ceramida i esfingosina 1-P (SoP)

La SoP es forma per fosforilació de l'esfingosina, la qual prové de la hidròlisi de la Cer per les ceramidases⁴² (Figura 1.13). Al contrari de la Cer, l'esfingosina, que només es forma a través del catabolisme de Cer, és capaç de difondre fàcilment per les membranes.

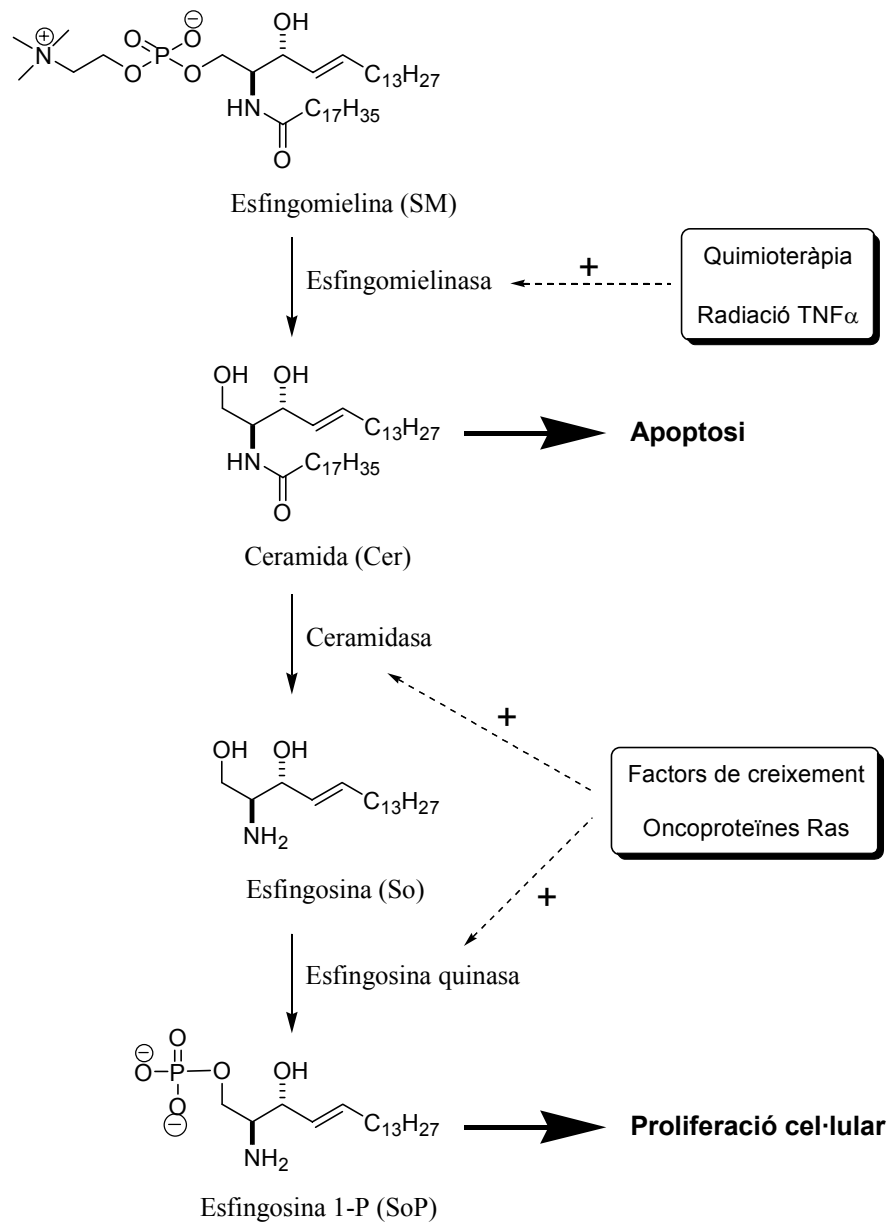


Figura 1.14 Metabolisme d'esfingolípids

Tal com es mostra a la Figura 1.14, l'esfingomielina no és només un component estructural de membrana, sinó que també actua com a precursor de la ceramida i la SoP⁴³. Tal com s'ha esmentat més amunt, mentre que la Cer indueix processos d'apoptosi, la SoP participa en processos de proliferació i contraresta l'apoptosi provocada per un augment de Cer^{44,45}. Així doncs, sembla que un acurat control entre els nivells intracel·lulars d'aquests dos lípids a través d'aquesta via d'interconversió és el que decideix el destí de la cèl·lula. Aquest mecanisme de regulació de la resposta a

l'estrès⁴⁶, que ha estat conservat durant l'evolució, es coneix amb el nom de reostat de SLs⁴⁵.

La producció de ceramida a partir de la hidròlisi d'esfingomielina es produeix, a més de com a resposta a l'estrès, també per tractament amb fàrmacs quimioteràpics com la *daunorubicin* o la *retinamida*⁴⁷⁻⁴⁹ o per radioteràpia. L'augment dels nivells de ceramida endògena indueix apoptosi de les cèl·lules tumorals. Ara bé, la Cer pot ser hidrolitzada, per acció de ceramidases, a esfingosina, que és ràpidament fosforilada per acció d'una esfingosina quinasa per obtenir SoP. Aquesta situació, promou la proliferació cel·lular i inhibeix l'apoptosi en cèl·lules tumorals⁵⁰. Com que aquest balanç entre la concentració intracel·lular de Cer i SoP determina el destí cel·lular cap a la proliferació o cap a l'apoptosi, els enzims implicats en aquests processos són dianes potencials de nous fàrmacs anticancerosos.

1.1.3 Les dessaturases

En les últimes quatre dècades, el mecanisme utilitzat per les dessaturases d'àcids grassos ha fascinat a molts investigadors. Els químics bioorgànics estan particularment interessats en la capacitat de les dessaturases per oxidar una cadena alifàtica no activada de forma químic-, regio- i estereoselectiva⁵¹. Les dessaturases d'àcids grassos són enzims que catalitzen la introducció de dobles enllaços en una cadena alifàtica mitjançant l'abstracció de dos hidrogens i el concurs d'oxigen molecular, el qual es reduït completament a aigua⁵² (Figura 1.15). Tant la sintasa d'àcids grassos dels cloroplasts de les plantes com les més complexes presents al citoplasma dels animals, llevats i fongs produeixen àcids grassos saturats, els quals són convertits en àcids grassos insaturats mitjançant la introducció de dobles enllaços en reaccions catalitzades per aquestes dessaturases. Tanmateix, alguns bacteris, com l'*Escherichia coli*, presenten una sintasa d'àcids grassos capaç d'introduir dobles enllaços durant la biosíntesi d'aquests a través de precursors olefinics⁵³.

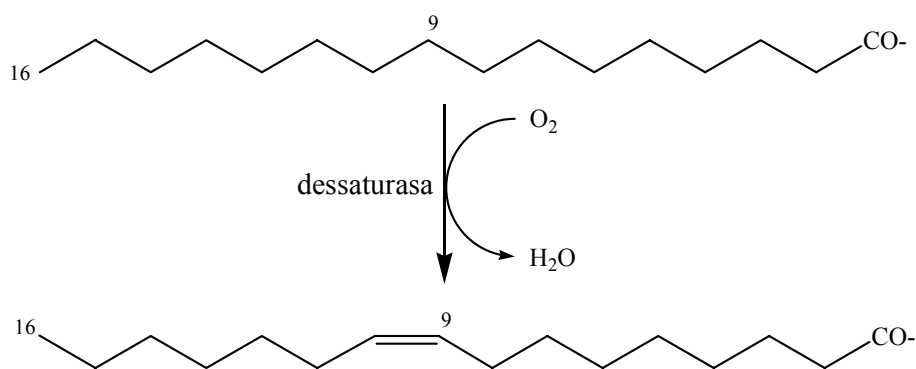


Figura 1.15 Dessaturació de l'àcid palmític catalitzada per la Δ^9 -dessorasa per formar l'àcid (Z)-9-palmitoleic

La distribució d'aquestes dessorases és gairebé universal i tenen un paper important en la biosíntesi de lípids.

L'arribada d'un ambient aeròbic fa milions d'anys va permetre als organismes eucariotes, cianobacteris i alguns bacils portar a terme la desaturació de cadenes alifàtiques mitjançant aquests enzims únics. La desaturació oxidativa requereix molta més energia que l'anaeròbica, tanmateix la transició des de la fermentació anaeròbica a la respiració aeròbica rendeix una eficiència energètica molt superior, tot produint un excedent d'energia, aprofitada en altres processos com la desaturació.

Tal com hem vist a la introducció, aquesta reacció enzimàtica desperta un especial interès en la formació de les feromones sexuals d'insectes, així com en la desaturació d'àcids grassos, garantint un funcionament correcte de les membranes⁸, i en la biosíntesi de PUFAs, utilitzats com a precursors de molècules biològicament actives.

1.1.3.1 Tipus de dessorases

Existeixen dues classes de dessorases d'àcids grassos evolutivament diferenciades⁵⁴:

- 1) Una forma soluble, que es troba present en plantes
- 2) Les dessorases integrades a la membrana del reticle endoplasmàtic, presents en cèl·lules de llevat, animals, fongs i cianobacteris

Les dessaturases solubles són molt més estables que les de membrana; aquest fet fa que s'hagin pogut aïllar amb més facilitat i el seu estudi hagi estat més complet, tot permetent l'obtenció de la seva estructura de raigs X^{55,56}. La segona classe està molt més estesa a la natura. El fet de ser-hi presents en llevat i en cianobacteris suggereix que probablement van sorgir primer i que les dessaturases solubles del citosol són posteriors. Tot i això, degut a les dificultats de caire tècnic que implica l'obtenció de grans quantitats de proteïna de membrana purificada, el seu estudi ha estat molt poc desenvolupat. El clonatge del primer gen de dessaturasa, la Δ^9 estearoïl-CoA dessaturasa (Δ^X on X representa la posició on s'insereix el doble enllaç respecte l'extrem carboxilat) que catalitza la transformació de l'àcid esteàric a àcid oleic, va ser possible gràcies a l'ingent treball de purificació portat a terme per Strittmater i col⁵⁷. Actualment, sense tenir encara una estructura de raigs X d'aquest tipus de proteïna, és molta la informació que s'ha recopilat gràcies a l'adveniment de la biologia molecular.

Els àcids grassos com a tal no són admesos com a substrat d'aquests enzims, és a dir, no són dessaturats *in vivo*, sinó que són modificats pel seu extrem carboxilat mitjançant la unió en forma d'èster a una molècula portadora. Tot atenent als diferents tipus de molècula hom pot trobar tres tipus de dessaturases⁵⁸:

- *Acil-lípid dessaturases*: en plantes i cianobacteris, moltes d'aquestes transformacions són catalitzades per aquesta classe de dessaturases, les quals introdueixen un doble enllaç sobre àcids grassos enllaçats als residus hidroxilats dels glicerolípid.
- *Acil-ACP dessaturases*: aquest tipus es troba present en plastidis i cèl·lules de plantes i introdueixen el primer doble enllaç sobre cadenes d'àcids grassos unides a la proteïna portadora de grups acil (ACP, *acyl carrier protein*).
- *Acil-CoA dessaturases*: estan presents en cèl·lules animals, de llevat i en fongs i introdueixen insaturacions en molècules d'àcid gras unides al coenzim A (CoA).

1.1.3.2 Característiques bioquímiques

L'abstracció d'hidrogens en una cadena alifàtica no activada, tan difícil químicament, requereix el trencament d'un enllaç C-H aïllat. L'enllaç C-H d'un grup metilè és un dels més estables en els sistemes vius, no en va els éssers estan formats per cadenes hidrocarbonades, afortunadament estables. L'energia de trencament d'aquest

enllaç és de 98 Kcal·mol⁻¹. Aquesta energia està fora de l'abast de les reaccions catalitzades únicament per aminoàcids. Per tant, es necessària la presència d'un cofactor metàl·lic per aprofitar el poder oxidant de l'oxigen i trencar aquest enllaç tot iniciant la modificació de la cadena. Sorprenentment, en canvi, s'abstreu dos hidrogens, però no s'introdueix cap molècula d'oxigen a la cadena. Bloomfield i Bloch⁵⁹ van mostrar que la conversió d'un enllaç simple a un de doble, a més d'oxigen, requereix una cadena de transport d'electrons. Això indica que el procés de dessaturació és un procés oxidatiu en eucariotes.

1.1.3.2.1 Sistemes de transport electrònic

Tant les dessaturases integrades a membrana en plastidis com les solubles depenen d'una proteïna ferredoxina [2Fe-2S] soluble com a agent donador d'electrons⁶⁰. Cada doble enllaç requereix 2 electrons, cedits pel NADPH.

Pel cas de les proteïnes solubles, sota condicions fotosintètiques, la ferredoxina és reduïda pel fotosistema I, mentre que durant la foscor o en plastidis fotosintèticament inactius, els electrons provenen del NADPH via la ferredoxina:NADPH oxidoreductasa, la qual es tracta d'una flavoproteïna soluble.

Les dessaturases unides a membrana generalment utilitzen el citocrom b₅, el qual rep els electrons del NADH, o en part del NADPH, via dues flavoproteïnes lligades a membrana com són la NADH:citocrom b₅ oxidoreductasa i, probablement molt menys important en aquest context, la NADPH:citocrom P₄₅₀ oxidoreductasa⁶¹. L'esquema de formació de dobles enllaços catalitzada per aquests enzims es mostra a la Figura 1.16.

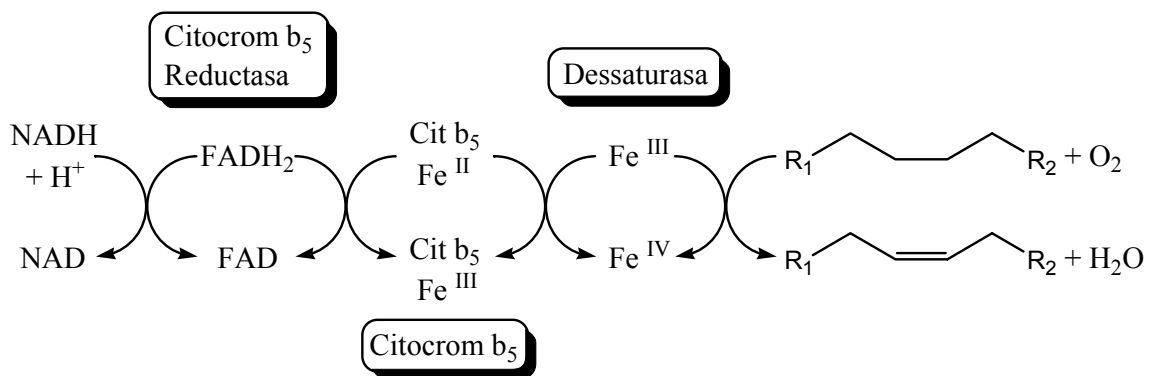


Figura 1.16 Formació de dobles enllaços catalitzada per dessaturases. Es mostren els components de la cadena de transport electrònic.

Una altra diferència entre aquests dos sistemes de dessaturació són els potencials electroquímics dels portadors d'electrons implicats. Per a la ferredoxina:NADPH oxidoreductasa, el potencial (E°) és de -420 mV, mentre que per a la NADH:citocrom b_5 oxidoreductasa, el potencial és de -24 mV. Tanmateix, en el sistema lligat a la membrana del reticle endoplasmàtic, la freqüència d'interacció és augmentada perquè el moviment dels components està restringit a les dues dimensions, mentre que en el sistema soluble del citoplasma, el moviment està estès a les 3 dimensions i per tant la probabilitat d'interacció disminueix⁵⁴.

1.1.3.2.2 Cofactor metàl·lic: presència de dos àtoms de ferro

Com ja s'ha comentat abans, l'abstracció de dos àtoms d'hidrogen d'una cadena carbonada no activada és un procés extremadament energètic que requereix el concurs d'un cofactor metàl·lic. Ara bé, quin és aquest àtom o agrupació d'àtoms metàl·lics present al centre actiu de les dessaturases?

Els primers estudis portats a terme sobre aquests enzims^{57,62,63} van demostrar que la seva activitat era sensible a agents quelants de metalls, inhibida per cianur, a més de l'azida sòdica, tot essent insensible al CO, resultat que suggeria que no es tractava d'un cofactor de tipus hemo. L'aïllament del cDNA que codifica la Δ^9 -estearoil-ACP-*dessaturasa* va permetre la sobreexpressió de la mateixa en *E. coli* i la purificació de suficient quantitat per a la seva caracterització biofísica⁶⁴. Les anàlisis d'aquestes dades van revelar la presència de ferro, concretament de dos àtoms de ferro per mol de *dessaturasa*.

Estudis més avançats tot utilitzant les espectroscòpies de Mössbauer⁶⁵ i de Raman⁶⁶ en combinació amb seqüències descrites d'aminoàcids, han demostrat que, efectivament, aquests enzims presenten una agrupació de dos àtoms de ferro units entre sí per un pont de tipus oxo (Fe-O-Fe) o hidroxio (Fe-OH-Fe) situats a l'interior d'una esfera de coordinació formada per lligands nitrogenats i oxigenats. S'estaria parlant, per tant, d'un complex de tipus μ -oxo-diferro. Els lligands coordinants són de tipus bidentat: els aminoàcids glutàmic i aspàrtic per l'oxigen i la histidina pel nitrogen (Figura 1.17).

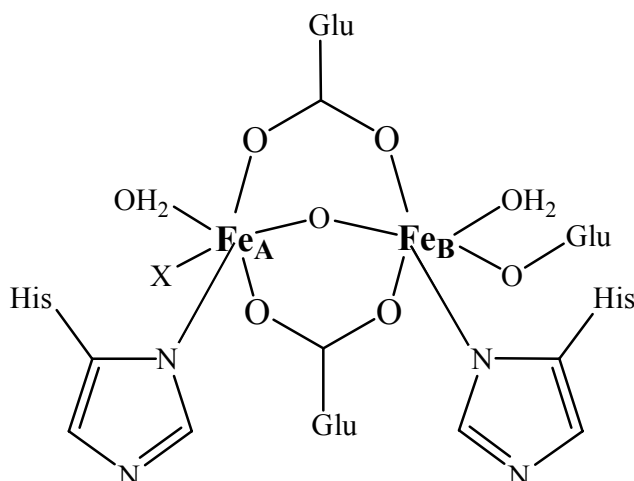


Figura 1.17 Estructura proposada del complex μ -oxo-diferro; s'aprecien els diferents residus d'histidina i d'àcid glutàmic que formen part de l'esfera de coordinació

Aquests tipus d'agrupació s'ha trobat en diferents enzims els quals catalitzen reaccions molt similars. Els complexos de μ -oxo-diferro probablement catalitzen la dessaturació amb obtenció de geometria *trans*^{66,67}, conjugació⁶⁸, hidroxilació⁵⁴, epoxidació, acetilació⁶⁹, descarbonilació⁷⁰, a més de la clàssica formació de dobles enllaços de geometria *cis*⁵⁶. A part dels grups acil, metà⁷¹ i anells aromàtics, altres substrats inclouen esterols⁷², esfingolípid⁶⁷, aldehids⁷⁰, etc.

1.1.3.2.3 Presència de tres regions conservades d'histidines

Excepte per les dessaturases que empren l'ACP com a molècula portadora, les quals presenten una seqüència aminoacídica no relacionada amb les altres, tant les acil-CoA dessaturases com les acil-lípid dessaturases en tots els organismes presenten tres regions altament conservades riques en histidines (8 en total)^{73,74}. És de ressaltar que tant la Δ^9 -dessaturasa de rata i de paparra com les Δ^6 , Δ^{12} i Δ^{15} dessaturases de plantes superiors i cianobacteris presenten les tres mateixes regions de seqüència primària que contenen residus d'histidina (regions Ia, Ib i II):

- La regió Ia està formada per una seqüència del tipus $HX_{(3-4)}H$
- La regió Ib està representada per una seqüència $HX_{(2-3)}HH$
- Per últim, la regió II presenta una seqüència $HX_{(2-3)}HH$

Martin i col⁷³, tot treballant amb dessaturases de llevat i de rata, van proposar un model en el qual cada proteïna presenta grans dominis hidrofòbics, cadascun capaç de travessar la membrana endoplasmàtica dos cops, de tal forma que els tres dominis hidrofílics restants, els quals contenen les tres regions de residus d'histidina, resideixen en la cara citoplasmàtica de la membrana del reticle endoplasmàtic.

Qualsevol mutació en un dels vuit residus d'histidina fa que l'organisme no pugui viure a no ser que se li facilitin els àcids grassos insaturats necessaris pel seu desenvolupament; és a dir, es perd tota l'activitat de dessaturació. De la mateixa forma, si es porten a terme mutacions en qualsevol dels altres residus no conservats d'histidina, l'organisme és capaç de créixer ja que és capaç d'efectuar la dessaturació⁷⁴. Això suggereix que les histidines presenten un paper fonamental en el mecanisme catalític. Una de les possibilitats és que actuïn com a lligands dels àtoms de ferro del centre actiu. La presència de residus d'histidina propers en l'espai permet aquest fet. Existeixen suficients residus d'aquest aminoàcid en aquestes seqüències com per a actuar de lligands de dos àtoms de ferro.

1.1.3.2.4 Mecanisme catalític

El mecanisme catalític encara no està del tot clar. Estudis realitzats sobre l'enzim metà monooxigenasa (MMO), responsable de l'oxidació del metà a metanol⁷⁵ mitjançant la participació d'una agrupació de tipus μ -oxo-diferro, demostren la participació d'una espècie altament oxidant com és el Fe(IV).

El mecanisme catalític complet és el que es mostra a la Figura 1.18, tot substituint la molècula de metà per una cadena alifàtica⁷¹.

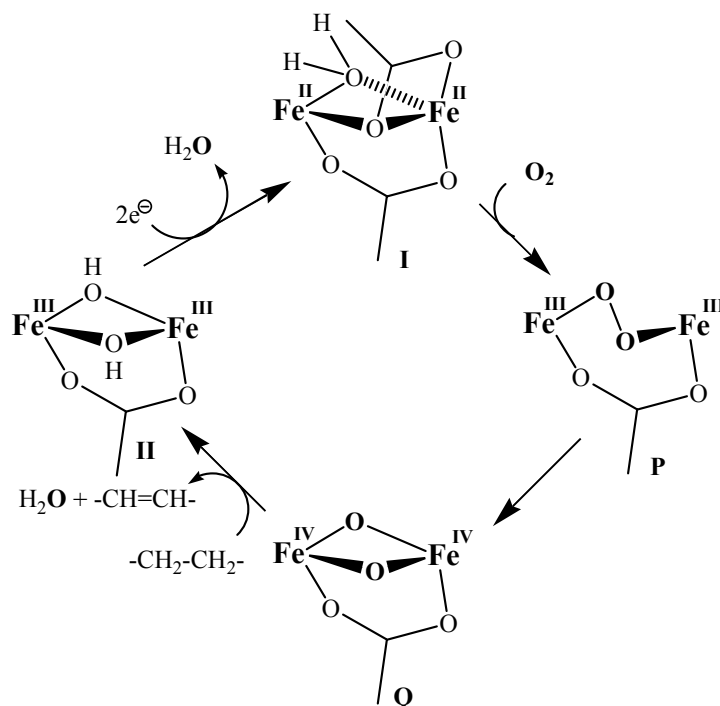


Figura 1.18 Mecanisme proposat per la formació de dobles enllaços catalitzada per desaturases, on es poden apreciar els diferents estats d'oxidació del ferro que es troba coordinat amb residus de Glu. No es mostren els residus d'histidina

En estat no actiu, la primera forma que hom troba és **II**, en la qual els dos àtoms de ferro presenten un estat d'oxidació (III) i estan units per un pont d'oxigen formant el complex μ -oxo-diferro. L'activació és iniciada per la cessió de 2 electrons per part del NADH mitjançant la NADH:citocrom b_5 oxidoreductasa, donant la forma reduïda **I** on cada àtom ferro té un estat d'oxidació (II).

Posteriorment, una molècula d' O_2 s'uneix als dos centres metàl·lics donant lloc a un complex μ -peroxo (**P**), on els àtoms de ferro tornen a presentar un estat d'oxidació (III), el qual pateix una reorganització per donar pas al complex catalíticament actiu i de valència alta bis- μ -oxo-diferro (**Q**), on els àtoms de ferro es troben en un inusual estat d'oxidació (IV). Aquesta forma altament oxidant és la responsable de l'abstracció dels dos àtoms d'hidrogen, els quals, en combinació amb un dels àtoms d'oxigen, donarà lloc a una molècula d'aigua, mentre que el segon àtom d'oxigen procedent de l' O_2 molecular es queda formant part del complex μ -oxo-diferro (**II**), el qual, mitjançant el concurs de dos electrons, alliberarà una segona molècula d'aigua, tot formant **I** i reiniciant novament el cicle.

Respecte el mecanisme d'abstracció dels àtoms d'hidrogen, semblaria que el més plausible podria ser un de tipus radicalari. En la dessaturació anaeròbica, es forma un intermedi hidroxilat, el qual, posteriorment, és deshidratat i isomeritzat a geometria *cis* o *trans*, segons el cas. Tanmateix, en el cas de la dessaturació d'àcids grassos de forma aeròbica no s'ha pogut detectar aquest compost hidroxilat. Experiments recents mostren que el mecanisme hidroxilació/dessaturació és inconsistent amb els experiments de marcatge obtinguts amb àcids grassos fluorats sobre la Δ^9 esteroïl-CoA dessaturasa de llevat. En canvi, mitjançant estudis d'efecte isotòpic s'han obtingut evidències d'un mecanisme d'abstracció directa amb la mateixa dessaturasa⁷⁶. S'ha observat un efecte isotòpic màxim en la posició 9, però no en la posició 10, resultat que suggereix una abstracció seqüencial d'hidrògens tot començant a la posició 9 i, per tant, tot i que encara manquen algunes evidències, no és gratuït aventurar un mecanisme radicalari com el proposat en la Figura 1.19.

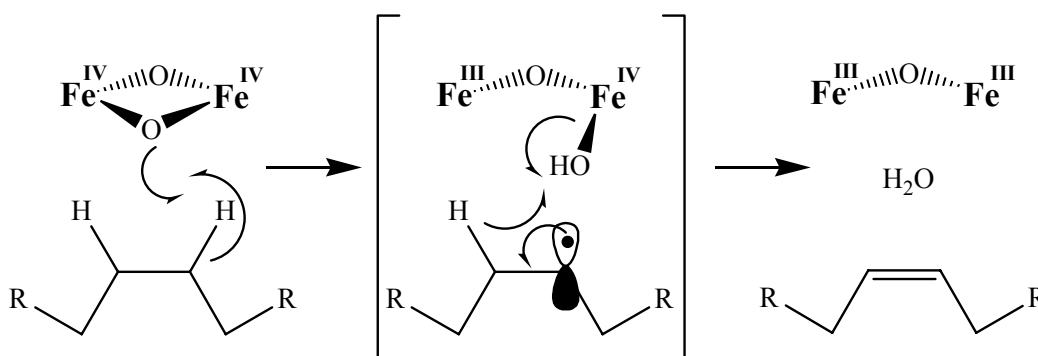


Figura 1.19 Mecanisme proposat per a la dessaturació de cadenes alifàtiques seguint un model radicalari

1.1.3.3 Especificitat de substrat

Les dessaturases presenten la capacitat de reconèixer el nombre d'àtoms de carbonis que conté el substrat, la posició on s'insereix el nou doble enllaç i la existència d'altres dobles enllaços preformats a la cadena. El reconeixement de la longitud de l'àcid gras està determinat, principalment, per les propietats dels residus d'aminoàcids localitzats al final de la cavitat que acomoda el substrat unit a la corresponent molècula portadora.

En contrast amb els enzims solubles, com l'acil-ACP dessaturasa, en els quals la regioespecificitat està determinada respecte el carboni relatiu al carboxilat terminal (és a

dir, parlem de Δ^X dessaturases), les proteïnes de membrana han evolucionat donant fins a tres mètodes diferents de marcatge del doble enllaç emergent⁵⁴:

La posició del doble enllaç està determinada a partir de l'extrem carboxílic terminal, com en el cas de les dessaturases d'ACP, la Δ^9 estearoil-CoA dessaturasa de rata, insectes i llevat, així com la Δ^6 -dessaturasa de cianobacteris.

Alguns cianobacteris amb enzims del tipus Δ^{15} posicionen el doble enllaç tot començant pel metil terminal. Parlem, doncs, de les ω_3 estearoil-CoA dessaturases.

Altres espècies no fan servir cap dels dos marcatges, sinó que comencen a comptar a partir d'un doble enllaç ja format.

Ara bé, com s'acomoda el substrat dins l'enzim? És evident que els carbonis on té lloc l'abstracció dels hidrogens han d'estar disposats de manera que restin a prop dels àtoms de ferro. La determinació de l'estructura cristal·lina proporciona una visió global única de l'enzim, en contrast amb la informació que es pugui extreure espectroscòpicament. En el cas de les dessaturases solubles d'àcids grassos, donada la seva elevada estabilitat, s'ha pogut determinar l'estructura cristal·lina corresponent a la Δ^9 estearoil-ACP dessaturasa de la llavor de garrofer⁵⁵.

A la Figura 1.20 es mostra l'estructura tridimensional (2 subunitats) de la proteïna on es poden apreciar els àtoms de ferro (dos àtoms per cada subunitat) situats al centre actiu de l'enzim, dins d'un entorn altament simètric. L'estructura cristal·lina confirma la coordinació dels àtoms metàl·lics mostrada en la Figura 1.17. Cada àtom de ferro interacciona amb residus de glutàmic i d'histidina i, a més, es troba un residu de glutàmic que coordina els dos àtoms de ferro. Sembla ser que dins de l'estructura terciària de l'enzim existeix una espècie de canal hidrofòbic que representa el lloc d'unió del substrat. Aquest canal s'estén des de la superfície cap a l'interior de cada subunitat, i la forma d'aquest canal situaria la porció d'àcid gras a dessaturar molt a prop del centre difèrric. A més, aquest canal es plega al centre metàl·lic just en un punt corresponent a la inserció del doble enllaç entre la posició 9 i 10, tot justificant l'estereoquímica Z observada en aquesta dessaturació.

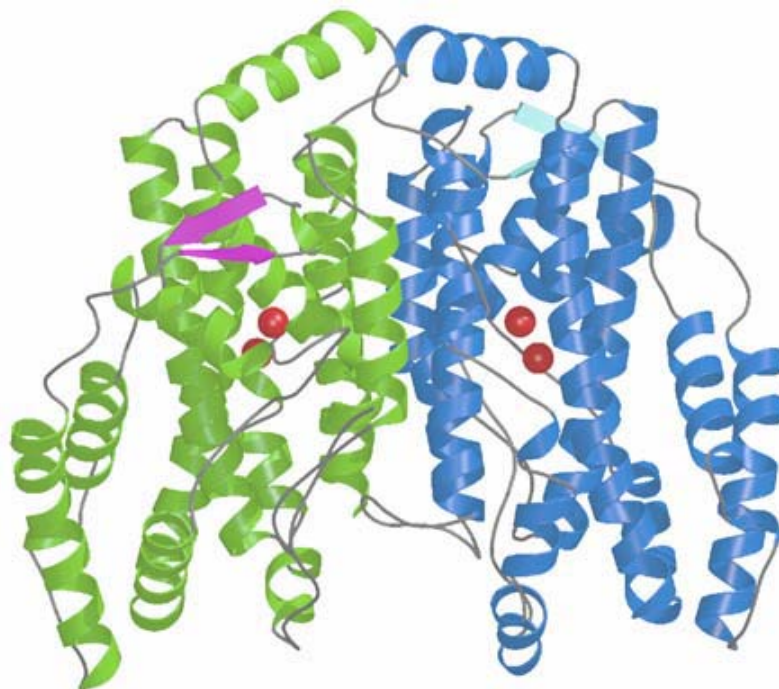


Figura 1.20 Estructura tridimensional de la Δ^9 estearoil-ACP desaturasa de garrofer. Les esferes vermelles representen els àtoms de Fe del centre actiu, contigu al canal hidrofòbic on s'acomoda la cadena alifàtica en el procés de desaturació

Tot i que l'estructura cristal·lina de les desaturases integrades a membrana no s'ha pogut determinar, degut a les dificultats que implica obtenir grans quantitats d'aquest enzim, a més de la inestabilitat inherent que mostren, durant els darrers anys s'han realitzat enormes progressos mitjançant la biologia molecular. Així, s'han identificat trets comuns en els centres actius d'ambdós tipus de famílies, soluble i integrada, en l'especificitat de substrat, en el mecanisme de desaturació, etc.

1.1.3.4 Les desaturases d'àcids grassos d'insectes

La majoria de feromones sexuals en lepidòpters ($\approx 77\%$) són cadenes llargues (entre 10 i 16 àtoms de carboni), mono, di i inclús triinsaturades, i amb un grup funcional oxigenat que normalment és un acetat, un èster, un alcohol o un aldehyd.

L'elevada especificitat de les feromones sexuals ha estat demostrada en moltes espècies de lepidòpters. Aquesta especificitat és normalment aconseguida mitjançant mescles, més que amb un únic compost. La màxima resposta en el comportament depèn, no només de la presència de tots els components de la mescla feromonal⁷⁷, sinó, i el que és més important, de l'adequada i precisa proporció entre els diversos

components⁷⁸. Estudis realitzats sobre la biosíntesi de feromones sexuals en lepidòpters, han mostrat que una combinació d'un nombre reduït de dessaturases juntament amb l'allargament o escurçament de la cadena, pot produir la major part dels components feromonal identificats fins a la data⁷⁹.

Aquestes dessaturases pertanyen a la família de les proteïnes integrades a membrana i, per tant, presenten unes característiques, tant a nivell estructural com a nivell mecanístic, similars a les descrites en l'apartat 1.1.3.2. En lepidòpters, i fins a la data, es coneixen bàsicament set tipus d'aquests enzims: són la Δ^5 , la Δ^9 , la Δ^{10} , la Δ^{11} , la Δ^{12} , la Δ^{13} i la Δ^{14} , destacant, per la seva importància i la seva abundància en moltes espècies, la que forma el doble enllaç en la posició 11 de la cadena i la que actua sobre la posició 9.

L'estudi d'aquests enzims i, en general, els estudis realitzats sobre la biosíntesi de feromones són molt útils en el sentit que defineixen les mesclades de compostos químics emesos pels insectes i estableixen els mecanismes biosintètics responsables de mantenir aquestes proporcions definides. Per comparació de les rutes biosintètiques utilitzades per diferents espècies d'insectes, hom pot arribar a obtenir informació important sobre els mecanismes genètics relacionats amb la producció feromonal. Un complet coneixement dels semioquímics que intervenen en els mecanismes de comunicació hauria de dirigir vers a un desenvolupament de mètodes més efectius en el control de plagues mitjançant la utilització de feromones. A més, el coneixement dels mecanismes enzimàtics implicats en la biosíntesi de feromones hauria de conduir a un programa de control basat en la inhibició d'aquests enzims o en la interferència amb la regulació hormonal; o fins i tot, hauria de permetre el desenvolupament de programes de control basats en l'alteració genètica dels cultius damnificats.

1.1.3.5 La dihidroceramida dessaturasa

L'enzim responsable de la introducció del doble enllaç entre les posicions 4 i 5 de la cadena de 2-amino-1,3-diol s'anomena dihidroceramida dessaturasa (DHCD) i pertany a una família de dessaturases i hidroxilases unides a membrana⁸⁰⁻⁸⁴. Es tracta d'un complex enzimàtic dependent de NADH, format per una flavoproteïna, una citocrom b₅ reductasa i la dessaturasa pròpiament dita (Figura 1.15). L'enzim està orientat a la cara citosòlica del reticle endoplasmàtic⁸² compartint topologia amb les altres dessaturases d'acil-CoA i amb els altres tres enzims implicats en la biosíntesi de

novo de la Cer: la SPT,⁸⁵ la 3-cetoesfinganina reductasa⁸⁵ i l'esfinganina N-aciltransferasa^{85,86}.

Recentment s'han identificat els gens de la Δ^4 -dessaturasa en *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* i *Candida albicans* i una dessaturasa bifuncional de *Mus Musculus*⁸⁴ utilitzant una estratègia bioinformàtica. Aquestes Δ^4 -dessaturases, que formarien part de la família de gens DES, estan involucrades en el control del cicle cel·lular durant l'espermatogènesi de *Drosophila*⁸⁴ i presenten un domini d'esterol dessaturasa. Igual que en la família de les acil-CoA dessaturases, les esterol dessaturases presenten 3 regions riques en histidina que serveixen per a coordinar el clúster de ferro del centre actiu, si bé les cadenes polipeptídiques que separen aquests dominis són de diferent longitud en cada una de les famílies.

Des del punt de vista mecanístic⁸⁷, la DHCD inicia l'oxidació en C4 i, per tant, es va plantejar que un mateix enzim catalitzava la introducció del doble enllaç o del grup hidroxil per a sintetitzar Cer o fitoesfingosina, respectivament. Aquests resultats han estat recentment confirmats en un anàlisi mecanístic i estereoquímic realitzat amb la Δ^4 -dessaturasa de *Candida Albicans*, on s'ha comprovat que l'enzim actua de manera estereo- i regioespecífica arrencant en primer lloc el C(4)-H(*pro-R*) per a formar un intermedi reactiu que pot donar lloc a l'alquè, o per recombinació amb un àtom d'oxigen del centre actiu a l'alcohol secundari de les fitoceramides⁸⁸.

A diferència de les dessaturases d'acil-CoA, l'activitat de la DHCD s'inhibeix amb agents reductors de ponts disulfur, pel que s'ha suggerit l'existència d'un residu de cisteïna essencial per a la catàlisi.

1.2 OBJECTIUS GENERALS

En aquesta tesi s'han abordat estudis sobre dues famílies de lípids: les feromones sexuals d'insectes i els esfingolípid. El nexa d'unió d'un grup amb l'altre han estat les dessaturases. Com s'ha esmentat més amunt, les dessaturases d'àcids grassos són enzims fonamentals en la biosíntesi de les feromones sexuals dels lepidòpters, mentre que la dihidroceramida dessaturasa és un enzim clau en la biosíntesi dels esfingolípid, doncs catalitza la darrera etapa de la biosíntesi de novo de la ceramida, que és l'esfingolípid precursor de tots els altres.

Prenent les dessaturases com a centre d'interès d'aquesta tesi, el treball que es presenta en aquesta memòria està dividit, formalment, en dues parts. En la primera (Capítols 2 i 3), s'estudien aspectes relacionats amb dessaturases de lepidopters. Així, en el Capítol 2 s'investiga la relació entre determinades dessaturases i la variació fenotípica en l'estructura de la feromona sexual de dues espècies del gènere *Thaumetopoea* i es demostra que la producció d'un complex feromonal concret es deu, més que a la existència de dessaturases altament específiques, a la presència de substrats determinats.

Tenint en compte la baixa especificitat d'algunes acil-CoA dessaturases, i per tal d'aportar més dades sobre l'abast de les reaccions catalitzades per aquests enzims, en el Capítol 3 s'estudia l'activitat de la Δ^{11} -dessaturasa de l'*Spodoptera littoralis* sobre substrats ciclopropànics, i es demostra la formació de metilenciclopropans.

Amb la finalitat d'extendre aquestes investigacions a d'altres dessaturases d'interès biològic, ens proposarem estudiar els requeriments estructurals del substrat de la dihidroceramida dessaturasa. Per tal d'obtenir un elevat nombre d'anàlegs per aquests estudis d'especificitat, es pensà en l'aplicació de les tècniques de química combinatòria. En relació amb aquesta temàtica, en el Capítol 4 d'aquesta tesi es descriu una metodologia per a la síntesi de quimioteques d'anàlegs de ceramides, i la seva aplicació per a la preparació d'una col·lecció exploratòria per tal d'estudiar la especificitat pel substrat de la dihidroceramida dessaturasa.

***2.- ESTUDI COMPARATIU DE LA BIOSÍNTESI DE LES
FEROMONES SEXUALS DE THAUMETOPOEA
PITYOCAMPA I THAUMETOPOEA PROCESSIONEA***

2. ESTUDI COMPARATIU DE LA BIOSÍNTESI DE LES FEROMONES SEXUALS DE THAUMETOPOEA PITYOCAMPA I THAUMETOPOEA PROCESSIONEA

2.1 INTRODUCCIÓ

Les processionàries de la zona mediterrània són lepidòpters del gènere *Thaumetopoea*, el qual pertany a la família de les *Thaumetopoeidae*. Deuen el seu nom comú, processionària, al fet que, quan es troben en el seu estat d'eruga, es traslladen l'una darrera l'altra en llargues fileres amb l'aparença de processó.

Ambdues espècies no representen un perill important en el seu estat de papallona. Ara bé, en la fase d'eruga, esdevenen una plaga molt danyosa tant per pinedes, en el cas de la processionària del pi, com per rouredes, en el cas de les processionàries del roure (Figura 2.1). A més de constituir una important plaga per aquestes coníferes i arbres de fulles marcescents o caduques, aquests insectes originen problemes en la salut de les persones, degut a la presència d'un seguit de pèls especialment al·lèrgens, que apareixen a mode de defensa quan es troben en el seu estat nimfal, pèls que produeixen irritacions dèrmiques de caràcter sever i, en casos extrems, greus afeccions als ulls.



Figura 2.1 Fotografia d'una femella de processionària del roure

En general, tot atenent a les diferents estructures químiques emprades com a feromona sexual, un estudi comparatiu revela l'existència de dos grups diferenciats dins el gènere *Thaumetopoea*⁸⁹:

- En el primer grup, la feromona sexual presenta un diè conjugat com a component majoritari, tal com succeeix en *T. processionea*, *T. bonjeani*, *T. pinivora* i *T. solitaria*.
- En el segon grup, la feromona és un ení conjugat, estructura que presenten la *T. pityocampa*, la *T. wilkinsoni* i la *T. jordana*.

2.1.1 La processionària del pi

Com s'acaba d'exposar en línies precedents, la processionària del pi, lepidòpter pertanyent a la família de les Thaumetopoeidae, representa una de les plagues més importants dels boscos de pins en els països mediterranis, on hom pot apreciar les enormes bosses blanquinoses situades preferentment a la brancada d'aquestes coníferes tan abundoses.

L'any 1981, Guerrero i col⁹⁰ van identificar l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil, **I**, com a component únic de la feromona sexual de la processionària del pi. Era el primer exemple d'una feromona sexual amb estructura d'ení (Figura 2.2).

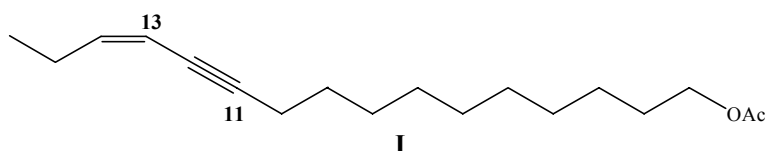


Figura 2.2 Estructura de tipus ení corresponent a la feromona sexual de la processionària del pi

A partir d'aquest descobriment i durant els anys posteriors es va estudiar intensament la biosíntesi d'aquest component a la glàndula feromonal de l'insecte, tot arribant a la conclusió, mitjançant un seguit d'estudis realitzats amb precursors marcats amb deuteri i amb isòtops radioactius⁹¹⁻⁹³, que la biosíntesi començava a partir de l'àcid palmític, el qual era dessaturat en la posició 11 mitjançant el concurs d'una Δ^{11} -dessaturasa, tot fornint l'àcid (Z)-11-hexadecenoic **III** (Figura 2.3).

Aquest àcid monoinsaturat segueix dos camins diferents. Per una part, és sotmès a una segona dessaturació, aquest cop en la posició 13, mitjançant una dessaturasa única, només trobada en aquesta família, del tipus Δ^{13} -dessaturasa, tot obtenint l'àcid diènic conjugat (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic, **II**. Per altra banda, el mateix (Z)-11-hexadecenoat és dessaturat de nou en la posició 11 mitjançant un enzim inèdit en animals, tot i que present en diverses plantes, com és ara una acetilenasa, la qual abstrau 2 hidrògens que es troben sobre un alquè, per donar lloc a l'acetilè **IV**. Aquest acetilè, per mitjà de la Δ^{13} -dessaturasa, acaba donant l'ení abans esmentat, l'àcid (Z)-13-hexadecen-11-ínic, **V**, el qual és reduït i acetilat a través d'una reductasa i d'una acetil transferasa, respectivament, per acabar donant l'acetat **I**.

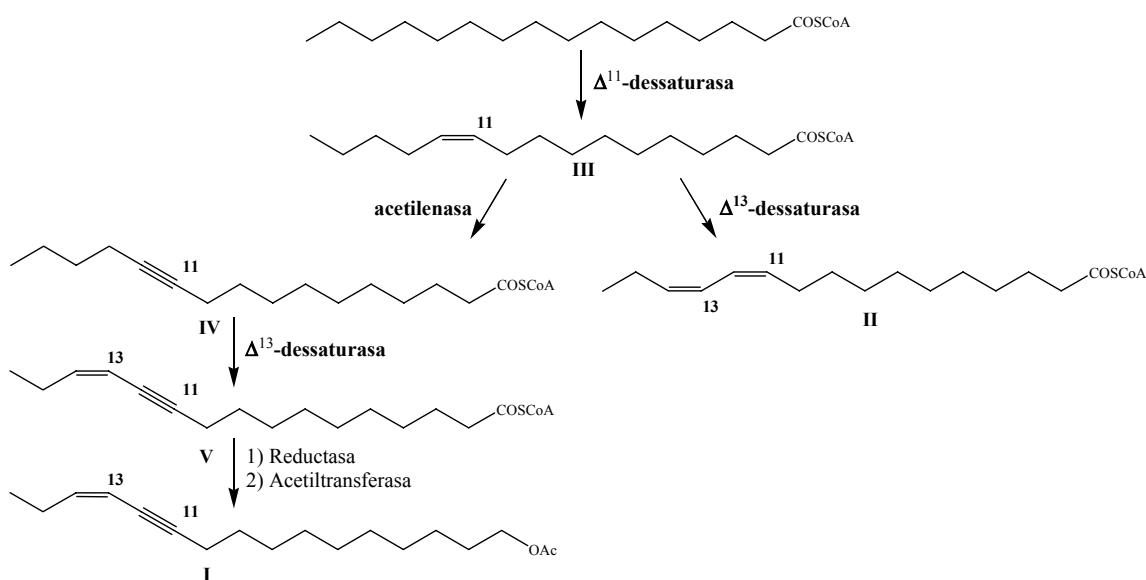


Figura 2.3 Biosíntesi de la feromona sexual de la processionària del pi

D'aquesta ruta en cal destacar dos trets:

- Tot i que el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat de metil ha estat identificat en els extractes lipídics glandulars esterificats amb KOH/MeOH⁹², els corresponents acetat, alcohol o aldehid no es troben presents en la feromona sexual⁹⁴; de la mateixa manera succeeix amb l'acetilè, suggerint la presència d'una reductasa específica de l'ení.
- Per altra banda, es podria pensar que el dienoat **II** podria ser el precursor de l'ení mitjançant l'acció de l'acetilenasa. Tanmateix, s'ha comprovat que el precursor real del component majoritari és l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, intermedi format per l'acció, aquest cop sí, de l'acetilenasa⁹³ sobre l'àcid (Z)-11-hexadecenoic, **III**.

2.1.2 La processionària del roure

De la mateixa forma que la processionària del pi representa una plaga molt important per les zones de pinars, la processionària del roure, *T. processionea*, ho és per les zones de rouredes.

En el seu complex feromonal⁸⁹ s'ha identificat l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, **VI**, i el corresponent alcohol lliure, **VII**, en una proporció 9:1 (Figura 2.4).

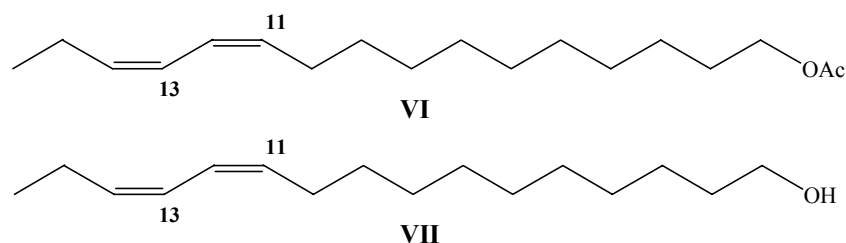


Figura 2.4 Estructura dels components identificats en la feromona sexual de la processionària del roure

Com es pot observar, mentre que la processionària del pi presenta el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat a la glàndula feromonal, la seva feromona no conté els corresponents alcohol, aldehyd o acetat. En canvi, la processionària del roure no disposa de cap estructura de tipus ení, per bé que és capaç de biosintetitzar el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat, igual que la processionària del pi. Però, a diferència de la processionària del pi, el diè sí que es troba en forma d'alcohol i d'acetat en la feromona sexual.

2.2 OBJECTIUS

Amb aquests antecedents, els objectius plantejats en aquest capítol són dos:

1. Desxiframent de la ruta biosintètica que rendeix el component majoritari de la feromona sexual de processionària del roure, l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, **VI**. Com a hipòtesi de treball, la ruta biosintètica proposada parteix de l'àcid palmític, el qual, mitjançant successives dessaturacions en les posicions 11 i 13, utilitzant sengles Δ^{11} i Δ^{13} dessaturases, respectivament, condueix a l'intermedi diènic el qual és finalment reduït i acetilat per donar el component majoritari, **VI**, tal com es pot veure a la Figura 2.5.
2. Estudi de les bases bioquímiques que regeixen la variació fenotípica trobada en ambdues espècies pel que fa a les estructures dels seus components feromonal. És a dir, quin són els factors que determinen que la processionària del roure no utilitzi una estructura de tipus ení i per què la processionària del pi no presenta cap derivat del (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat.

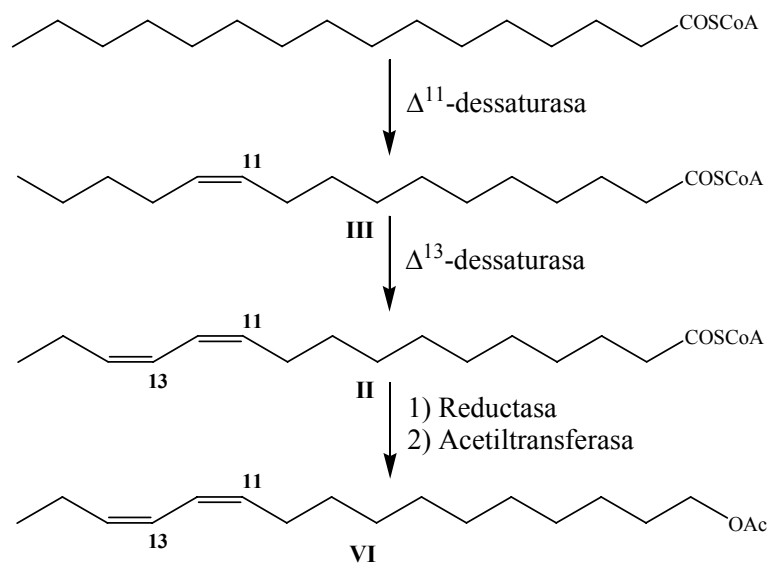


Figura 2.5 Ruta biosintètica proposada per a la formació del complex feromonal en *T. processionea*

2.3 RESULTATS

Per tal de portar a terme l'estudi de la biosíntesi de la feromona sexual era necessari disposar de tots els possibles precursors marcats, com són l'àcid [16,16,16-²H₃]-hexadecanoic (d₃16:Acid), per tal de veure quants compostos marcats es formaven a partir del precursor inicial, l'àcid [13,13,14,14,15,15,16,16,16-²H₉]-(*Z*)-11-hexadecenoic (d₉(*Z*)-11-16:Acid), per tal de demostrar l'activitat Δ^{13} -dessaturasa, que forneix el diè majoritari i l'àcid [15,15,16,16,16-²H₅]-(*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic (d₅(*Z,Z*)-11,13-16:Acid), a fi de demostrar que aquest diè és el precursor immediat de l'acetat.

Al nostre laboratori es disposava tant del d₃16:Acid com del d₉(*Z*)-11-16:Acid preparats per la Dra M. Barrot^{93,95} i del d₅(*Z,Z*)-11,13-16:Acid preparat per Dr. S. Rodriguez⁹⁶.

2.3.1 Estudis de marcatge

Els experiments es van realitzar *in vivo*, tot aplicant cada producte dissolt en DMSO sobre la glàndula feromonal de l'insecte.

En els primers experiments, es va determinar la incorporació de marcatge en intermedis biosintètics a partir del d₃16:Acid i del d₉(*Z*)-11-16:Acid. Un cop finalitzades les incubacions, es van tallar les glàndules feromonals, s'extragueren els lípids i els extractes lipídics es metanolitzaren tal com s'especifica a la part experimental. Els extractes resultants, que contenen els èsters metílics dels àcids grassos que componen els lípids glandulars, s'analitzaren per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (CG-EM) en mode SIM, tot seleccionant les masses dels diferents èsters metílics marcats (273, d₃16:Me i d₇(*Z,Z*)-11,13-16:Me; 271, d₃(*Z*)-11-16:Me, 269, d₃(*Z,Z*)-11,13-16:Me; 277, d₉(*Z*)-11-16:Me).

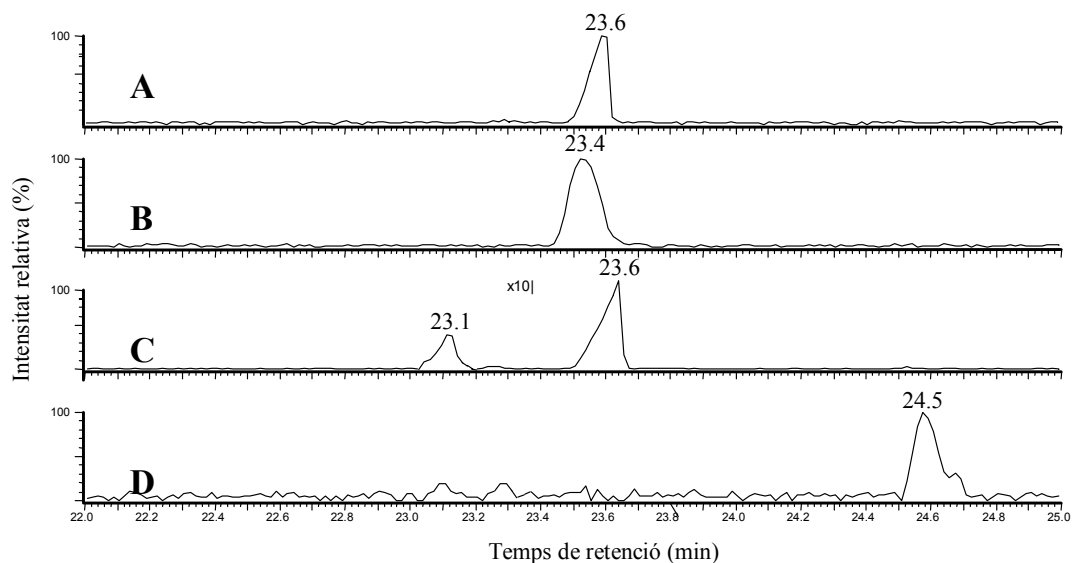


Figura 2.6 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *T. processionea* tractades amb d_3 16:Acid (cromatogrames B-D) o amb dimetilsulfòxid (control) (cromatograma A). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: d_3 16:Me ($m/z=273$, $t_R=23,4$ min, cromatograma B); (Z)-[16,16,16- 2H_3]-11-hexadecenoat de metil ($m/z=271$, $t_R=23,1$ min, cromatograma C); (Z,Z)-[16,16,16- 2H_3]-11,13-hexadecadienoat de metil ($m/z=269$, $t_R=24,5$ min, cromatograma D). El palmitoat de metil natural elueix a un $t_R=23,6$ min ($m/z = 270$, cromatogrames A i C)

En el cas d'utilitzar el d_3 16:Acid com a precursor deuterat, els cromatogrames de CG-EM revelaren la formació de dos productes no presents als controls (Figura 2.6), de m/z 271 i 269, els quals eluïen poc abans del (Z)-11-hexadecenoat de metil i el (Z,Z)-11,13-16:Me endògens, respectivament, i que per tant, es van atribuir als corresponents èsters metílics deuterats. Aquest resultat demostrava que l'àcid palmític era el precursor dels àcids (Z)-11-hexadecenoic i (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic.

En el cas d'emprar el d_9 (Z)-11-16:Acid, s'observà en els cromatogrames de CG-EM (Figura 2.7) l'aparició d'un nou producte a m/z 273, tampoc present als controls, que presentava un temps de retenció lleugerament menor que el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat de metil i que, per tant, s'assignà al dienoat heptadeuterat.

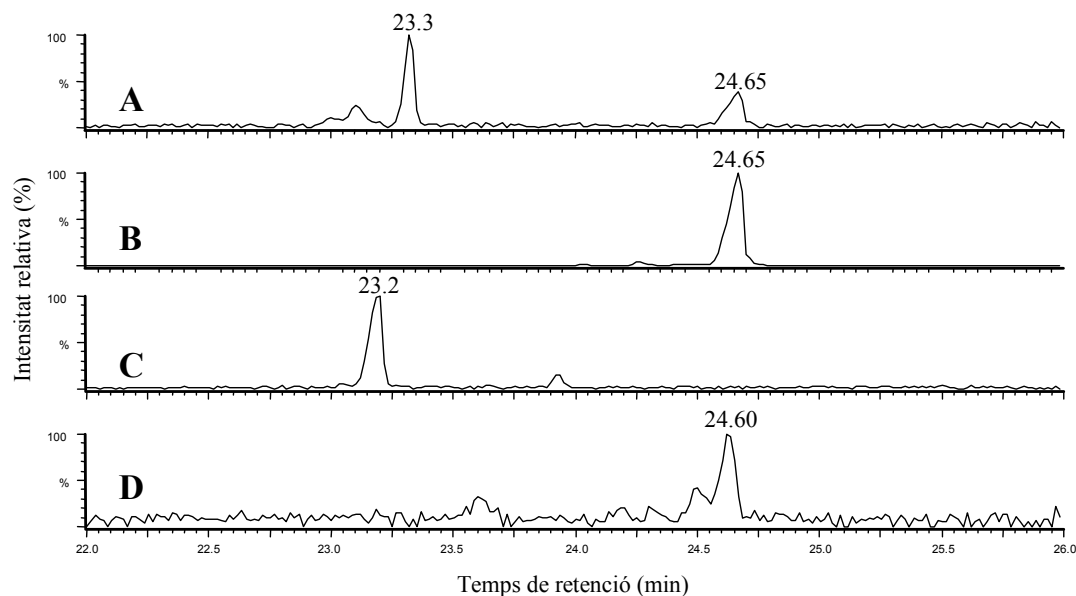


Figura 2.7 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *T. processionea* tractades amb $d_9(Z)$ -11-16:Acid (cromatogrames C i D) o amb dimetilsulfòxid (control, cromatogrames A i B). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: $d_9(Z)$ -11-16:Me ($m/z=277$, $t_R=23,2$ min, cromatograma C); $d_7(Z,Z)$ -11,13-16:Me ($m/z=273$, $t_R=24,60$ min, cromatograma D); (Z) -11-16:Me ($m/z=268$, $t_R=23,3$ min, cromatograma B); (Z,Z) -11,13-16:Me ($m/z = 266$, $t_R=24,65$ min cromatograma A)

Així doncs, quedava demostrat que l'àcid (Z,Z) -11,13-hexadecadienoic, **II**, prové de l'acció d'una Δ^{13} -dessaturasa sobre l'àcid (Z) -11-hexadecenoic, **III**, tot confirmant que la biosíntesi d'aquest diè té lloc igual que a la processionària del pi.

Per tant, la ruta biosintètica proposada per a la formació de la feromona sexual de l'espècie *T. processionea* és l'anteriorment mostrada a la Figura 2.5. Tot partint de l'àcid palmític, una Δ^{11} -dessaturasa transforma aquest en l'àcid monoènic **III**, el qual és dessaturat de nou, aquest cop en la posició 13 a través d'una Δ^{13} -dessaturasa.

A fi de demostrar que l'àcid diènic, **II**, és reduït i acetilat a la feromona final, en una segona tanda d'experiments es va investigar la formació de feromona deuterada a partir del $d_5(Z,Z)$ -11,13-16:Acid. En aquest cas, un cop finalitzades les incubacions, es van separar les glàndules feromonals i s'extragué la feromona, tal com es detalla a la part experimental. L'anàlisi dels extractes resultants per CG-EM no evidenciava la formació de feromona marcada.

Existeixen precedents bibliogràfics que demostren que la formació de feromona marcada a partir de qualsevol precursor requereix l'estimulació amb el pèptid activador de la biosíntesi⁹⁷ (PBAN, *Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide*). Aquest el

es cas, per exemple, de la processionària del pi⁹⁸. Per tant, els experiments es van repetir tot introduint una etapa d'estimulació de la biosíntesi per injecció de PBAN. En aquest cas, sí que es va detectar la feromona deuterada en les anàlisis per CG-EM (Figura 2.8) on es constatà, en els cromatogrames corresponents, la presència d'un producte a m/z 285, absent en els controls (incubació amb DMSO i estimulació amb PBAN), que presentava un temps de retenció lleugerament inferior al de l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil i que, per tant, s'assignà a la feromona pentadeuterada.

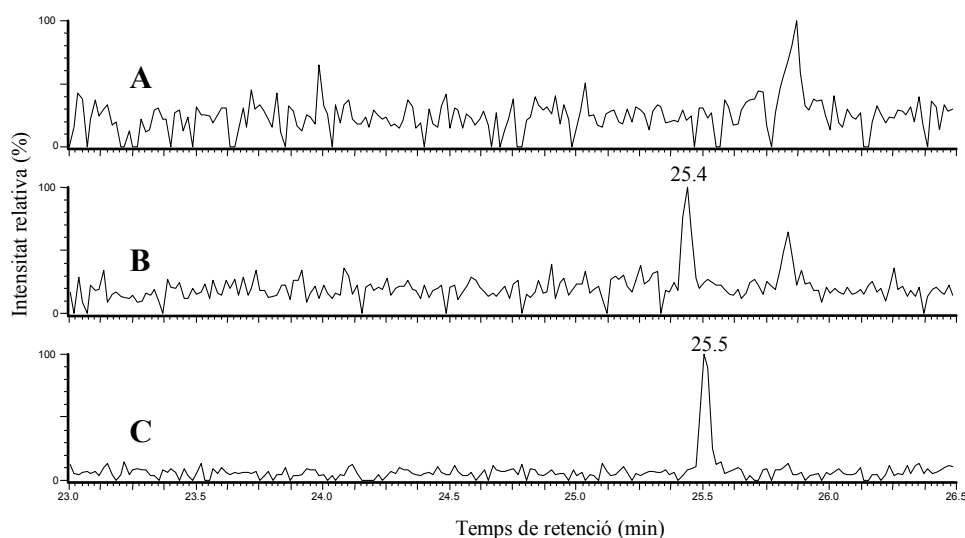


Figura 2.8 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb d_5 (Z,Z)-11,13-16:Acid i a continuació, amb PBAN (cromatogrames B i C) o amb dissolució salina (cromatograma A). En el cromatograma B es mostra l'acetat de d_5 (Z,Z)-11,13-hexadecadienil a un $t_R=25,4$ min (m/z 285), mentre que en el cromatograma C es mostra el diè natural a un $t_R=25,5$ min (m/z 280)

La mateixa metodologia experimental es va aplicar després d'incubar les glàndules feromonals amb d_3 16:Acid i d_9 (Z)-11-16:Acid. En ambdós casos, en els cromatogrames de CG-EM corresponents, s'observà la presència d'un producte a m/z 283 (incubacions amb d_3 16:Acid, Figura 2.9) o 287 (incubacions amb d_9 (Z)-11-16:Acid, Figura 2.10), ambdós absents en els controls (incubació amb DMSO i estimulació amb PBAN), que eluïa poc abans que l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil. Per tant, ambdós productes s'assignaren als acetats marcats en cada cas.

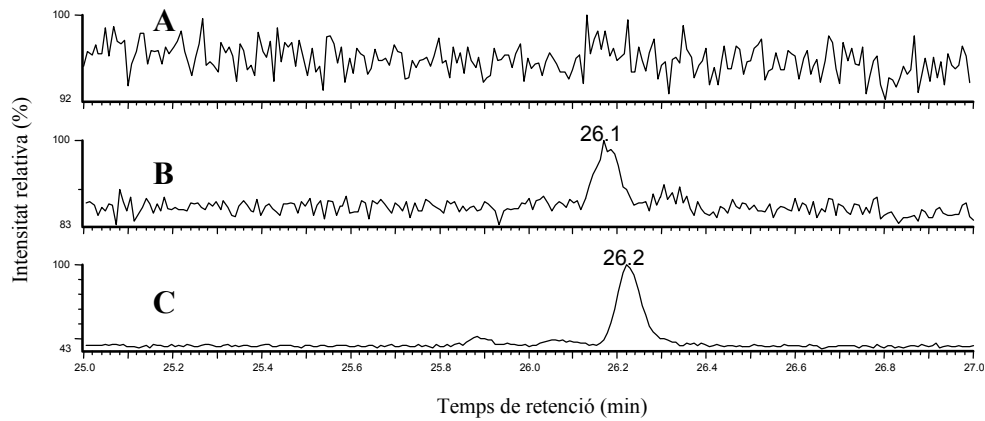


Figura 2.9 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb d_3 16:Àcid i a continuació, amb PBAN (cromatogrames B i C) o amb dissolució salina (cromatograma A). Es mostra l'acetat de d_3 (Z,Z)-11,13-hexadecadienil a un $t_R=26,1$ min (m/z 283), i el diè natural a un $t_R=26,2$ min (m/z 280)

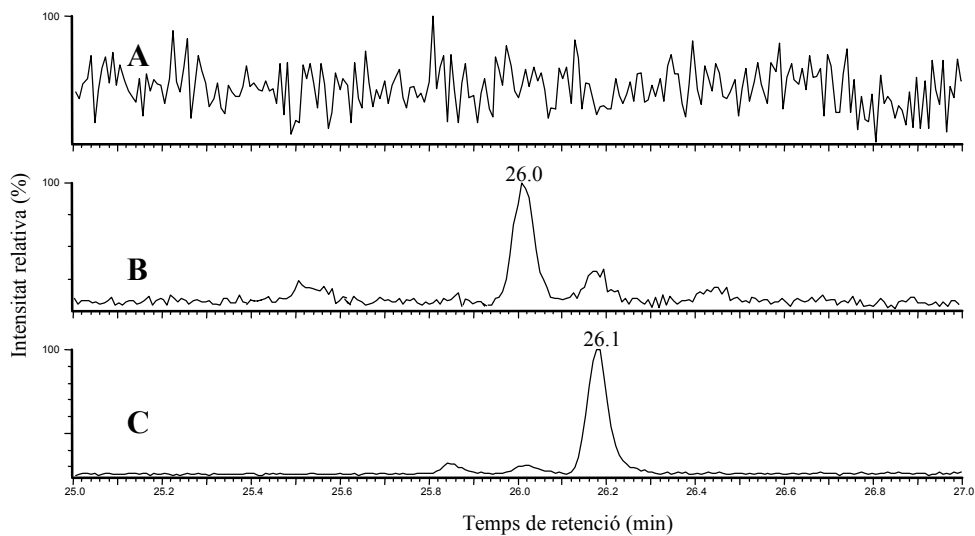


Figura 2.10 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb d_9 (Z)-11-16:Àcid i a continuació amb PBAN (cromatogrames B i C) o amb dissolució salina (cromatograma A). Es mostra l'acetat de d_7 (Z,Z)-11,13-hexadecadienil a un $t_R=26,0$ min (m/z 287), i el diè natural a un $t_R=26,1$ min (m/z 280)

Tot atenent els resultats obtinguts, es fa palès que ambdues espècies d'insectes biosintetitzen les seves feromones sexuals a partir de l'àcid palmític, el qual és dessaturat mitjançant una Δ^{11} -dessaturasa a àcid (Z)-11-hexadecenoic, **III**. Aquest àcid és dessaturat de nou, aquest cop en la posició 13 mitjançant una Δ^{13} -dessaturasa, que

fins el moment no s'ha descrit en cap altre ésser viu, tot fornint l'àcid diènic (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic, **II**, tal com es mostra a la Figura 2.11.

A partir de **III**, les dues rutes esdevenen diferents, ja que en la *T. pityocampa*, l'acció d'un enzim únic, concretament una acetilenasa, transforma l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic, **III**, en l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, d'estructura alquínic. Posteriorment, sobre aquest substrat actua la Δ^{13} -dessaturasa abans esmentada, tot proporcionant l'àcid (*Z*)-13-hexadecen-11-inoic, **V**, que presenta una estructura d'ení. La posterior reducció d'aquest ení seguida de l'acetilació de l'alcohol obtingut, proporciona l'acetat **I**, el qual és la feromona sexual de la *T. pityocampa*.

Ara bé, en aquest darrer insecte, ni l'àcid dienoic **II**, ni cap dels intermedis biosintètics ha pogut ser detectat en els extractes feromonal en forma d'acetat, alcohol o qualsevol altra forma reduïda del grup carboxilat⁹⁴. Contràriament, en *T. processionea*, aquest àcid dienoic conjugat és reduït i acetilat per donar el compost majoritari de la feromona sexual.

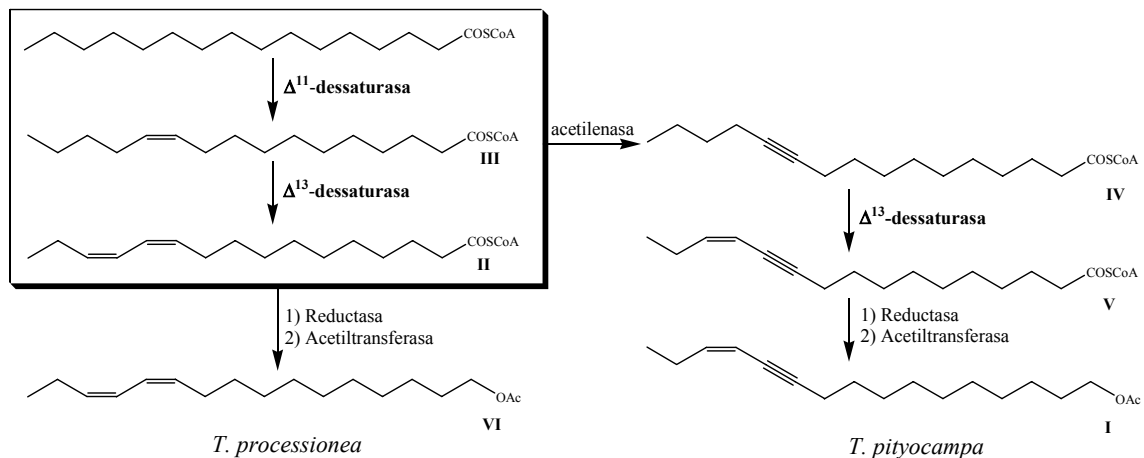


Figura 2.11 Comparació de les rutes biosintètiques de *T. processionea* i *T. pityocampa*. A l'interior del quadre es troben els intermedis comuns en ambdues espècies

En aquest punt, es va considerar d'interès investigar les causes d'aquesta variació fenotípica entre els dos insectes. Per això, es van dissenyar experiments dirigits a respondre les qüestions següents: (1) si la *T. processionea* presenta una Δ^{13} -dessaturasa, és capaç de sintetitzar l'ení V a partir de l'acetilè IV administrat de forma exògena?; i (2) en cas afirmatiu, quina és l'especificitat de la reductasa pel substrat en *T. processionea*? És possible que aquesta espècie produeixi la feromona sexual de la

processionària del pi si s'administren els precursors adequats, l'acetilè IV o l'ení V, de forma exògena?

2.3.2 Formació de l'ení V en *T. processionea*

Una de les qüestions plantejades era si la *T. processionea*, la qual disposa d'una Δ^{13} -dessorasa, igual que la *T. pityocampa*, és capaç de dessaturar un precursor acetilènic per donar l'estructura d'ení, tal com succeeix en la processionària del pi. (Figura 2.12). A fi d'investigar aquesta possibilitat, es van realitzar assaigs *in vivo*, tot incubant glàndules feromonals de *T. processionea* amb l'àcid 11-hexadecinoic, IV.

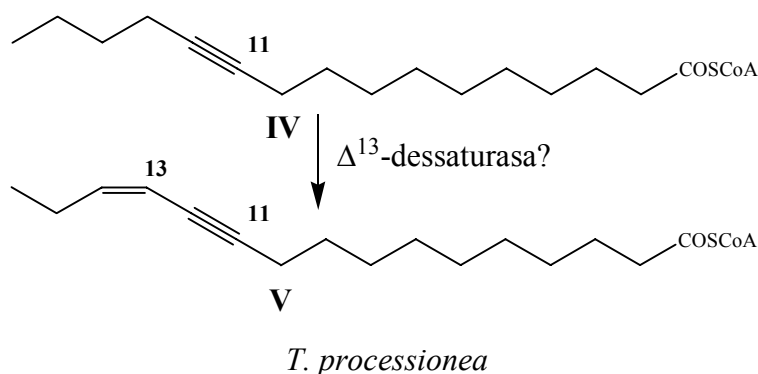


Figura 2.12 Possible dessaturació de l'alquí IV en femelles de *T. processionea*, mitjançant la Δ^{13} -dessorasa, per obtenir el corresponent ení V, present en femelles de *T. pityocampa*

Els teixits es tractaren de la forma habitual per tal d'obtenir els èsters metílics dels intermedis biosintètics. En les anàlisis per CG-EM, els extractes de teixits tractats amb l'alquí presentaven dos nous productes no presents als extractes control, que corresponien, d'una forma inequívoca per comparació amb una mostra sintètica, al (*Z*)-13-hexadecen-11-inoat de metil, V, i a l'11-hexadecinoat de metil de partida, IV, tal com es pot apreciar a la Figura 2.13.

Per tant, quedava demostrat que la Δ^{13} -dessorasa de *T. processionea*, era capaç d'actuar, de la mateixa forma que la Δ^{13} -dessorasa de *T. pityocampa*, sobre una unitat d'11-hexadecinoat tot rendint l'ení corresponent.

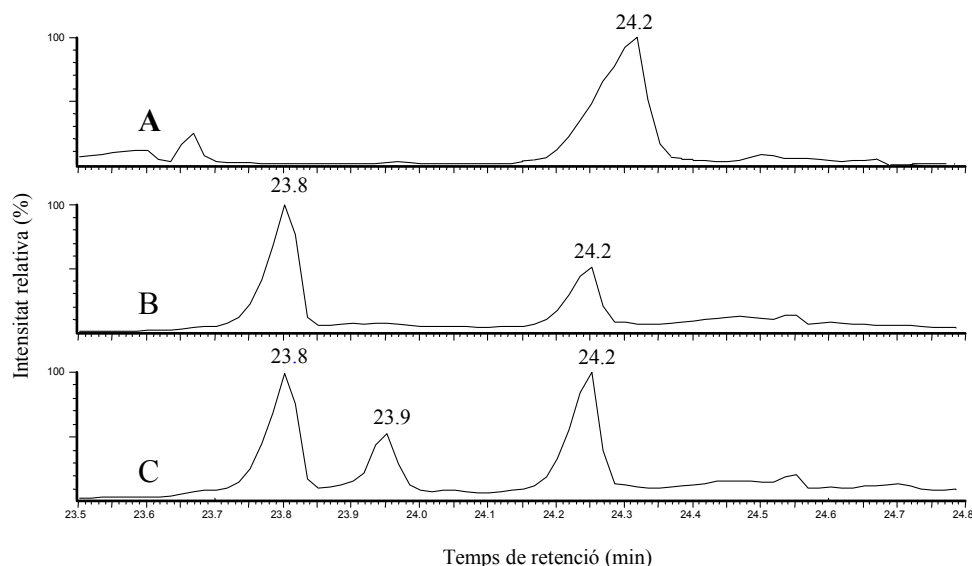


Figura 2.13 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *T. processionea* tractades amb l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, (cromatogrames B i C) o amb dimetilsulfòxid (control) (cromatograma A). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: 11-hexadecinoat de metil ($m/z=81$, $t_R=23,8$ min, cromatograma B); (*Z*)-13-hexadecen-11-inoat de metil ($m/z=79$, $t_R=23,9$ min, cromatograma C). El de (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoat de metil natural elueix a un $t_R=24,2$ min (m/z 280).

2.3.3 Conversió dels àcids 11-hexadecinoic i (*Z*)-13-hexadecen-11-inoic en els corresponents acetats en *T. processionea*

Com s'ha esmentat més amunt, la *T. processionea*, però no la *T. pityocampa*, és capaç de reduir l'àcid (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic, **II**, a l'alcohol precursor de la seva feromona, **VII**. Una altra de les qüestions a resoldre era si, a diferència de la *T. pityocampa*, la *T. processionea* era capaç de reduir tant l'11-hexadecinoat, **IV**, com el (*Z*)-13-hexadecen-11-inoat, **V**, als corresponents alcohols **VIII** i **I**, respectivament, si s'administraven de forma exògena. (Figura 2.14).

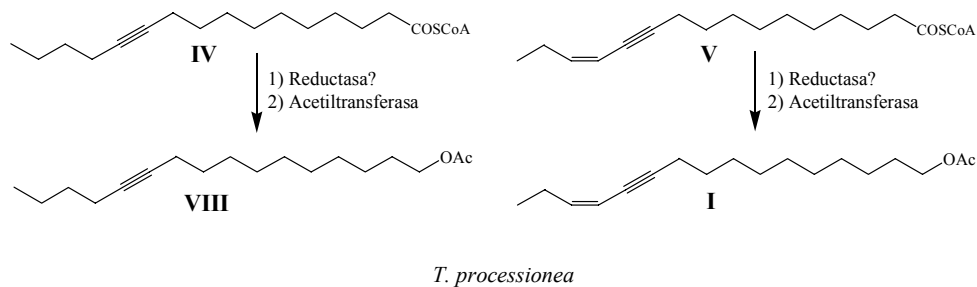


Figura 2.14 Possible reducció i acetilació en *T. processionea* dels intermedis presents a *T. Pityocampa*, **IV** i **V**

Es van realitzar experiments similars als descrits a l'apartat 2.3.1, però amb els àcids 11-hexadecinoic, **IV**, i (Z)-13-hexadecen-11-inoic, **V**, tot estimulant la producció de feromona per injecció de PBAN i tractant els teixits per tal d'obtenir la feromona sexual.

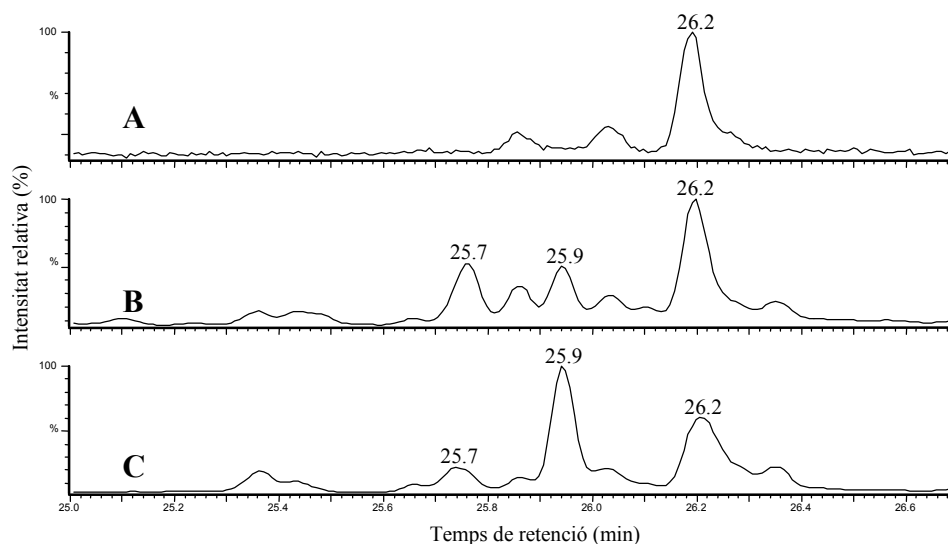


Figura 2.15 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb àcid 11-hexadecinoic (cromatogrames B i C) o amb dimetilsulfòxid (cromatograma A) i posteriorment injectades amb PBAN (no es mostra el cromatograma control sense PBAN). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: l'acetat d'11-hexadecinil, a un $t_R=25,7$ min ($m/z=81$, cromatograma C); l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil, a un $t_R=25,9$ min ($m/z=79$, cromatograma C); i el diè natural, l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, a un $t_R=26,2$ min ($m/z=280$, cromatograma A)

Els extractes orgànics van ser analitzats per CG-EM. En el cas de l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, els cromatogrames de CG-EM (Figura 2.15) presentaven dos productes, absents en els extractes control, que s'assignaren, per comparació tant dels temps de retenció com dels espectres de masses amb mostres sintètiques, als dos acetats **VIII** i **I**. El primer procediria de la reducció i acetilació successives de l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, i el segon, de la reducció i acetilació de l'àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic, **V**, format *in vivo* per acció de la Δ^{13} -dessaturasa sobre l'alquí subministrat.

Per altra banda, en el cas de la utilització de l'ení **V** com a substrat de partida, també aquí els cromatogrames de CG-EM presentaven un nou producte, no detectable en els controls, que corresponia a l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil, **I**, feromona sexual de *T. pityocampa*, tal com es pot observar a la Figura 2.16.

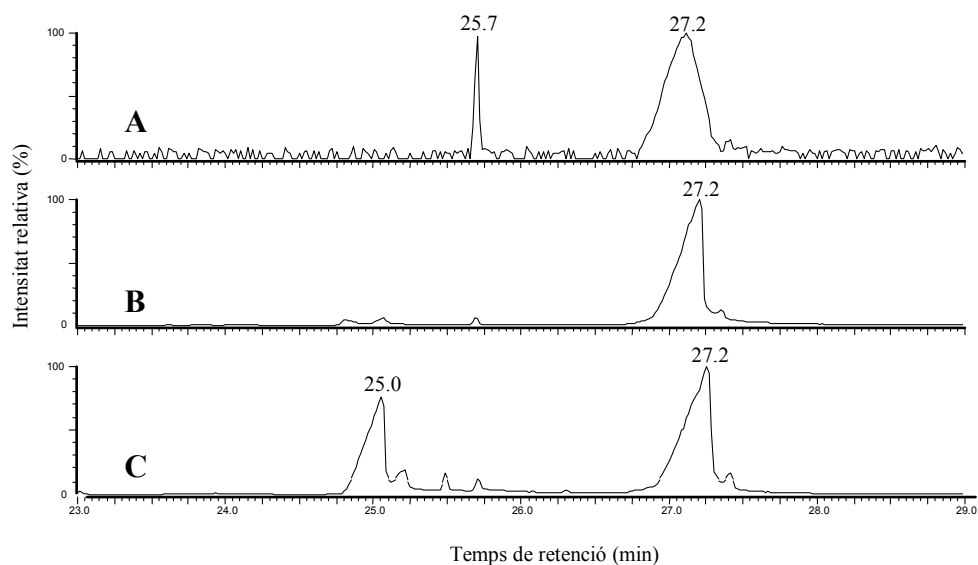


Figura 2.16 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb àcid (*Z*)-13-hexadecen-11-inoic (cromatogrames B i C) o amb dimetilsulfòxid (cromatograma A) i posteriorment injectades amb PBAN (cromatogrames A i C) o amb dissolució salina (cromatograma B). Els productes que es mostren en els cromatogrames són l'acetat de (*Z*)-13-hexadecen-11-inil, a un $t_R=25,0$ min (cromatograma C) i el diè natural, l'acetat de (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienil, a un $t_R=25,7$ min (cromatograma A).

2.3.4 Formació de l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic, **51**, a partir de l'àcid 11-tridecinoic, **49**, en *S. littoralis*

Arribat a aquest punt, es va pensar en la possibilitat que una espècie filogenèticament allunyada de les processionàries fos capaç de produir l'estructura d'ení, tan característica d'una part de la família de les Thaumetopoidae. Es va escollir, per disponibilitat al nostre grup, l'espècie *S. littoralis*, de la família dels Noctuidae. Aquesta arna biosintetitzava la seva barreja feromonal tot combinant reaccions de dessaturació i de β -oxidació (vegeu Figura 3.2). Entre les dessaturases implicades, hi ha una Δ^9 -dessaturasa que transforma l'àcid (*E*)-11-tridecenoic, **50**, en l'àcid (*Z,E*)-9,11-tridecadienoic. Per tant, es va plantejar determinar si aquesta Δ^9 -dessaturasa era capaç de catalitzar la formació de l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic, **51**, a partir de l'àcid 11-tridecinoic, **49**, tal com es mostra a la Figura 2.17.

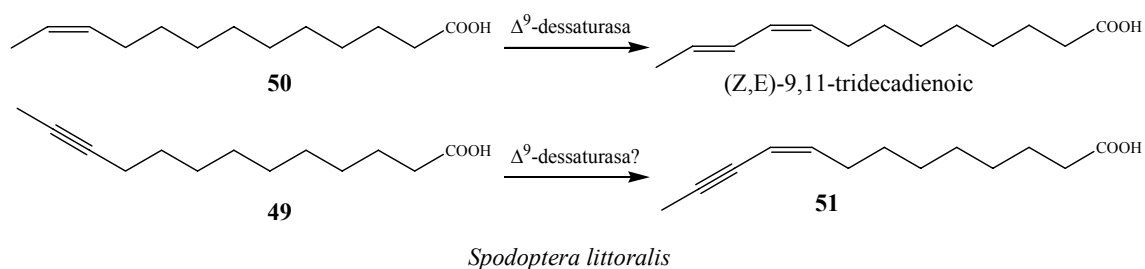
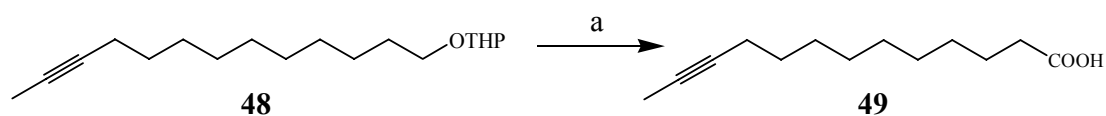


Figura 2.17 Possible formació d'una estructura d'ení, **51**, en l'espècie *S. littoralis* a partir de l'àcid acetilènic **49** per acció de la Δ^9 -dessaturasa

Com que al laboratori es disposava de l'alcohol protegit **48**, l'obtenció de **49** fou senzilla. Aquest es va formar per desprotecció en medi àcid de **48** i ulterior oxidació mitjançant el reactiu de Jones tal com mostra la Figura 2.18.



Reactius i condicions: (a) CrO_3 , H_2SO_4 , H_2O , acetona, 16 h, ta, (**49**, 70%)

Figura 2.18 Síntesi de l'àcid alquínic **49**

Es van realitzar els experiments de forma similar als descrits a l'apartat 3.3.3, però amb l'àcid 11-tridecinoic, **49**. Després d'extreure els lípids glandulars i formar els èsters metílics, els extractes es van analitzar per CG-EM. Els cromatogrames mostraven un nou producte, no present en els extractes control, el qual es va atribuir, d'acord amb l'espectre de masses, i per comparació del seu comportament cromatogràfic amb el d'altres enins, a l'èster metílic de l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic, **51**, tal com s'observa a la Figura 2.19.

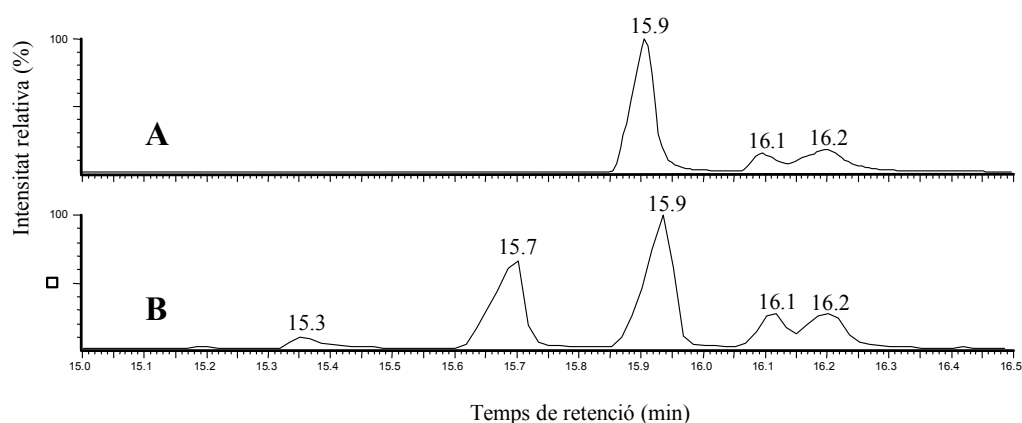


Figura 2.19 Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis* tractades amb l'àcid 11-tridecinoic, **49**, (cromatograma B) o amb dimetilsulfòxid (control) (cromatograma A). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: 11-tridecinoat de metil, a un $t_R=15,3$ min (cromatograma B) i (*Z*)-9-tridecen-11-inoat de metil a un $t_R=15,7$ min (cromatograma B).

2.4 DISCUSSIÓ

Tal com s'ha comentat en els apartats precedents, s'ha realitzat l'elucidació de la ruta biosintètica que origina el complex feromonal en l'espècie plaga *T. processionea* mitjançant estudis de marcatge amb diferents precursors deuterats. A més, s'ha investigat l'efecte del PBAN sobre l'activació de la producció de feromona en aquesta espècie. Finalment, s'han determinat les bases bioquímiques de la diferència en l'estructura de la feromona sexual dins del gènere *Thaumetopoea*.

Pel que fa al primer punt, el component majoritari de la feromona sexual de la processionària del roure es sintetitza de forma anàloga al diè intermedi present en la processionària del pi, espècie de la mateixa família. Així, l'àcid palmític és dessaturat en la posició 11 mitjançant el concurs d'una Δ^{11} -dessaturasa, obtenint-se l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic, **III**, el qual és subsegüentment dessaturat en la posició 13 mitjançant una Δ^{13} -dessaturasa, per fornir l'àcid (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic, **II**. A diferència de la processionària del pi, en aquest cas l'àcid dienoic és reduït a alcohol per mitjà d'una reductasa i acetilat amb una acetiltransferasa, tot conduint al component actiu, **VI**, majoritari de la feromona sexual (vegeu Figura 2.5).

Per altra banda, la regulació de la biosíntesi de la feromona sexual en Lepidòpters està, en general, regulada per una neurohormona present al cervell de l'insecte anomenada neuropèptid activador de la biosíntesi de feromones (PBAN, *pheromone biosynthesis-activating neuropeptide*), la qual és capaç d'induir la producció feromonal⁹⁷.

Els resultats obtinguts per diferents grups de recerca indiquen que el PBAN activa una etapa concreta de la seqüència biosintètica. En algunes espècies, el punt d'activació es troba abans de l'inici de la biosíntesi, probablement a nivell de la formació o aportació del primer precursor acílic, com és el cas dels lepidòpters *H. zea* i *A. velutinana*^{99,100}. En altres espècies, el PBAN activa una reacció enzimàtica entre la transformació del darrer precursor biosintètic i l'alcohol que se'n deriva, probablement la reductasa¹⁰¹. Finalment, en una altra espècie de lepidòpter, com és la *S. nonagrioides*, s'ha demostrat que el PBAN regula l'acetiltransferasa que transforma el (Z)-11-hexadecenol en el corresponent acetat¹⁰².

A la vista dels resultats aconseguits en aquesta Tesi, es pot assegurar que la producció de feromona en femelles de *T. processionea* es troba regulada pel PBAN. Així, les quantitats de feromona sexual que s'extreuen de glàndules feromonals en fotofase ($1,8 \pm 0,3$ ng/femella, n=8) són significativament més baixes que si s'estimula la biosíntesi per injecció d'aquesta hormona ($18,3 \pm 3,3$ ng/femella, n=12). D'altra banda, la formació de feromona marcada en fotofase a partir de qualsevol dels intermedis deuterats administrats només té lloc per estimulació de la biosíntesi amb PBAN. Aquests resultats indiquen que l'activació de la seqüència biosintètica es produeix després de la formació del darrer precursor, l'àcid (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic, **II**.

En experiments realitzats alguns anys enrera al nostre laboratori (E. Mas, resultats sense publicar), es va demostrar que l'acetilació del (Z,Z)-11,13-hexadecadienol, aplicat tòpicament sobre el teixit glandular, es produïa independentment del moment del fotoperíode, la qual cosa indicava que, d'acord amb els resultats obtinguts en altres espècies, l'acetiltransferasa no estava regulada hormonalment. Així doncs, el conjunt de resultats obtinguts suggereixen que el PBAN activa el pas de reducció del dienoat **II** a l'alcohol **VII**, catalitzat per una reductasa, de la mateixa forma que succeeix en altres espècies de lepidòpters^{98,101,103,104}.

Des d'un punt de vista estructural, la feromona sexual emesa per les femelles de les espècies *T. pityocampa* i *T. processionea* presents a l'àrea del Mediterrani, està

formada per diens o enins conjugats de cadenes hidrocarbonades de 16 àtoms de carboni de llargada⁸⁹, amb les insaturacions localitzades sobre els àtoms C11 i C13. Per tal d'investigar les bases bioquímiques d'aquesta variació de caràcter fenotípic, s'ha realitzat un estudi comparatiu de les rutes biosintètiques tant de la processionària del roure com de la del pi, les quals condueixen a l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, **VI** i l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil, **I**, respectivament.

Com ja s'ha esmentat més amunt, ambdues rutes biosintètiques comparteixen una Δ^{11} i una Δ^{13} -dessaturasa, però només la *T. pityocampa* presenta l'intermedi acetilènic, relacionat amb una activitat de tipus acetilenasa.

Ara bé, quan l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, propi de *T. pityocampa* és administrat a *T. processionea*, aquesta espècie és capaç de dessaturar-lo en la posició 13 per produir l'ení. A més, l'eninoat fou transformat en el corresponent acetat, demostrant que tant la Δ^{13} -dessaturasa, la reductasa com l'acetiltransferasa presents en la glàndula feromonal de la processionària del roure són capaces de transformar els intermedis biosintètics de la processionària del pi en els corresponents acetats. Per tant, la reductasa de la processionària del roure és poc específica envers el substrat i l'absència d'ení en la feromona sexual d'aquest insecte és deguda a la manca d'activitat acetilenasa.

És interessant que ni l'acetat d'11-hexadecinil, **VIII**, ni l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, **VI**, són formats a la glàndula feromonal de *T. pityocampa*, ja sigui a partir dels corresponents precursors endògens o després d'administrar tant l'àcid 11-hexadecinoic com el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic^{91,93,98}. Per tant, tot i que la *T. processionea* és capaç de produir la feromona sexual de la *T. pityocampa*, prèvia administració de l'àcid 11-hexadecinoic, les femelles de *T. pityocampa* no poden produir la feromona sexual de la *T. processionea*, malgrat disposar dels precursor adequats a la glàndula feromonal.

D'acord amb alguns estudis que addueixen la manca d'especificitat de les acetiltransferases^{99,105-107}, la *T. pityocampa* acetila de forma eficient tant el (Z,Z)-11,13-hexadecadien-1-ol com l'11-hexadecin-1-ol (E. Mas, resultats sense publicar). Per tant, el conjunt de resultats obtinguts suggereixen que la processionària del pi disposa d'una reductasa específica pel substrat enínic. El fet de tenir reductases específiques no és nou, ja que Zhao i col¹⁰⁷ van descriure una reductasa específica en l'espècie *Ostrinia furnicalis*. Per contra, la reductasa present en *T. processionea* exhibiria una activitat més àmplia.

És temptador especular que l'absència d'activitat acetilenasa en *T. processionea* comporta l'existència d'una reductasa poc específica cap el substrat ja que els intermedis alquí i ení no estan disponibles per reducció. Contràriament, en presència de la Δ^{11} acetilenasa (en *T. pityocampa*), s'originen diferents substrats susceptibles de ser reduïts, com l'alquí, l'ení i el diè. La formació de l'acetat de l'ení com a únic component de la feromona sexual requereix la presència d'una reductasa específica la qual transformi l'estructura d'ení, però no pas l'alquí i el diè, en els corresponents alcohols per posterior acetilació.

Els resultats globals d'aquests estudis demostren que el fet que la *T. processionea* no produeixi la feromona sexual de la *T. pityocampa* radica en l'absència de l'intermedi acetilènic, l'àcid 11-hexadecinoic, **IV**, per manca d'una Δ^{11} acetilenasa que sí que es troba present en *T. pityocampa*.

Es més, la formació de l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic, **51**, a partir de l'àcid 11-tridecenoic, **49**, en l'espècie *S. littoralis*, suggereix que, probablement, la formació d'una determinada estructura química com a feromona sexual depèn de la disponibilitat de substrats determinats, i no de dessaturases altament específiques.

Les acetilenases clonades fins el moment són la Δ^{12} acetilenasa d'una planta anomenada *Crepis alpina*⁶⁹, la qual presenta una funció doble d'acetilenasa i epoxidasa, i la Δ^6 acetilenasa procedent de la molsa *Ceratodon purpureus*¹⁰⁸. En ambdós casos es tracta d'enzims bifuncionals del tipus acetilenasa-dessaturasa. Per tant, malgrat que el gen que codifica la Δ^{11} acetilenasa en *T. pityocampa* no ha estat clonat fins ara, és enraonat proposar que aquest enzim és també de tipus bifuncional amb funció acetilenasa-dessaturasa. Els intents de clonació i expressió funcional d'aquest enzim s'estan duent a terme dins de la Tesi Doctoral de Monserrat Serra.

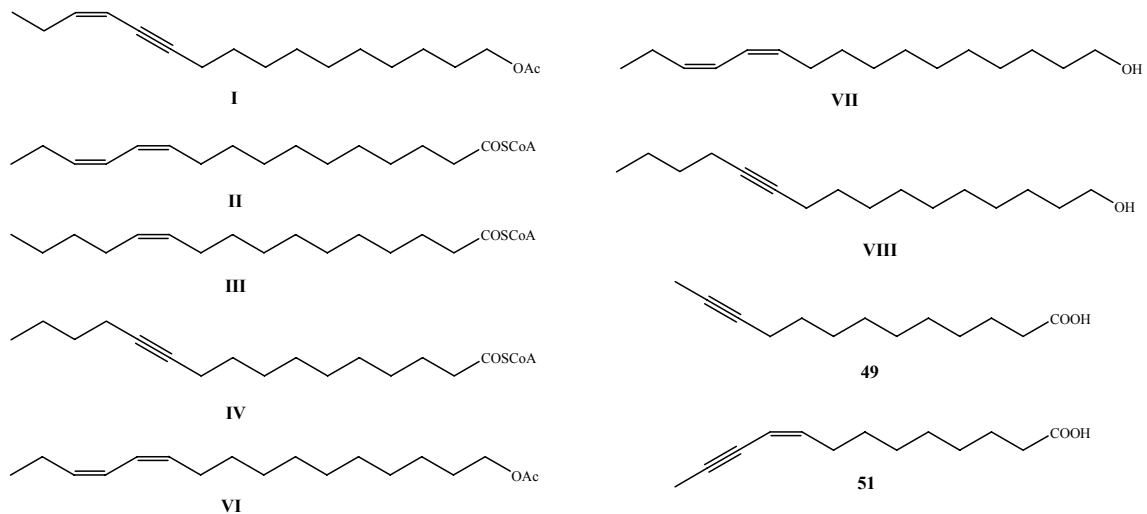
En el cas de la dessaturasa de *T. processionea*, que no presenta activitat acetilenasa, la transformació de l'enzim monofuncional en el bifuncional podria implicar una mutació del bifuncional amb pèrdua de funció acetilenasa o bé una mutació del monofuncional amb guany de funció acetilenasa. Un estudi filogenètic amb dels gens que codifiquen les dessaturases d'ambdues espècies permetrà estimar quin ha estat el sentit de la mutació.

En qualsevol cas, aquesta mutació va provocar un canvi sobtat¹⁰⁹ en la maquinària biosintètica d'una de les espècies, que es va traduir en la producció de nous compostos actius en la feromona sexual, els quals, captats en un principi per un nombre

escadusser de mascles amb l'estranya habilitat de respondre als nous components, van conduir a l'aparició i posterior evolució d'una nova espècie dins la família *Thaumetopoiedae*.

Per tant, sembla ser que la variació fenotípica en l'estructura de la feromona entre els dos grups de *Thaumetopoea* es deu a l'absència de la Δ^{11} acetilenasa en les espècies que produeixen l'acetat diènic, i l'existència d'una reductasa altament específica per-l'enoat intermedi en aquell grup que produeix l'ení com a feromona sexual. Tanmateix, malgrat la pèrdua d'activitat acetilenasa, els insectes del grup al qual pertany la *T. processionea* encara mantenen la capacitat de transformar un precursor acetilènic¹¹⁰, capacitat que sembla ser general atès que també altres espècies no relacionades, com és el cas de la *S. littoralis*, o altres organismes com el llevat *S. cerevisiae*⁹⁶ són capaços de dessaturar un precursor acetilènic per formar l'ení.

Tots aquests resultats exemplifiquen com la natura evoluciona refinant les activitats moleculars per tal de garantir una resposta biològica específica i precisa tot assegurant la contínua evolució de les espècies.



**3.- CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI DE LA
 Δ^{11} -DESSATURASA DE LEPIDÒPTERS: REQUERIMENTS
ESTRUCTURALS DEL SUBSTRAT**

3. CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI DE LA Δ^{11} -DESSATURASA DE LEPIDÒPTERS: REQUERIMENTS ESTRUCTURALS DEL SUBSTRAT

3.1 INTRODUCCIÓ

3.1.1 La feromona sexual de l'espècie plaga *Spodoptera littoralis*

La *S. littoralis* (Figura 3.1) és una arna de l'ordre Lepidoptera, pertanyent a la família dels noctuïds. És una espècie polífaga que representa una important plaga del cotó, blat de moro, alfals, tomàquet, patata i altres tipus de collites hortícoles de la zona de la vessant Mediterrània.



Figura 3.1 Fotografia d'una femella de *S. littoralis*

Degut a les importants repercussions econòmiques d'una plaga d'aquesta índole, la composició del seu complex feromonal ha estat àmpliament estudiada^{101,111}. Durant molts anys, en el nostre grup de treball s'ha investigat la biosíntesi de la seva feromona sexual per tal de poder desenvolupar un control integrat d'aquesta plaga en camps de conreu. Se sap que la seva mescla feromonal, tot depenent de la regió, la conformen diferents acetats, tant saturats com insaturats, en proporcions determinades, essent el diè

conjugat (*Z,E*)-9,11-14:Ac, **I**, el component actiu majoritari present en totes les mescles. Altres acetats presents són el 14:Ac, **VII**, els acetats monoinsaturats, (*Z*)-11-14:Ac, **III**, (*E*)-11-14:Ac, **II**, (*Z*)-11-16:Ac, **IV**, i (*Z*)-9-14:Ac, **V**, el diinsaturat no conjugat (*Z,E*)-9,12-14:Ac (no present en la colònia criada al nostre laboratori) i el diè conjugat (*E,E*)-10,12-14:Ac, **VI**, (Taula 3.1).

Taula 3.1 Compostos identificats en extractes de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis*.

Nom comú	Numeració	Símbol
Acetat de (<i>Z,E</i>)-9,11-tetradecadienil	(I)	(<i>Z,E</i>)-9,11-14:Ac
Acetat de (<i>E</i>)-11-tetradecenil	(II)	(<i>E</i>)-11-14:Ac
Acetat de (<i>Z</i>)-11-tetradecenil	(III)	(<i>Z</i>)-11-14:Ac
Acetat de (<i>Z</i>)-11-hexadecil	(IV)	(<i>Z</i>)-11-16:Ac
Acetat de (<i>Z</i>)-9-tetradecenil	(V)	(<i>Z</i>)-9-14:Ac
Acetat de (<i>E,E</i>)-10,12-tetradecadienil	(VI)	(<i>E,E</i>)-10,12-14:Ac
Acetat de tetradecil	(VII)	14:Ac
Acetat de (<i>Z,E</i>)-9,12-tetradecadienil	---- ^a	(<i>Z,E</i>)-9,12-14:Ac

^aDiè no detectat en la colònia criada als nostres laboratoris, però present en altres poblacions de la mateixa espècie.

La biosíntesi de la mescla feromonal de l'espècie criada en els nostres laboratoris, tal com es mostra a la Figura 3.2, comença a partir de l'àcid palmític activat en forma de tioèster de CoA^{101,112}. Aquest àcid segueix dues vies diferents, tot produint l'àcid mirístic per acció d'una β -oxidació i el (*Z*)-11-16:Acid, **IV-a**, per acció d'una dessaturasa de membrana, concretament una Δ^{11} -dessaturasa; posteriorment aquest és β -oxidat per donar el (*Z*)-9-14:Acid, **V-a**. L'àcid mirístic és sotmès a dessaturació mitjançant la Δ^{11} -dessaturasa proporcionant una mescla d'àcids monoènics: el (*Z*)-11-14:Acid, **III-a**, i el (*E*)-11-14:Acid, **II-a**. L'àcid **II-a** és dessaturat en la posició 9 per una Δ^9 -dessaturasa per donar el precursor del compost actiu majoritari del complex feromonal, en aquest cas un diè conjugat, el (*Z,E*)-9,11-14:Acid, **I-a**, i l'àcid **III-a** és sotmès a l'acció d'una 1,4-dessaturasa única¹¹³, la qual converteix un doble enllaç aïllat dins una cadena alifàtica en dos dobles enllaços conjugats per mitjà d'una reacció del tipus deshidrogenació-1,4. Així, el (*Z*)-11-14:Acid, **III-a**, per acció d'aquest enzim, dóna el diè conjugat (*E,E*)-10,12-14:Acid, **VI-a**. Finalment, mitjançant enzims de tipus reductasa, es transformen els tioèsters de CoA en els corresponents alcohols, els quals són acetilats per acetiltransferases, tot conduint a la mescla feromonal.

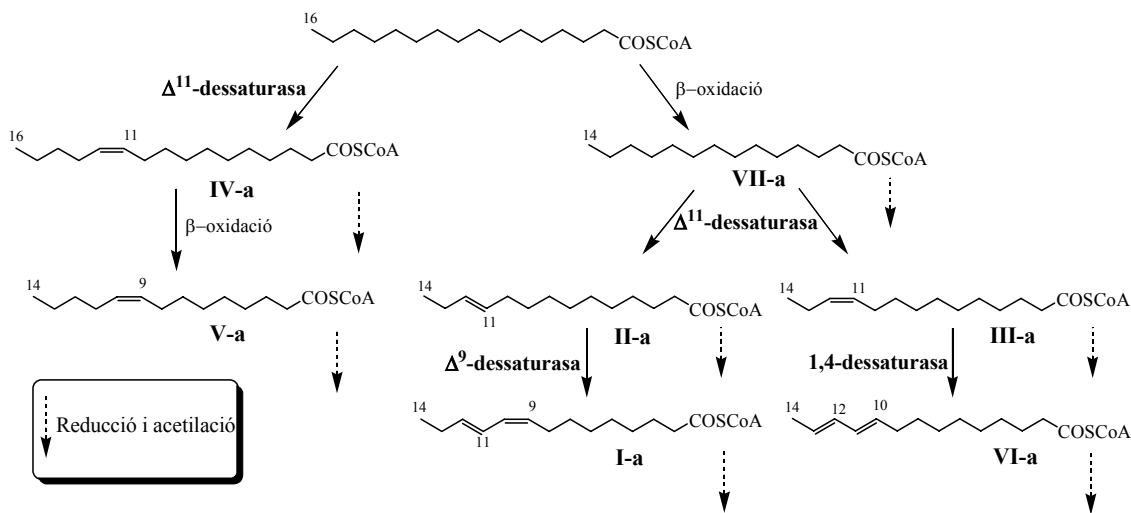


Figura 3.2 Biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*.

3.2 OBJECTIUS

En el cas de la Δ^{11} -dessorasa de *S. littoralis*, fins fa pocs anys, hi havia el dilema de si els isòmers *Z* i *E* dels productes de desaturació procedien de l'activitat de dues desaturases diferents, o bé es tractava d'una sola desaturasa que donava mescles isomèriques. Amb el recent treball de clonació de la Δ^{11} -dessorasa¹¹⁴, es confirmà que hi havia un sol enzim. En estudis duts a terme en el nostre laboratori, es demostrà que, per acció d'aquest enzim, la formació de barreges isomèriques *Z/E* o d'un dels isòmers de forma exclusiva depenia de l'estructura del substrat¹¹⁵. Així, mentre els àcids grassos de cadena llarga, entre C15 i C18 àtoms de carboni eren transformats en l'isòmer *Z*-11 de forma exclusiva, els substrats de C13 i C14 àtoms de carboni conduïen a barreges *Z/E*-11 de l'àcid monoinsaturat resultant. Aquests resultats ens feren proposar un model, segons el qual, per a substrats de cadena curta (C13 i C14), ambdues conformacions precursors dels dobles enllaços *Z* i *E* podien encabir-se dins del canal d'unió de l'enzim al substrat. En canvi, per a substrats de cadena llarga, per restriccions estèriques imposades pel propi centre actiu de l'enzim, l'única conformació possible seria la precursora de l'olefina *Z*¹¹⁵. Segons aquest model, el canal d'unió desaturasa-substrat

hauria de presentar una cavitat, més enllà de la zona d'inserció del doble enllaç^a, que permetés l'acomodament d'ambdues conformacions, pro-*Z*11 i pro-*E*11, dels substrats de cadena curta, però no dels de cadena llarga. Si aquest raonament fos correcte, l'enzim hauria de transformar determinats substrats substituïts, com ara l'àcid 12-metiltridecanoic (Figura 3.3).

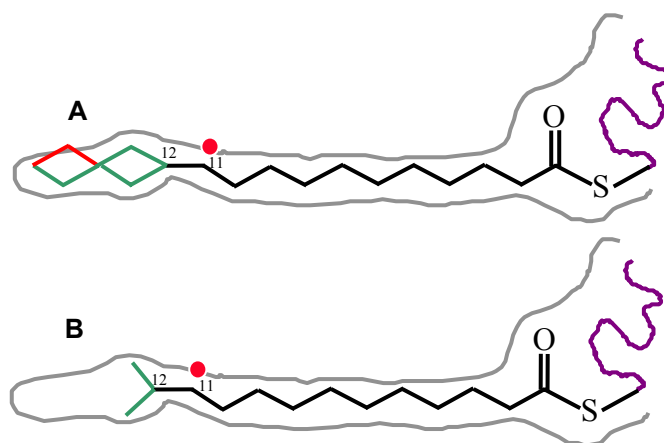


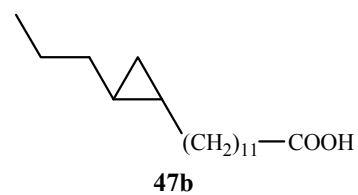
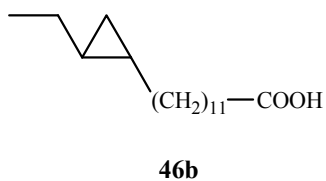
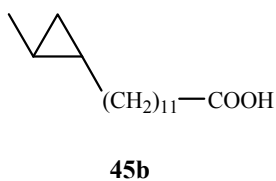
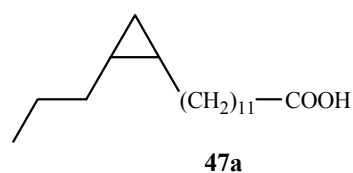
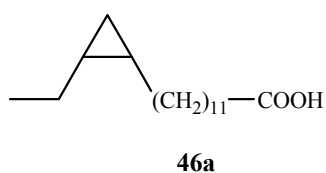
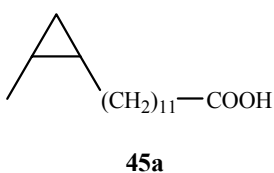
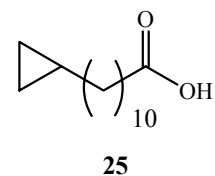
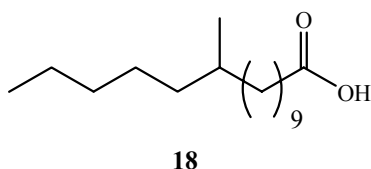
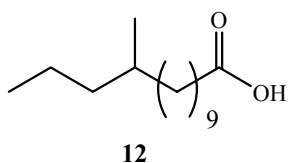
Figura 3.3 Esquema d'un hipotètic centre actiu de la Δ^{11} -dessorasa. A, per als substrats de C13 a C16, es representen, en vermell, les conformacions, no permeses i en verd, les conformacions possibles. B, àcid 12-metiltridecanoic acomodat al centre actiu enzimàtic. El cercle vermell representa el clúster de ferro i el traç violeta, el fragment de CoA

No obstant, i contràriament al que s'esperava, a la Tesi Doctoral d'en Jordi Quintana Compte¹¹⁶ es demostrà que l'àcid 12-metiltridecanoic no es transformava, després d'incubar-lo en presència de l'enzim, en el corresponent àcid 12-metil-11-tridecenoic. Aquest resultat podia indicar que:

1) El canvi conformacional que origina ambdós isòmers, (*Z*) i (*E*), del producte resultant té lloc per gir, a través de l'enllaç C11-C12, no de l'extrem terminal (C12 a C13 o C14), sinó de la part funcionalitzada (C1 a C11) de la molècula de substrat. Per tal d'investigar aquesta possibilitat, el primer objectiu d'aquest capítol fou la síntesi dels àcids grassos ramificats en C11, **12** i **18**, i l'estudi del seu metabolisme per la Δ^{11} -dessorasa de *S. littoralis*.

^a Es proposa que la cavitat es troba més enllà de la zona d'inserció del doble enllaç com a conseqüència de la estereoespecificitat de l'enzim (vegeu discussió, capítol 3).

2) Una altra explicació possible és que l'àcid 12-metiltridecanoic fos massa voluminós a l'extrem terminal per tal d'unir-se a l'enzim. Per això es plantejà estudiar substrats similars de menys volum. Així, com a segon objectiu d'aquest capítol es plantejà la síntesi dels àcids ciclopropànics **25** i **45-47** i l'estudi del seu metabolisme per la Δ^{11} -dessorasa de *S. littoralis*. A més, l'àcid ciclopropànic **25** hauria d'aportar dades d'interès mecanístic sobre el procés de dessoració.



3.3 RESULTATS

3.3.1 Síntesi dels àcids grassos

3.3.1.1 Síntesi dels àcids ramificats 12 i 18

Per a la síntesi dels àcids grassos ramificats **12** i **18** es va plantejar l'esquema retrosintètic que es mostra a la Figura 3.4, on la ramificació s'introdueix per atac nucleòfil de MeLi a una cetona, seguit de deshidratació de l'alcohol que en resulta i posterior hidrogenació del doble enllaç.

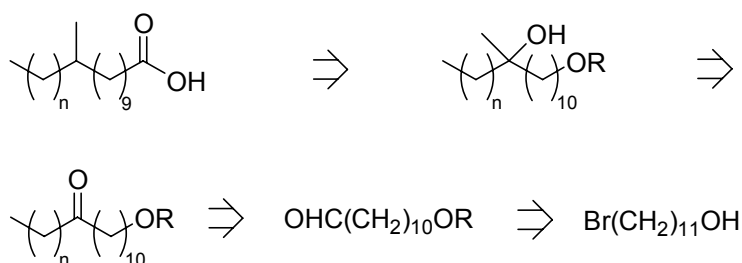


Figura 3.4 Primer esquema retrosintètic per a la síntesi dels àcids **12** i **18**, on $n = 2, 4$

Aquesta ruta sintètica presentà problemes en l'etapa de la deshidratació de l'alcohol **5** (Figura 3.6), ja que dels mètodes trobats a la bibliografia¹¹⁷⁻¹¹⁹, només la metodologia descrita per Phillips i col. va permetre obtenir els productes de deshidratació, tot i que el rendiment va ser molt baix. Un cop assolida la deshidratació, es va procedir a la hidrogenació del doble enllaç. S'assajaren dues condicions experimentals: Pd/C 10%/MeOH i PtO₂/AcOH. Malauradament, en cap dels intents s'aconseguí el producte desitjat, es recuperà sempre el producte de partida inalterat. A la vista d'aquests resultats, es plantejà l'esquema retrosintètic de la Figura 3.5, on la introducció del grup metil es va realitzar per reacció de Wittig amb la cetona **4** i posterior hidrogenació del grup metilè resultant. Mitjançant posteriors transformacions del grup funcional s'obtingueren els productes desitjats.

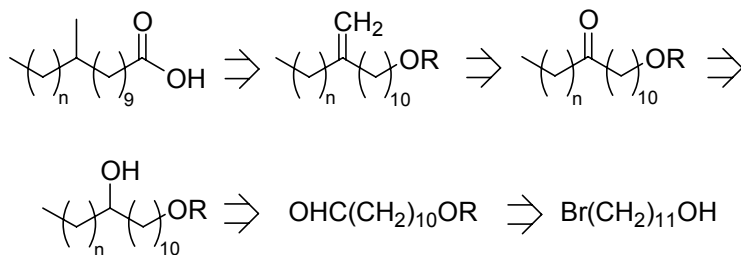
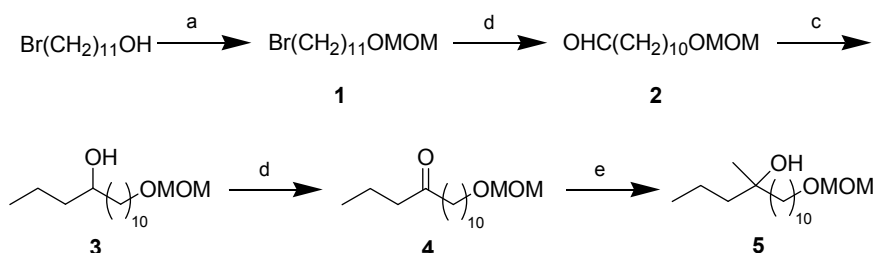


Figura 3.5 Segon esquema retrosintètic per a la síntesi dels àcids **12** i **18**, on $n = 2, 4$

A continuació, es passarà a descriure amb detall ambdues seqüències sintètiques.

3.3.1.1.1 Síntesi de l'àcid 11-metiltetradecanoic, **12**

3.3.1.1.1.1 Intents de síntesi de l'àcid **12** via deshidratació del 15,17-dioxa-4-metil-4-octadecanol, **5**



Reactius i condicions: a) $\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$ / LiBr / *p*-TsOH / 16 h a t.a.; b) $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}$ / NaHCO_3 / toluè / N_2 / 4 h a reflux; c) *n*-PrMgCl / THF / 1h / t.a.; d) PDC / DMF 0.2 M / 6h / t.a.; e) MeLi / THF / -78°C / 1h

Figura 3.6 Síntesi de l'alcohol **5**

La síntesi de l'àcid **12** es va plantejar inicialment per protecció de l'11-bromo-1-undecanol en forma d'èter metoximetílic, seguint el procediment descrit a la literatura¹²⁰ (Figura 3.6). Un cop protegit l'alcohol, amb molt bon rendiment, el bromoderivat resultant **1** s'oxidà a aldehyd seguint el mètode descrit per Stowell¹²¹, en el qual s'emprà *N*-òxid de piridina i NaHCO_3 amb toluè a reflux. La formació de l'aldehyd **2** es féu palesa a l'espectre de RMN de ^1H , on s'observà un triplet a δ 9.73, el qual correspon a l'aldehyd, i un doblet de triplets a δ 2.39, associat als hidrogens en α respecte l'aldehyd. Per tal d'allargar la cadena fins al nombre d'àtoms de carboni

desitjat, es realitzà una reacció de Grignard entre l'aldehyd **2** i el clorur de propilmagnesi. L'alcohol resultant **3** s'oxidà a la cetona **4** amb una dissolució 0.2M de PDC en DMF, seguint el mètode descrit per Corey i Schmidt¹²². Per atac de MeLi a la cetona **4**, dissolta en THF anhidre, s'introduí el grup metil a la posició desitjada, així s'obtingué l'alcohol terciari **5** amb molt bon rendiment.

La deshidratació de l'alcohol **5** fou una de les transformacions més problemàtiques de la seqüència sintètica. En primer lloc, s'assajà l'utilització de SiO₂ activada amb FeCl₃·6H₂O¹¹⁹, amb la qual s'obtingué una mescla de diol **6** i dímer **9** (Figura 3.7) (Taula 3.2, assaig 1). El diol provindria de la desprotecció hidroxil primari, el qual dimeritzaria en el medi de la reacció per donar lloc a **9**, que s'identificà per RMN de ¹H per la presència d'un triplet a δ 3.39, corresponents als grups metilens en posició α de l'èter.

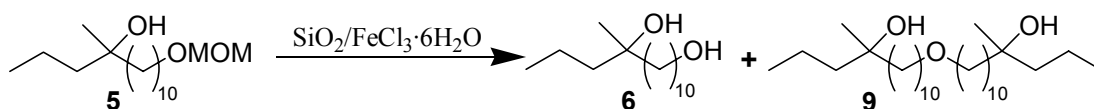
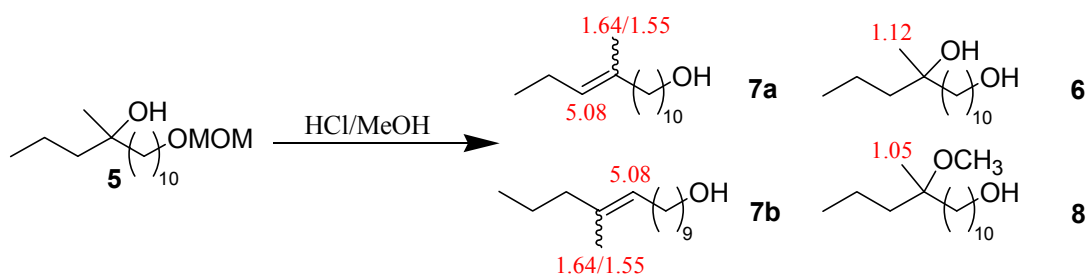


Figura 3.7 Reacció de l'alcohol **5** amb SiO₂/FeCl₃·6H₂O

En obtenir-se aquest resultat, s'assajà la utilització de HCl/MeOH (Figura 3.8) (Taula 3.2, assaigs 2,3 i 4). A concentracions baixes de HCl, s'obtenien mescles del diol **6**, de les olefines desitjades, **7a-7b**, i del metoxialcohol **8**. La composició de la barreja es determinà a partir de l'estudi de l'espectre de RMN de ¹H (Figura 3.8). Les olefines trisubstituïdes **7a** i **7b** presentaven senyals característics a δ 5.08 (H vinílic) i δ 1.64/1.55 (H al·líllics). El singlet a δ 1.12 corresponia al diol **6**, mentre que el metoxialcohol **8** presentava senyals a δ 3.11 (CH₃O) i 1.05 (CH₃ quaternari). L'absència dels senyals típics del grup protector permeteren concloure que s'havia produït la hidròlisi per a donar l'alcohol primari lliure. En emprar una dissolució saturada de HCl en MeOH¹¹⁷, s'obtingué el diol **6** de forma exclusiva, la qual cosa feia pensar que l'aigua present en el medi de reacció s'addicionava de nou a l'olefina formada. Per tant, es decidí realitzar la mateixa reacció en presència de tamisos moleculars de 4 Å, que rendí una mescla d'olefines **7a**, **7b** i de metoxialcohol **8** (Figura 3.8). Malgrat obtenir-se les olefines esperades per reacció amb HCl/MeOH, aquest procediment no es considerà convenient atés la formació de subproductes.


Figura 3.8 Reacció de l'alcohol **5** amb HCl/MeOH

Segons la literatura¹¹⁸, la presència de I₂ en una dissolució d'un alcohol en toluè a reflux, permetia la deshidratació de l'alcohol. En aquest cas, per tractament de **5** amb I₂, s'obtingué una mescla de productes, entre els quals no hi havia olefina i el grup protector estava substituït per un àtom de iode (Taula 3.2, assaig 5), que s'identificà en base a l'espectre de RMN de ¹H del cru de la reacció, on s'observà un triplet a δ 3.19, del grup CH₂I.

Taula 3.2 Intents de deshidratació de l'alcohol **5**

Assaig n°	Reactiu	Productes de reacció (Proporció) ^a o [Rendiment] ^b	Referència
1	SiO ₂ /FeCl ₃ ·6H ₂ O(10%)	6 i 9 (2:1)	119
2	MeOH/HCl 20%	7a-7b, 6 i 8 (1:2.5:3)	----
3	MeOH/HCl concentrat	6 [86%]	117
4	MeOH/HCl concentrat Tamisos 4 Å	7a-7b i 8 (2:1)	117
5	I ₂ /toluè	Mescla complexa	118
6	SOCl ₂ /piridina	7d-7e i 7f (1.5:1) [47%]	123

^aCalculada per RMN de ¹H del cru de reacció.

^bProducte aïllat i purificat per cromatografia en columna.

Finalment, s'assajà la deshidratació de l'alcohol **5** utilitzant SOCl_2 /piridina¹²³ (Taula 3.2, assaig 6) (Figura 3.9). Aquest mètode conduí a una mescla d'olefines regioisomèriques **7d**, **7e** i **7f** amb un baix rendiment (47%). Els productes s'identificaren per RMN de ^1H , on s'observà un triplet a δ 5.08 i un singlet a δ 4.66, corresponents als hidrogens vinílics de les olefines **7d-7e** i **7f**, respectivament. La formació de regioisòmers no era cap inconvenient, ja que a l'etapa d'hidrogenació tots els compostos haurien de donar lloc al mateix producte **10**.

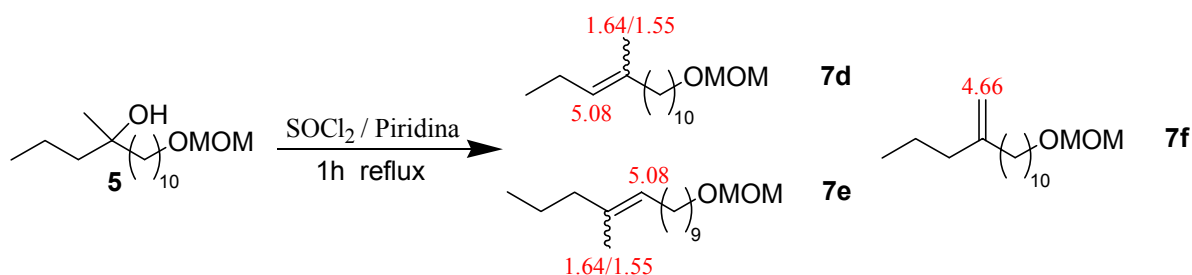


Figura 3.9 Reacció de deshidratació de l'alcohol **5** amb SOCl_2 /piridina

La hidrogenació (Figura 3.10) de les olefines fou provada amb pal·ladi sobre carbó al 10% com a catalitzador i MeOH com a dissolvent. Del cru es recuperà la mescla d'olefines de partida inalterada. El mateix resultat s'obtingué quan s'utilitzà l'òxid de platí com a catalitzador i AcOH com a dissolvent¹²⁴. A la vista d'aquests resultats, es va arribar a la conclusió de què la hidrogenació estava estèricament impedita per la presència del grup metil vinílic i es decidí iniciar una nova síntesi, que es descriu en el següent apartat.

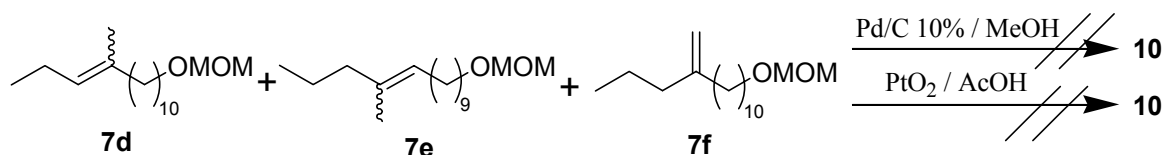
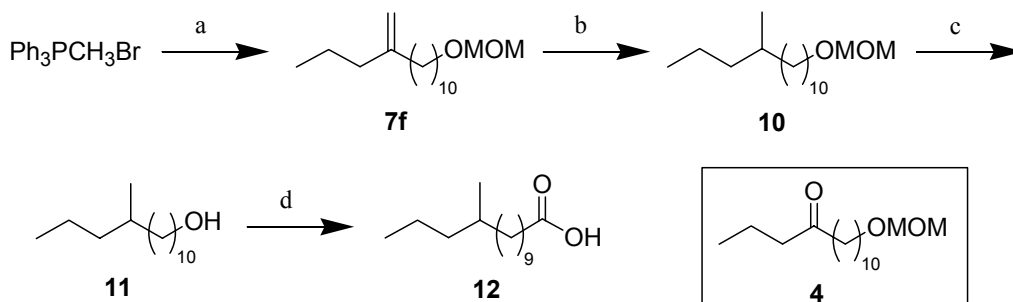


Figura 3.10 Intents d'hidrogenació de les olefines **7**

3.3.1.1.1.2 Síntesi de **12** via hidrogenació del 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, **7f**

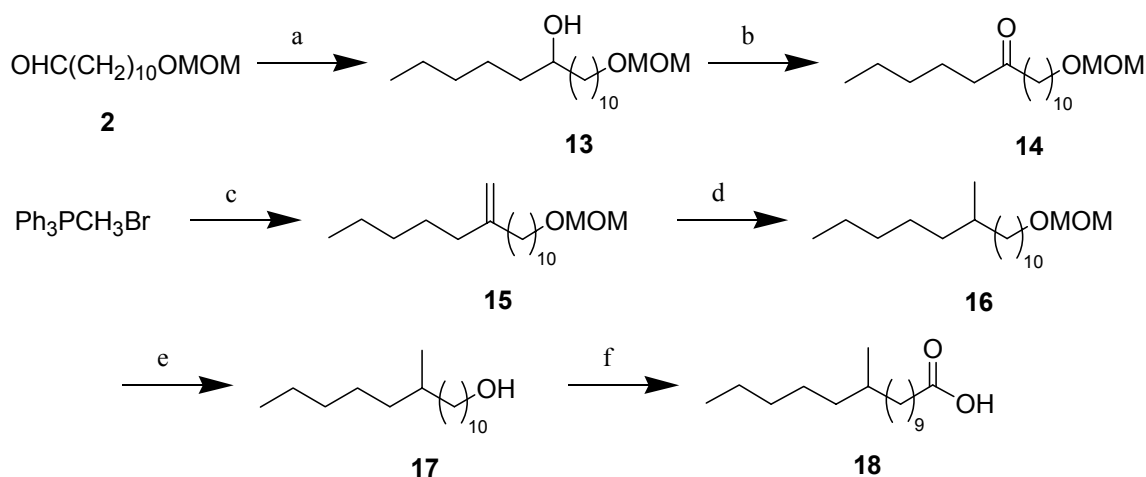


Reactius i condicions: a) *n*-BuLi / THF a - 20 °Cm, després 1h 30' a t.a. i afegir **4** a -40 °C; b) H_2 -Pd/C / MeOH a t.a.; c) HCl-MeOH 10% / 16h a t.a.; d) CrO_3 / H_2O / H_2SO_4 / acetona / 4h a t.a.

Figura 3.11 Síntesi de l'àcid **12** via reacció de Wittig

En aquesta nova ruta es partí de la cetona **4**, obtinguda per oxidació del 15,17-dioxa-4-octadecanol, **5**, amb PDC/DMF 0.2M¹²² (Figura 3.6). Tal com s'observa en la Figura 3.11, la síntesi de l'àcid **12** es continuà per introducció d'un grup metil terminal mitjançant una reacció de Wittig entre la cetona **4** i l'ilur provinent del bromur de metiltrifenilfosfoni. La sal de fosfoni, que s'assecà a $90\text{ °C}/10^{-1}\text{ mmHg}$ durant 16 h, es dissolgué en THF i s'hi addicionà *n*-BuLi per tal de formar el corresponent ilur, el qual fou finalment condensat amb la cetona **4**. En aquest cas s'obtingué una olefina terminal, **7f**, que s'identificà per RMN de ^1H , per la presència d'un singlet a δ 4.66. El doble enllaç format ja no estava estèricament impedit i s'hidrogenà fàcilment en emprar el mètode més suau: pal·ladi sobre carbó al 10% suspès en MeOH. Es va obtenir el producte esperat, **10**, amb un 72% de rendiment. Un cop assolida la hidrogenació, s'alliberà la cadena hidrocarbonada del grup protector amb una hidròlisi àcida, el qual rendí a l'alcohol **11**. Finalment, per oxidació de l'alcohol **11** amb el reactiu de Jones¹²⁵, prèviament preparat a partir d'òxid de crom, H_2O i H_2SO_4 , s'obtingué el producte desitjat, l'àcid 11-metiltetradecanoic, **12**.

3.3.1.1.2 Síntesi de l'àcid 11-metilhexadecanoic, 18



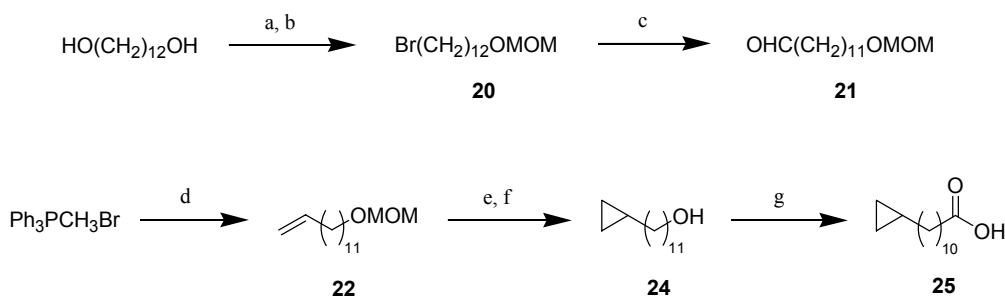
Reactius i condicions: a) *n*-PentilMgBr / THF 1h a t.a.; b) PDC / DMF / 6h a t.a.; c) *n*-BuLi / THF / 20 °C, després 1h 30' a t.a. i afegir **14** a - 40 °C; d) H₂-Pd/C / MeOH a t.a.; e) HCl-MeOH 10%, 16h a t.a.; f) CrO₃ / H₂O / H₂SO₄ / acetona, 4h a t.a.

Figura 3.12 Síntesi de l'àcid **18**

La síntesi de l'àcid **18** (Figura 3.12) es realitzà segons un esquema sintètic idèntic a l'anterior. A partir de l'aldehid **2**, utilitzant el bromur de pentilmagnesi com a reactiu de Grignard per allargar la cadena fins a 16 àtoms de carboni. L'alcohol **13** s'oxidà amb PDC/DMF 0.2M¹²² a la cetona **14**. Aquesta fou condensada amb l'iler obtingut a partir del bromur de metiltrifenilfosfoni per tal d'obtenir l'olefina terminal desitjada **15**. L'olefina **15** s'hidrogenà utilitzant paladi sobre carbó al 10% com a catalitzador i MeOH com a dissolvent, i s'obtingué el compost **16**, el qual presentava, a l'espectre de RMN de ¹H, un doblet característic a δ 0.81 que s'assignà al grup metil. Finalment, s'alliberà la cadena hidrocarbonada del grup protector per hidròlisi àcida, per obtenir l'alcohol **17**, que, per oxidació amb el reactiu de Jones¹²⁵, es transformà en el producte desitjat, l'àcid 11-metilhexadecanoic, **18**.

3.3.1.2 Síntesi dels derivats ciclopropànics **25**, **28:Me**, **45-47**

3.3.1.2.1 Síntesi de l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**



Reactius i condicions: a) HBr 48% / toluè; b) $\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$ / LiBr / *p*-TsOH; c) $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}$, NaHCO_3 / toluè / N_2 / 4h a reflux
d) *n*-BuLi / -20°C / THF, després 1h 30' / t.a. i afegir **21** a -40°C e) Et_2Zn / CH_2I_2 / CH_2Cl_2 / -20°C i deixar 48 h / t.a.;
f) HCl-MeOH 10% / 14 h / t.a.; g) PDC / DMF 0.2 M / 6h / t.a.

Figura 3.13 Síntesi de l'àcid ciclopropànic **25**

La síntesi de **25** (Figura 3.13) s'inicià amb el 13,15-dioxa-1-bromohexadecà, **20**, que s'obtingué, amb bon rendiment, per monobromació de l'1,12-dodecandiol¹²⁶ i la posterior protecció del bromoalcohol corresponent en forma d'èter metoximetílic¹²⁰. El bromoderivat **20** s'oxidà a l'aldehid **21** a través del procediment descrit en la síntesi dels àcids ramificats **12** i **18**¹²¹. Per obtenir l'olefina necessària per a la reacció de Simmons-Smith, l'aldehid **21** fou condensat amb l'ilur procedent del bromur de metiltrifenilfosfoni. D'aquesta manera s'obtingué l'olefina terminal **22**, que s'identificà per RMN de ^1H , on s'observaren tres senyals corresponents al doble enllaç a δ 5.79, δ 4.96 i δ 4.90.

Per dur a terme la reacció de Simmons-Smith, es seguí la metodologia descrita per Imai i col.¹²⁷. La reacció transcorre a través d'un estat de transició on el grup metilè del CH_2I_2 s'addiciona sobre el doble enllaç per donar el ciclopropà. A l'olefina **22**, dissolta en CH_2Cl_2 , s'hi addicionà, a -20°C , gota a gota, el Et_2Zn i seguidament el CH_2I_2 . L'evolució de la reacció es controlà per cromatografia de gasos, de tal manera que quan s'observà que la reacció no progressava, s'addicionaren més equivalents de Et_2Zn i CH_2I_2 , fins a la desaparició total de l'alquè **22**. A les anàlisis per CG s'observà que es formaven dos subproductes a més del producte esperat. Després de la hidròlisi àcida, per tal d'alliberar la cadena hidrocarbonada del grup protector, només s'obtingué l'alcohol **24**. Per tant, es conclougué que els subproductes eren possiblement derivats de modificacions del grup protector. L'alcohol **24** fou oxidat amb una dissolució 0.2M de

PDC en DMF¹²², conduint al producte desitjat, l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**. L'espectre de RMN de ¹H de **25** mostrava, com a senyals més característics, els corresponents als àtoms d'hidrogen ciclopropànics: un senyal complex a δ 0.62 i dos doblets de doblets a δ 0.33 i δ -0.04. Els àtoms de carboni ciclopropànics eixien a δ 10.9 i a δ 4.3 a l'espectre de RMN de ¹³C.

3.3.1.2.2 Síntesi del 11-ciclopropilidenundecanoat de metil, **28:Me**

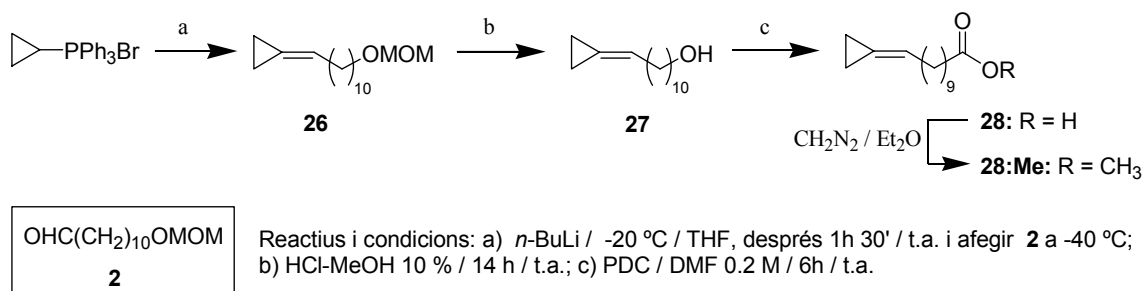
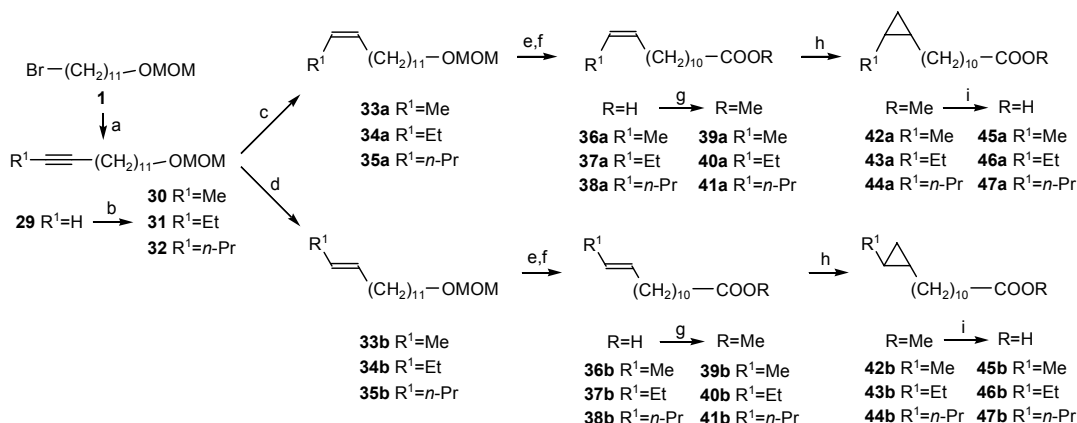


Figura 3.14 Síntesi de l'11-ciclopropilidenundecanoat de metil, **28:Me**

La síntesi de l'11-ciclopropilidenundecanoat de metil, **28:Me**, es realitzà per tal de disposar d'un patró a les anàlisis de CG-EM dels extractes lipídics metanolitzats de teixits incubats amb l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**. La síntesi s'inicià (Figura 3.14) a partir del 12,14-dioxapentadecanal, **2**, obtingut en la síntesi dels àcids grassos ramificats **12** i **18** (Figura 3.6). El grup ciclopropiliden s'introduí pel procediment descrit per Krief *i col.*¹²⁸, el qual consisteix en la reacció de Wittig entre l'aldehid **2** i l'ilur format a partir del bromur de ciclopropiltrifenilfosfoni. Així s'obtingué el producte esperat **26**, que s'identificà per RMN de ¹H, per la presència d'un senyal a δ 5.73, assignat a l'àtom d'hidrogen vinílic. Mitjançant hidròlisi àcida s'alliberà la cadena hidrocarbonada del grup protector, que donà l'alcohol **27**. Les següents transformacions consistiren en l'oxidació de **27**, amb una dissolució 0.2M de PDC en DMF¹²², a l'àcid 11-ciclopropilidenundecanoic, **28**, seguida d'esterificació amb diazometà per obtenir **28:Me**. Aquesta última reacció es realitzà a escala analítica.

3.3.1.2.3 Síntesi dels àcids ciclopropànics disubstituits, 45-47



Reactius i condicions: (a) $\text{NH}_3(\text{l})/-78^\circ\text{C}$, després bombollear acetilè durant 1.5h, després afegir Li i DMSO, -78 a 25°C , després addicionar **1** en DMSO/ $25^\circ\text{C}/1\text{h}$; (b) $n\text{-BuLi}/0^\circ\text{C}/5$ min, després addicionar $\text{R}^1\text{I}/0^\circ\text{C}/16\text{h}$; (c) $\text{H}_2/\text{Lindlar}/25^\circ\text{C}/1\text{h}$; (d) $\text{Na}/\text{NH}_3(\text{l})/-78^\circ\text{C}/\text{THF}/10$ min, després 8h a -30°C ; (e) 10 % HCl en MeOH/ $25^\circ\text{C}/16\text{h}$; (f) $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{acetona}/25^\circ\text{C}/4\text{h}$; (g) $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}/25^\circ\text{C}/1\text{h}$; (h) $\text{Et}_2\text{Zn}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/-20^\circ\text{C}$, després afegir $\text{CH}_2\text{I}_2/-20^\circ\text{C}/1\text{h}$; -20°C a $25^\circ\text{C}/16\text{h}$; (i) 2.5N KOH/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}/25^\circ\text{C}/16\text{h}$.

Figura 3.15 Síntesi dels àcids grassos ciclopropànics 45-47 i els èsters 42-44

La síntesi dels àcids ciclopropànics disubstituits **45-47** (Figura 3.15) s'inicià a partir del 12,14-dioxa-1-bromopentadecà, **1**, que s'obtingué, amb bon rendiment, per protecció del bromoalcohol corresponent en forma d'èter metoximetílic¹²⁰. El bromoderivat **1** fou convertit en el corresponent 14,16-dioxa-1-heptadecí, **29**, mitjançant l'atac de l'acetilur de liti sobre el bromur d'alquil, utilitzant NH_3/DMSO com a dissolvent^{129,130}.

Un cop preparat l'alquí terminal **29**, calia alquilar-lo amb el radical R adequat, en aquest cas metil, etil i propil. Es va seguir un procediment descrit per Schwarts i Waters¹³¹ en el qual 1 equiv de l'alquí dissolt en THF anhidre es fa reaccionar, a 0°C , amb 1.2 equiv de $n\text{-BuLi}$. Seguidament, s'addiciona el iodur d'alquil apropiat (1.2 equiv) en HMPA seca i s'escalfa a temperatura ambient. Un cop acabada la reacció es tractà el cru i aquest es purificà per cromatografia en columna de gel de sílice.

Un cop es disposava dels alquins protegits, **30-32**, només quedava reduir el triple enllaç a doble. Aquesta reducció es realitzà controlant la configuració del doble enllaç generat, ja que interessava obtenir els ciclopropans provinents del doble enllaç de configuració *Z* i *E* per separat. Per tant, els compostos amb doble enllaç de configuració *Z*, **33a-35a**, es formaren a partir dels alquins corresponents mitjançant hidrogenació

amb el catalitzador de Lindlar. En canvi, els compostos de geometria *E*, **33b-35b**, es sintetitzaren per reducció del triple enllaç amb Na/NH₃.

Abans de realitzar les reaccions de Simmons-Smith, calia desprotegir els alcohols per hidròlisi àcida i oxidar-los als corresponents àcids **36-38** amb el reactiu de Jones¹²⁵, seguint la metodologia descrita anteriorment.

Un cop es disposava d'aquests àcids grassos olefínics, només quedava realitzar la ciclopropanació de Simmons-Smith¹²⁷ de forma anàloga a la descrita a l'apartat 3.3.1.2.1 en la síntesi de **25**, per tal d'obtenir els ciclopropans disubstituïts, **45-47**.

3.3.2 Estudis de metabolisme dels àcids **12**, **18**, **25** i **45-47** per la Δ^{11} -dessaturasa de *S. littoralis*

Aquests estudis foren realitzats *in vitro*, per incubació de les glàndules feromonals en una dissolució dels àcids **12**, **18**, **25** i **45-47** en DMSO i en medi de Grace, tal i com es detalla a la part experimental.

3.3.2.1 Àcid 11-metiltetradecanoic, **12**

Els cromatogrames corresponents als extractes lipídics metanolitzats de glàndules incubades amb l'àcid **12** (Figura 3.16) mostraren, a més dels esters metílics derivats dels àcids grassos endògens del teixit glandular, un nou compost amb un temps de retenció de 20.08 min (vegeu rampa a l'apartat 5.2.6 de la part experimental), el qual fou assignat, en base al seu espectre de masses, com a l'ester metílic de l'àcid **12** ($M^+ = 256$). Dins de l'interval d'elució on era d'esperar el corresponent producte de dessaturació, l'ester metílic de l'àcid 11-metil-11-tetradecenoic ($M^+ = 254$), no es trobà cap indicatiu de la presència del compost i, per tant, es concloué que l'àcid 11-metiltetradecanoic no era substrat de la Δ^{11} -dessaturasa de *S. littoralis*.

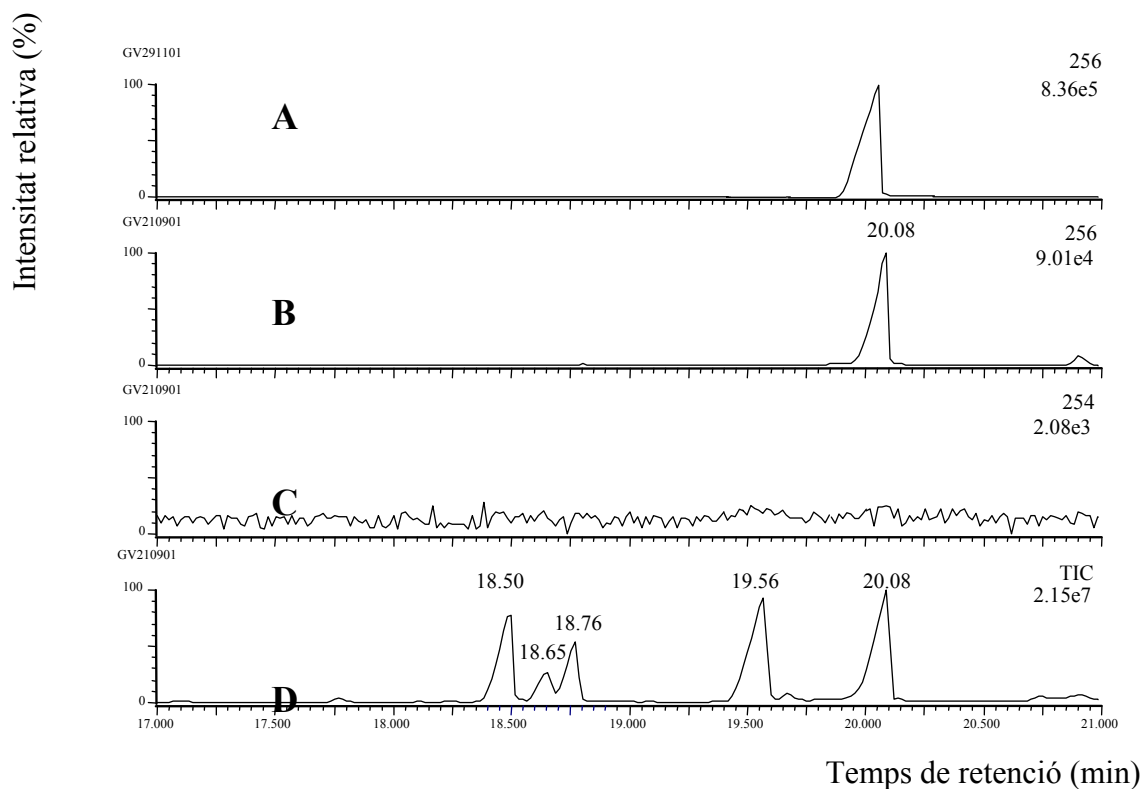


Figura 3.16 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: 11-Me-14:Me sintètic (A) i extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb **12** (B, C i D). D correspon al cromatograma de CG-EM (40-300 uma), mentre que A, B i C són els cromatogrames obtinguts en seleccionar els ions especificats a la dreta, que corresponen als ions moleculars de 11-Me-14:Me (256) i al producte de dessaturació (254). Al cromatograma D, els productes són: Z9-14:Me (18.50 min), E11-14:Me (18.65 min), Z11-14:Me + 14:Me (18.76 min), (Z,E)-9,11-14:Me (19.56 min) i (E,E)-10,12-14:Me + 11-Me-14:Me (20.08 min). Els compostos s'han anomenat tal com es detalla a l'apartat d'abreviatures

3.3.2.2 Àcid 11-metilhexadecanoic, **18**

Els cromatogrames corresponents als extractes lipídics metanolitzats de glàndules incubades amb l'àcid **18** (Figura 3.17) revelaren l'existència d'un nou compost, el qual no es detectà als extractes control. Aquest compost mostrava un temps de retenció de 23.98 min (vegeu rampa a l'apartat 5.2.6 de la part experimental), el qual fou assignat, en base al seu espectre de masses, a l'ester metílic de l'àcid **18** ($M^+ = 284$). Dins de l'interval d'elució on era d'esperar el corresponent producte de dessaturació, l'ester metílic de l'àcid 11-metil-11-hexadecenoic ($M^+ = 282$), no es trobà cap evidència de la presència d'aquest derivat i, per tant, es concloué que l'àcid 11-metilhexadecanoic no era substrat de la Δ^{11} -dessaturasa de *S. littoralis*.

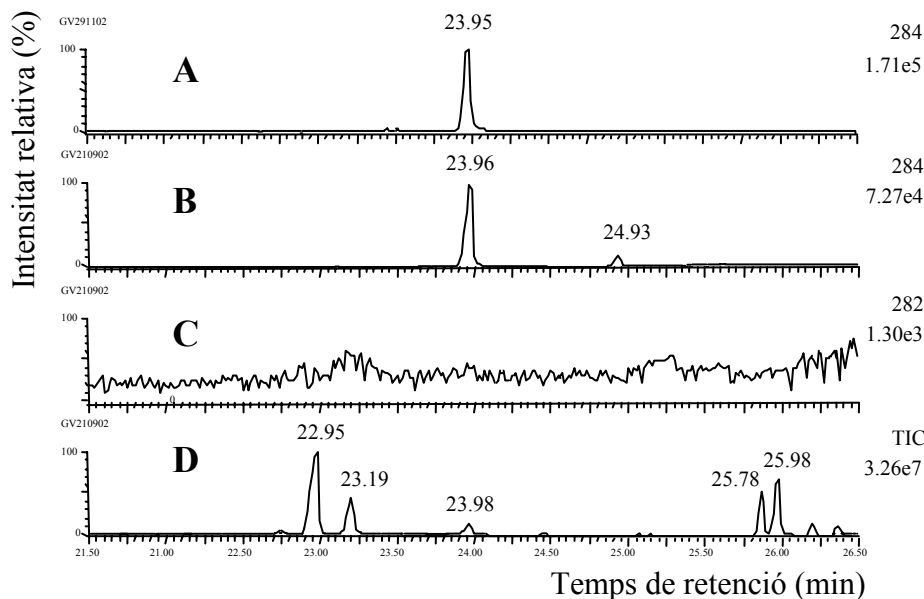


Figura 3.17 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: 11-Me-16:Me sintètic (A) i extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb **18** (B, C i D). D correspon al cromatograma de CG-EM (40-300 uma), mentre que A, B i C són els cromatogrames obtinguts en seleccionar els ions especificats a la dreta, que corresponen als ions moleculars de 11-Me-16:Me (284) i al producte de dessaturació (282). Al cromatograma D els productes són: Z11-16:Me (22.95 min), 16:Me (23.19 min), 11-Me-16:Me (23.98 min), (Z,Z)-9,12-18:Me (25.78 min), Z9-18:Me (25.98 min), Z13-18:Me (26.29 min) i 18:Me (26.36 min). Els compostos s'han anomenat tal com es detalla a l'apartat d'abreviatures.

3.3.2.3 Àcid 11-ciclopropilundecanoic, 25

En els cromatogrames corresponents als extractes lipídics metanolitzats de glàndules incubades amb l'àcid **25** (extracte experimental) (Figura 3.18) es detectaren els esters metílics derivats dels àcids grassos endògens del teixit glandular. En les condicions cromatogràfiques emprades, l'ester metílic de l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**, coelua amb l'ester metílic de l'àcid (Z,E)-9,11-tetradecadienoic ($t_R = 19.05$ min). Per això, en comparar el cromatograma de l'extracte experimental amb el corresponent a un extracte control, s'observà que el pic a $t_R = 19.05$ min era més intens a la mostra procedent de teixits incubats amb **25**. A més, tal com era d'esperar, l'espectre de masses del pic a $t_R = 19.05$ min presentava fragments corresponents a ambdós compostos (Z,E)-9,11-14:Me i 25:Me. A més, malauradament, l'11-ciclopropilidenundecanoat de metil, **28:Me**, procedent de dessaturació de **25**, eluia molt poc després de l'ester metílic de l'àcid

(*E,E*)-10,12-tetradecadienoic ($t_R = 19.6$ -19.7 min) (Figura 3.19). Però, malgrat aquest fet experimental, s'observà que els espectres de masses dels productes a $t_R = 19.61$ i 19.77 min, es diferenciaven per la intensitat d'alguns dels fragments, com per exemple l'ió molecular (M^+ 238), l'ió a m/z 81 i l'ió a m/z 68. Aquest resultat féu sospitar que l'extracte de teixits incubats amb **25** presentaven el l'11-ciclopropilidenundecanoat de metil, **28:Me** i, per tant, que l'àcid **25** havia estat dessaturat per la Δ^{11} -dessaturasa.

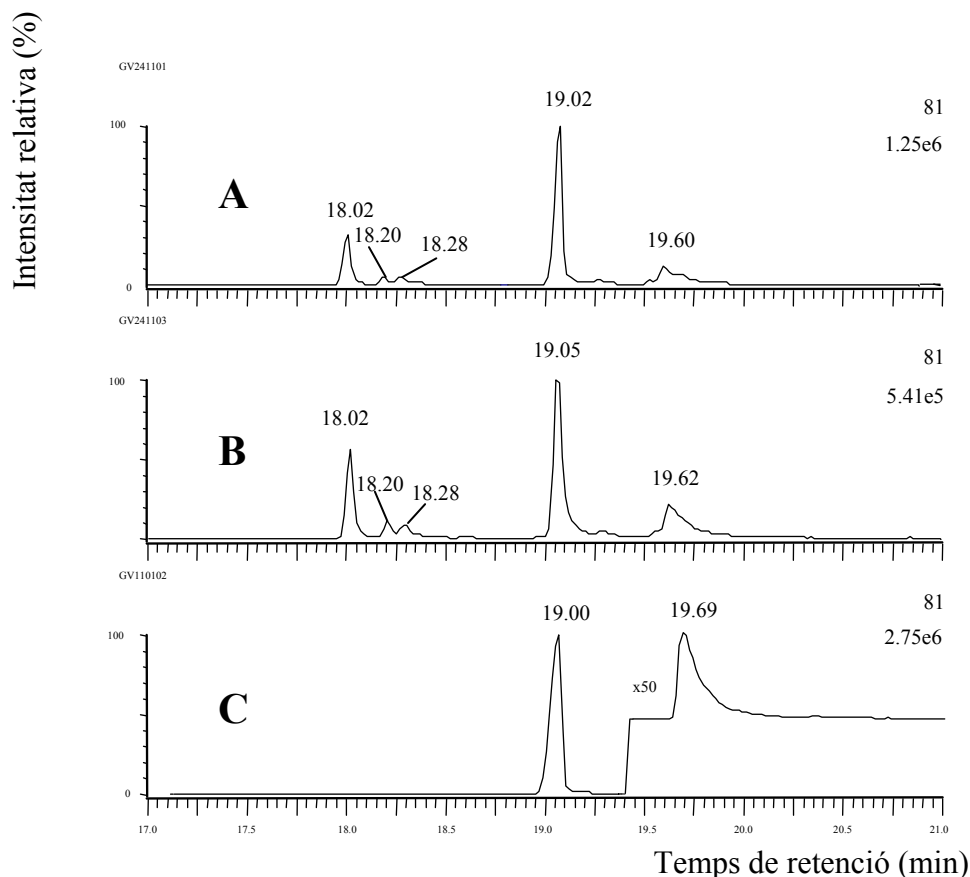


Figura 3.18 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb **25** (A), extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb DMSO (B) i **25:Me** i **28:Me** sintètics (C). Tots els cromatogrames provenen de seleccionar l'ió a m/z 81, que és el més abundant en l'espectre de masses de **28:Me**. Al cromatograma A, els productes són: Z9-14:Me (18.02 min), E11-14:Me (18.20 min), Z11-14:Me + 14:Me (18.28 min), (Z,E)-9,11-14:Me + 25:Me (19.02 min) i (*E,E*)-10,12-14:Me + **28:Me** (19.60 min). Els compostos s'han anomenat tal com es detalla a l'apartat d'abreviatures. La regió entre 18 i 20 min s'amplia a la Figura 3.19

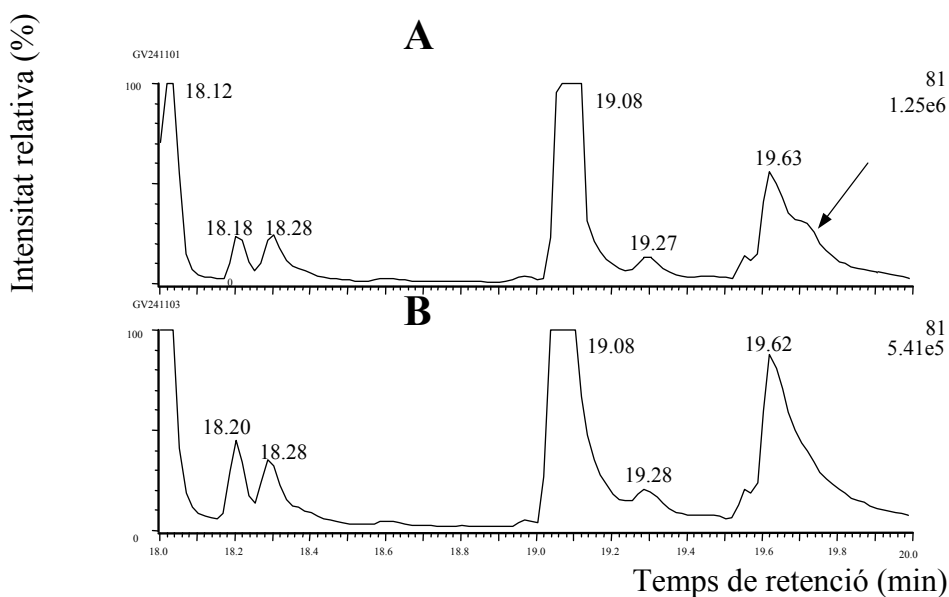


Figura 3.19 Regió entre 18 i 20 min dels cromatogrames A i B de la Figura 3.18. A l'espectre A, corresponent a un extracte lipídic metanolitzat de glàndules tractades amb **25**, la fletxa indica la presència del **28:Me**, que no s'observa al cromatograma B (control)

Per tal de confirmar aquest resultat, s'intentà separar els esters metílics dels àcids **25** i **28** utilitzant una columna polar. Quan s'emprà la columna HP-FFAP (Hewlett Packard) s'aconseguí separar l'ester metílic de l'àcid **25** del (*Z,E*)-9,11-14:Me, que en les noves condicions cromatogràfiques eluïa entre els esters metílics dels àcids grassos de 14 i 16 àtoms de carboni, exactament a $t_R = 26.55$ min (vegeu rampa a l'apartat 5.2.6 de la part experimental). En canvi, l'ester **28:Me** coelua amb l'ester metílic del l'àcid palmític endogen del teixit glandular ($t_R = 28.43$ min) (Figura 3.20). No obstant, la presència de **28:Me** a l'extracte s'intuï novament en seleccionar l'ió a m/z 81, que és el pic base de **28:Me** (Figura 3.21). Per tant, les noves condicions cromatogràfiques tampoc foren adients per confirmar la presència de **28:Me** als extractes de teixits incubats amb **25**.

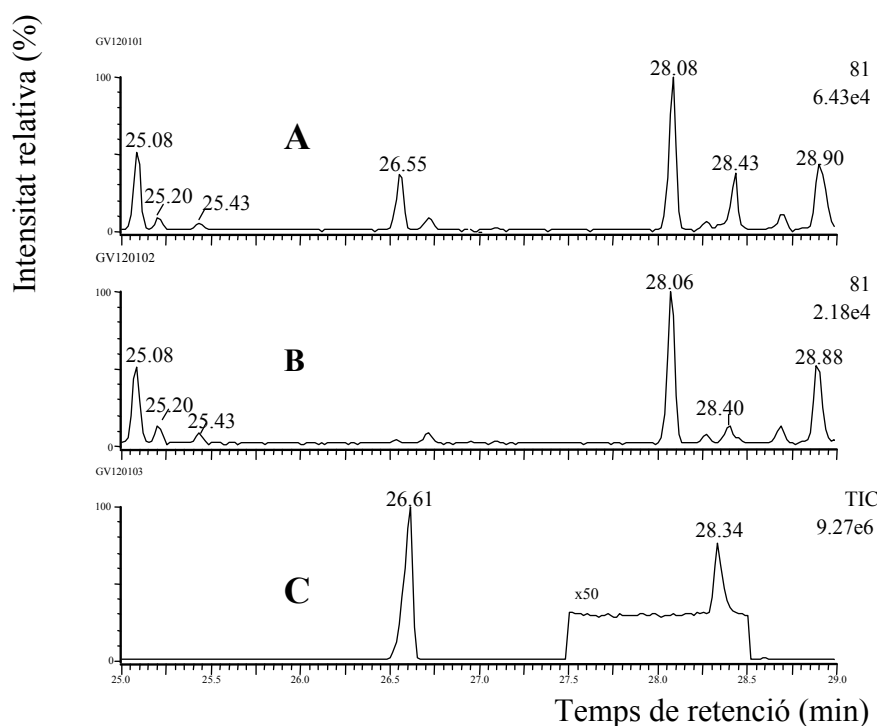


Figura 3.20 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb **25** (A), extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb DMSO (B) i 25:Me i **28:Me** sintètics (C). Tots els cromatogrames provenen de seleccionar l'ió a m/z 81, que és el més abundant en l'espectre de masses de **28:Me**. Al cromatograma A, els productes són: Z9-14:Me (25.08 min), E11-14:Me (25.20 min), Z11-14:Me (25.43 min), 25:Me (26.55 min), (Z,E)-9,11-14:Me (28.08 min), 16:Me (28.43 min) i Z9-16:Me (28.90 min). Els compostos s'han anomenat tal com es detalla a l'apartat d'abreviatures. La zona entre 27.5 i 29.5 min s'amplia a la Figura 3.21

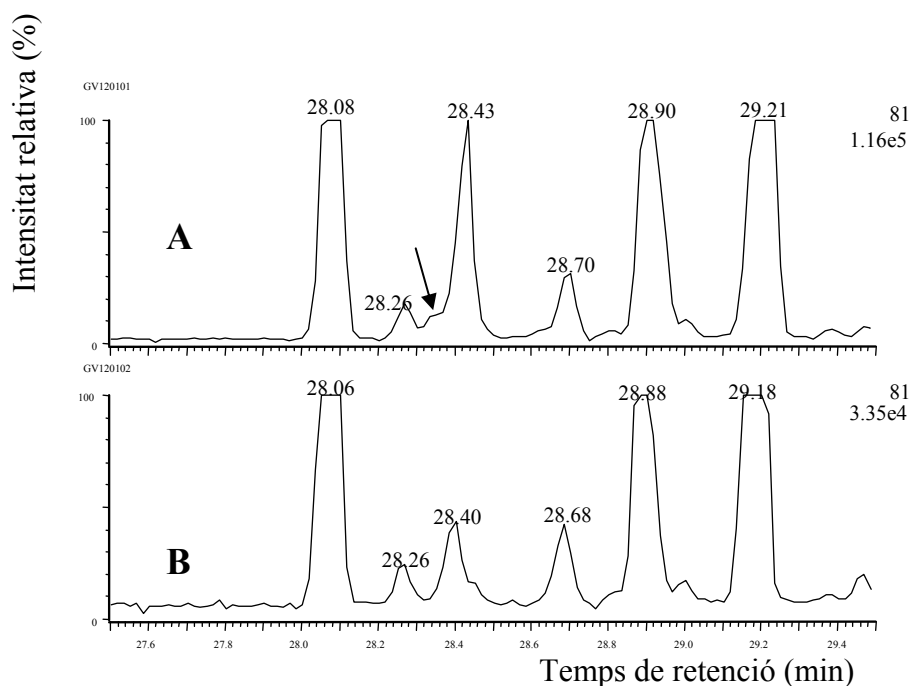


Figura 3.21 Regió entre 27.5 i 29.5 min dels cromatogrames A i B de la Figura 3.20. Al cromatograma A, corresponent a un extracte lipídic metanolitzat de glàndules tractades amb **25**, la fletxa indica la presència del **28:Me**, que no s'observa al cromatograma B (control)

Per tant, s'assajà una nova columna encara més polar (Supelco SP-2340). Amb aquesta columna, s'aconsegüí separar els dos esters metílics dels àcids **25** i **28** de la resta d'àcids grassos endògens del teixit glandular (Figura 3.22). L'ester saturat eluia a $t_R = 13.45$ min, 1.1 min abans del 16:Me ($t_R = 14.47$ min), i l'insaturat, **28:Me**, a $t_R = 14.68$ min, 0.2 min després del 16:Me ($t_R = 14.47$ min). Ambdós compostos, 25:Me i **28:Me**, eren presents als extractes lipídics de glàndules tractades amb **25**, però no hi eren en els extractes control. Tant els temps de retenció com els espectres de masses d'ambdós compostos eren idèntics als dels patrons sintètics (Figura 3.23). Així doncs, es va poder concloure que l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**, és substrat de la Δ^{11} -dessaturasa i es transforma en àcid l'11-ciclopropilidenundecanoic, **28**.

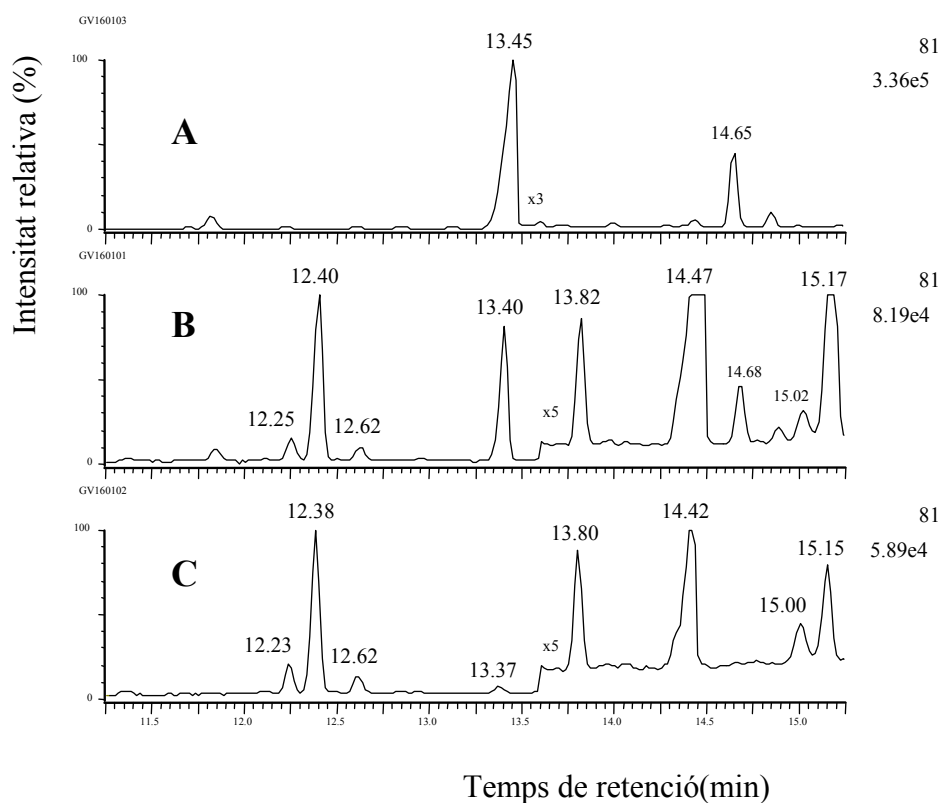


Figura 3.22 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: 25:Me i 28:Me (A), els extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb 25 (B) i extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb DMSO (C). Tots els cromatogrames provenen de seleccionar l'ió a m/z 81, que és el més abundant a l'espectre de masses de 28:Me. Al cromatograma B els productes són: *E*11-14:Me (12.25 min), *Z*9-14:Me (12.40 min), *Z*11-14:Me (12.62 min), 25:Me (13.40 min), 16:Me (14.47 min), 28:Me (14.68 min) i *Z*9-16:Me (15.17 min). Els espectres de masses dels compostos de $t_R = 13.45$ i 14.65 min (cromatograma A) i $t_R = 13.40$ i 14.68 min (cromatograma B) es mostren a la Figura 3.23. Els compostos s'han abreviat tal com es detalla a l'apartat d'abreviatures

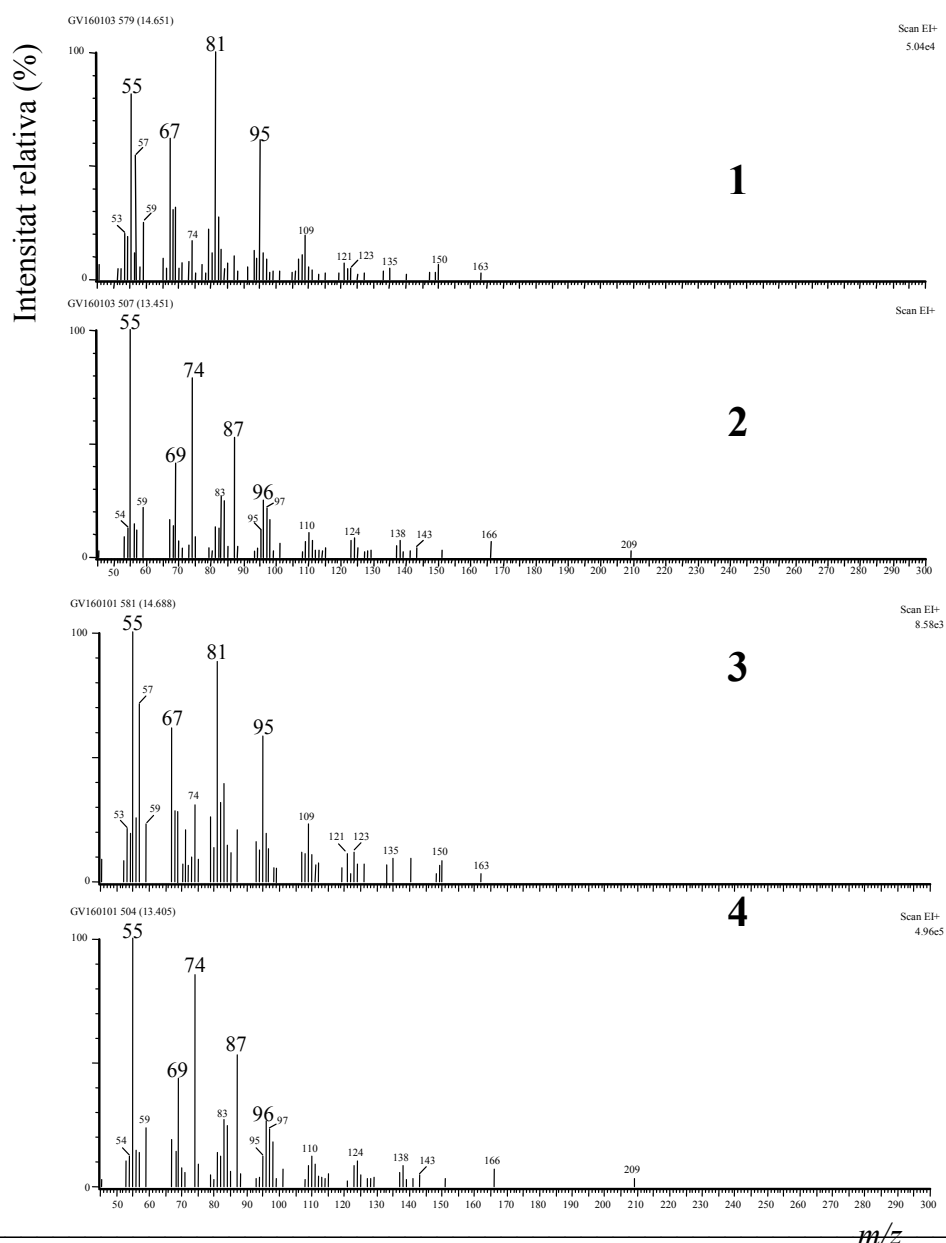


Figura 3.23 Espectres de masses dels compostos de $t_R = 13.45$ min (2) i 14.65 min (1) del cromatograma A de la Figura 3.22 i dels compostos de $t_R = 13.40$ min (4) i 14.68 min (3) del cromatograma B de la Figura 3.22

3.3.2.4 Àcids 11-(cis-2-alkilciclopropil)undecanoic, 45a-47a

Els cromatogrames corresponents als extractes lipídics metanolitzats de glàndules incubades amb els àcids **45a**, **46a** i **47a** (Figura 3.24) mostren que aquests ciclopropans foren dessaturats als corresponents àcids ciclopropilidènics. En comparar els cromatogrames dels extractes metanolitzats experimentals amb el d'un extracte control, s'observà que els derivats amb grups metil, etil i propil presentaven,

respectivament, temps de retenció de 21.45, 23.26 i 25.15 min. Els productes de dessaturació eluïren a 22.32, 23.95 i 25.95 min, respectivament. La identificació d'aquests compostos es realitzà en base els seus espectres de masses (Figura 3.25), ja que no es disposava dels patrons sintètics. Els espectres de masses d'aquests compostos mostraren fragments característics, així com l'ió molecular (M^+) a $m/z = 252$, 266 i 280 pels derivats metil, etil i propil, respectivament, i ions corresponents a la pèrdua de metoxi ($M^+ - 31$) o metanol ($M^+ - 32$) a partir de M^+ . Per pèrdua del fragment provinent del trencament de McLafferty a partir de M^+ ($M^+ - 74$) s'obtenen els ions a $m/z = 178$, 192 i 206 pels productes amb grups metil, etil i propil, respectivament.

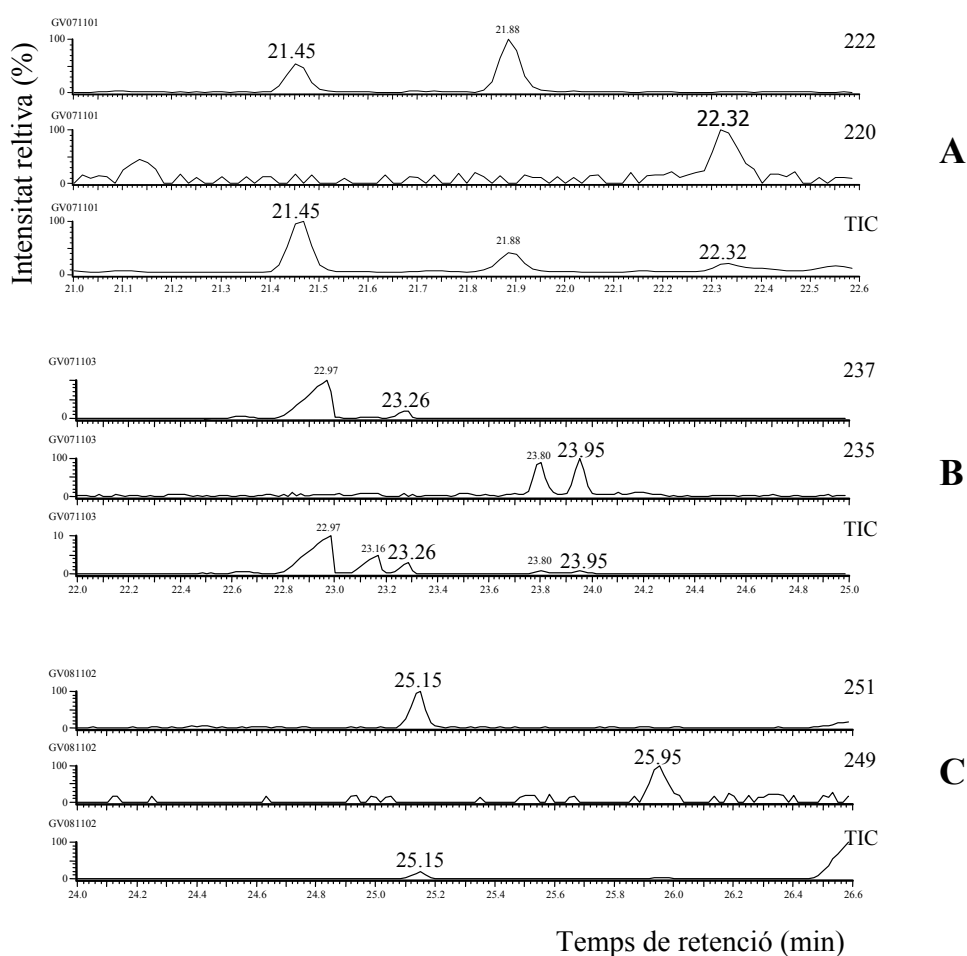


Figura 3.24 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb **45a** (A), **46a** (B) i **47a** (C). Aquests cromatogrames s'han obtingut en seleccionar els ions que corresponen a la pèrdua de metanol ($M^+ - 32$) o metoxi ($M^+ - 31$) a partir de M^+ . Els espectres de masses dels compostos de $t_R = 22.32$ min (cromatograma A), $t_R = 23.95$ min (cromatograma B) i $t_R = 25.95$ min (cromatograma C) es mostren a la Figura 3.25.

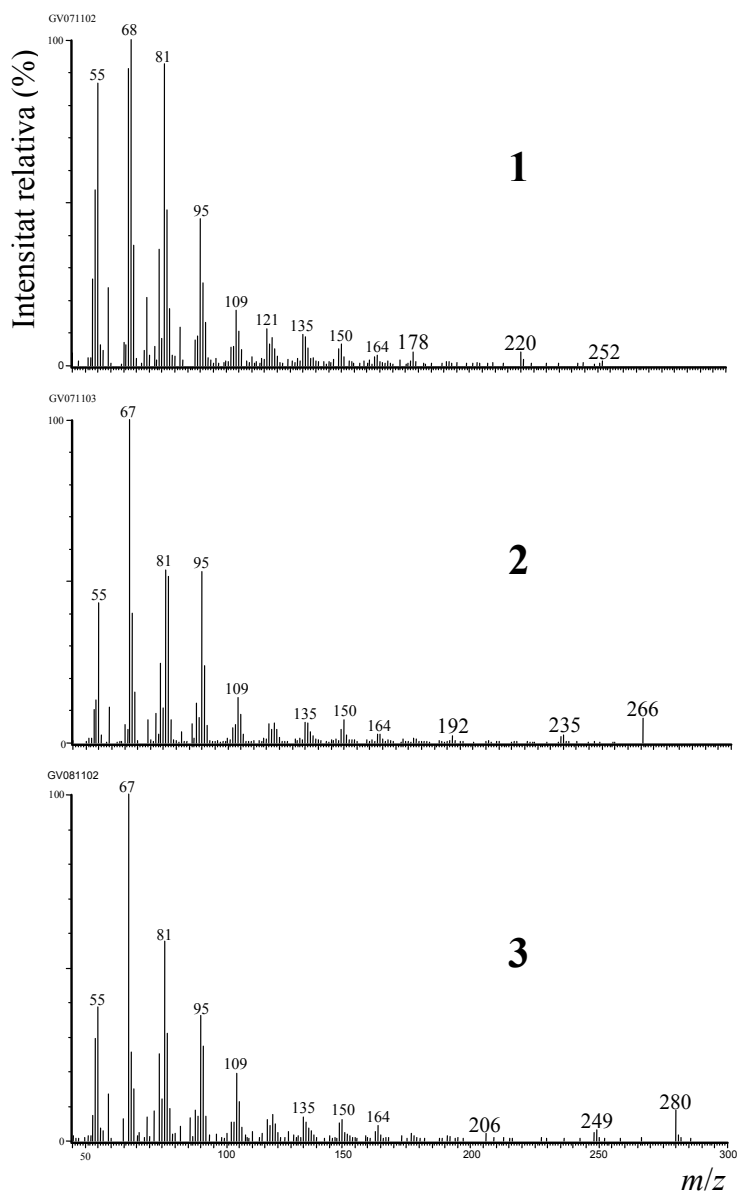


Figura 3.25 Espectres de masses dels compostos de $t_R = 22.32$ min (1) del cromatograma A de la Figura 3.24, $t_R = 23.95$ min (2) del cromatograma A de la Figura 3.24 i $t_R = 25.95$ min (3) del cromatograma A de la Figura 3.24

3.3.2.5 Àcids 11-(trans-2-*alquilciclopropil*)undecanoics, 45b-47b

Els cromatogrames corresponents als extractes lipídics metanolitzats de glàndules incubades amb els àcids **45b**, **46b** i **47b** (Figura 3.26) mostraren, a més dels èsters metílics derivats dels àcids grassos endògens del teixit glandular, uns nous composts amb temps de retenció de 20.54, 22.48 i 24.39 min, els quals foren assignats, en base els seus espectres de masses, com els èsters metílics dels àcids **45b**, **46b** i **47b**,

respectivament. Els productes de dessaturació dels derivats amb grups metil i etil presentaren temps de retenció similars als mostrats a l'apartat 3.3.2.4, en canvi, dins de l'interval d'elució on era d'esperar el corresponent producte de dessaturació del derivat propil, no es trobà cap indicatiu de la presència del compost i, per tant, es conclouí que l'àcid **47b** no era substrat de la Δ^{11} -dessorasa de *S. littoralis*. La identificació d'aquests compostos es realitzà en base als seus espectres de masses (Figura 3.25).

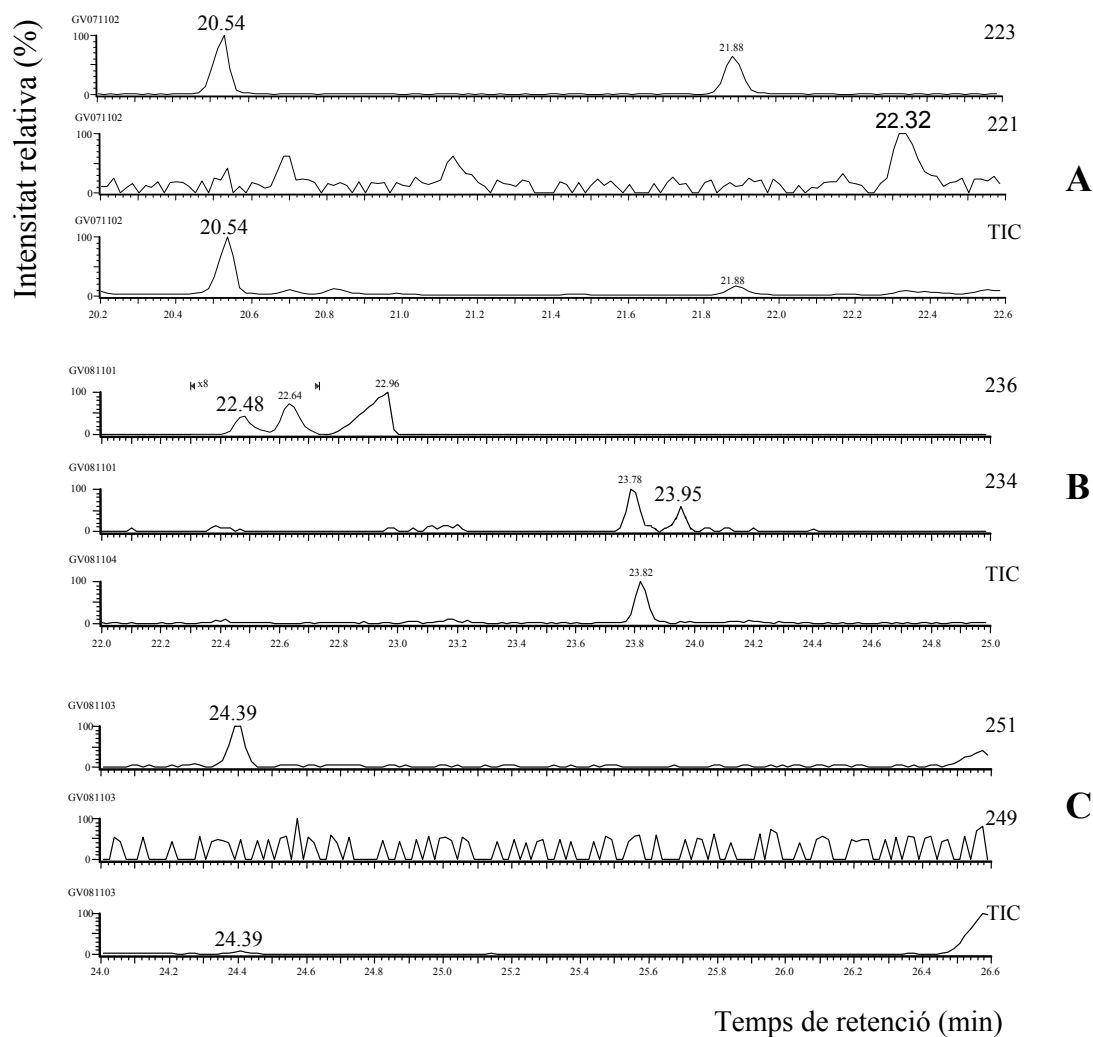


Figura 3.26 Cromatogrames de CG-EM corresponents a: extractes lipídics metanolitzats de glàndules tractades amb **45b** (A), **46b** (B) i **47b** (C). Aquests cromatogrames s'han obtingut en seleccionar els ions que corresponen a la pèrdua de metanol ($M^+ - 32$) o metoxi ($M^+ - 31$) a partir de M^+ . Els espectres de masses dels compostos de $t_R = 22.32$ min (cromatograma A), $t_R = 23.95$ min (cromatograma B) són idèntics als dels compostos d'estereoquímica *trans* i es mostren a la Figura 3.25 (1 i 2, respectivament).

3.4 DISCUSSIÓ

Les dessaturases d'àcids grassos són molt poc conegudes a nivell estructural. Si bé es coneixen les seqüències d'aminoàcids de moltes dessaturases, deduïdes a partir dels corresponents cADNs, l'estructura tridimensional d'aquests enzims només ha estat resolta pel cas de la Δ^9 estearoil-ACP dessaturasa del garrofer, *Ricinus communis*⁵⁵. Fa pocs anys, els grups de Lindqvist i Shanklin van aconseguir cristal·litzar i obtenir dades estructurals, per difracció de raigs X, sobre aquesta proteïna⁵⁵. Aquest estudi va mostrar que l'enzim presenta una cavitat hidrofòbica, a mode de canal, on s'allotja el substrat per a la posterior dessaturació. Shanklin i col·laboradors⁵⁴ demostraren, en un estudi posterior, que per mutagènesi dirigida es podia modificar l'especificitat de les dessaturases solubles. Així, per exemple, per mutació de dos aminoàcids del canal hidrofòbic d'unió al substrat, la Δ^9 estearoil-ACP dessaturasa passava a ser específica per l'àcid palmític. De forma similar, per mutació de 5 aminoàcids del centre actiu, la Δ^6 palmitoil-ACP dessaturasa passava a actuar com a Δ^9 estearoil-ACP dessaturasa.

Pel que fa als enzims de membrana, atès la dificultat que presenta el seu aïllament, no es disposa de cap dada sobre l'estructura del centre actiu. Per aquest tipus d'enzims, els estudis estructurals s'han de basar en aproximacions indirectes. Una possible aproximació és la utilització de substrats no naturals. Pel cas concret de la Δ^{11} -dessaturasa de lepidòpters, tal com ja s'ha mencionat, una primera dada d'interès estructural fou el descobriment de què un únic enzim dóna mescles isomèriques o un isòmer de forma exclusiva segons l'estructura del substrat. Pel cas concret del nostre model biològic, *S. littoralis*, mentre els àcids grassos de cadena llarga, entre C15 i C17 àtoms de carboni, són transformats en l'isòmer (*Z*)-11 de forma exclusiva, els substrats de C13 i C14 àtoms de carboni condueixen a barreges (*Z*)/(*E*)-11 de l'àcid monoinsaturat resultant¹¹⁵. D'aquests resultats en sorgí el model que s'ha explicat a la Figura 3.3, així com les hipòtesis sobre la zona d'unió enzim-substrat de l'apartat d'objectius. No obstant, l'àcid 12-metiltridecanoic, que presenta, formalment, ambdues conformacions, *pro-Z*11 i *pro-E*11, de l'àcid tridecanoic a la seva estructura, no fou metabolitzat per la Δ^{11} -dessaturasa. Aquest resultat podia indicar que:

- 1) La dessaturació s'inicia, per formació de l'intermedi que resultà de l'abstracció de C11-H, però la reacció no evoluciona atès la presència del grup metil a la posició C12, que fa canviar la reactivitat de l'hidrogen de C12. Els resultats obtinguts en

experimentos d'inhibició indiquen que l'àcid 12-metiltridecanoic no afecta l'activitat de la Δ^{11} -dessaturasa i, per tant, que no interacciona amb l'enzim. A la vista d'aquests resultats, aquesta possibilitat es considerarà poc probable.

- 2) El canvi conformacional que origina ambdós isòmers, (*Z*) i (*E*), del producte resultant té lloc per gir, a través de l'enllaç C11-C12, no de l'extrem terminal (C12 a C13 o C14), sinó de la part funcionalitzada (C1 a C11) de la molècula de substrat. A la vista de l'estereoespecificitat de la dessaturació¹³², aquesta possibilitat es considerarà poc plausible. En efecte, ambdós isòmers provenien de la pèrdua de l'àtom d'hidrogen pro-(*R*) de C11 del substrat, i és l'estereoquímica de l'àtom d'hidrogen que s'elimina de C12 la que és diferent segons es formi l'isòmer (*Z*) o l'(*E*). Per tant, es d'esperar que sigui la part terminal del substrat la que presenti diferent disposició espacial en ambdós conformers. Malgrat les expectatives, es sintetitzaren i assajaren els àcids **12** i **18**, però, tal com era d'esperar, tampoc foren dessaturats.
- 3) Una altra explicació possible és que l'àcid 12-metiltridecanoic fos massa voluminós a l'extrem terminal per tal d'unir-se a l'enzim. Per això es plantejà estudiar un substrat similar de menys volum, tal com són els àcids ciclopropànics **25**, **45-47**.

L'àcid ciclopropànic **25** fou sintetitzat per a estudiar les consideracions mecanístiques del procés de dessaturació. Els experiments duts a terme amb aquest àcid demostren clarament que **25** és un substrat de la Δ^{11} -dessaturasa. Aquest resultat recolza la presència, al centre actiu de l'enzim, d'una cavitat que permet l'allotjament dels dos conformers, dels substrats de C13 i C14, que formen ambdós enllaços, (*Z*) i (*E*), dels productes de dessaturació. Aquesta cavitat, però, no és prou espaiosa com per a encabir l'àcid 12-metiltridecanoic (Figura 3.27).

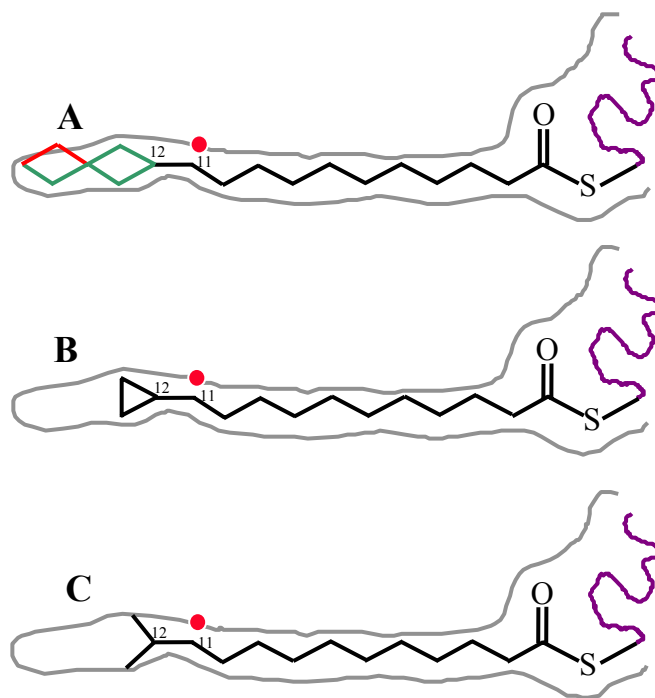


Figura 3.27 Representació esquemàtica d'un hipotètic centre actiu de la Δ^{11} -dessorasa. A, per als substrats de C13 a C16, es representen, en vermell, les conformacions no permeses i en verd, les conformacions possibles. B, Àcid 11-ciclopropilundecanoic acomodat al centre actiu enzimàtic. C, Àcid 12-metiltridecanoic, massa voluminós per encabar-se al centre actiu. El cercle vermell representa el cluster de ferro i el traç violeta, el fragment de CoA

Es troben publicats molts exemples de reaccions de dessoració catalitzades per Acil-CoA dessorases de membrana, indicant que aquest procés té lloc mitjançant dos passos: un primer pas, limitant de la reacció, d'abstracció de l'àtom d'hidrogen més pròxim al grup carboxílic i una posterior ràpida eliminació de l'hidrogen veí, tot generant l'enllaç olefínic⁷⁶. La naturalesa de l'intermedi de reacció format a partir de l'abstracció del primer hidrogen encara no és molt clara, no obstant, la formació d'un radical ha estat proposada per molts autors^{76,133}. Tenint en compte els estudis de criptoregioquímica de la Δ^{11} -dessorasa realitzats en el nostre grup¹¹⁵, caldria esperar la formació del radical **i** durant la reacció de dessoració de **25**, tot detectant els compostos derivats d'aquest intermedi (Figura 3.28). No obstant, no foren detectats els èsters metílics dels àcid (*Z*)- i (*E*)-11,13-tetradecadienoic per CG-EM, en els temps de retenció determinats amb patrons sintètics. Tampoc es trobaren el ciclopropilcarbinol **iv** ni l'alcohol **v** (Figura 3.28) després de la derivatització amb (*N,O*)-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida en el temps de retenció esperats en els

cromatogrames de CG-EM-SIM, tot seleccionant els ions de m/z : 328 (M), 313 (M-Me), 297 (M-MeO), 73 (TMS), 89 (OTMS), 103, 143, 287 (veure assignacions al quadre de la dreta).^{134,135} Per tant, com que només s'observà la formació del producte de dessaturació **28**, es va deduir que la reacció de dessaturació no té lloc a través d'un intermedi radicalari o, cas que es formi un radical ciclopropilcarbinil, la seva constant de reorganització és massa baixa per competir amb la eliminació de C12-H i formació del doble enllaç 11,12^{136,137}.

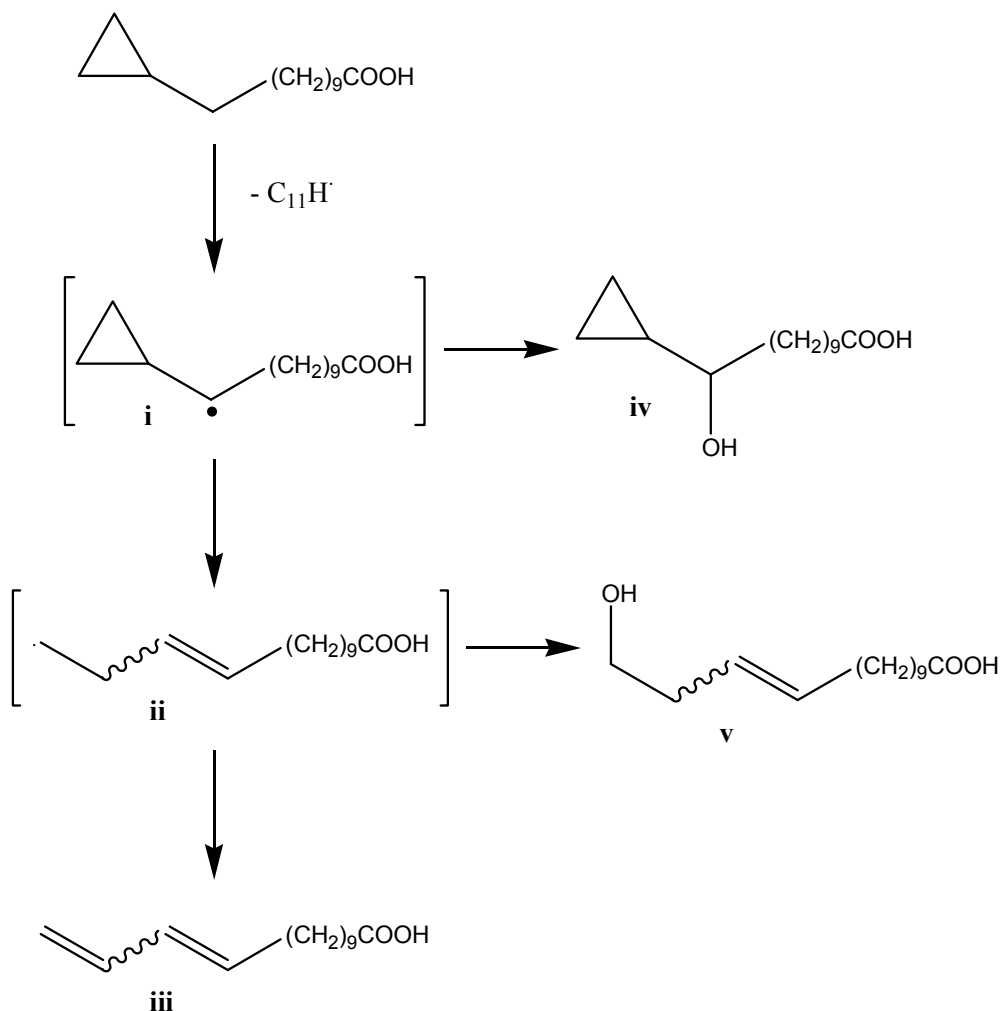
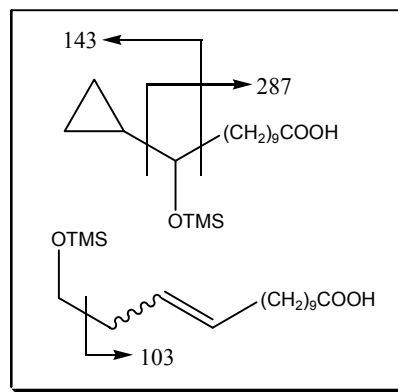


Figura 3.28 Productes teòrics, **iii-v**, esperats a partir del radical ciclopropilcarbinil derivat de **25**

Amb els àcids **45-47** s'estudiaren consideracions estèriques. Aquests ciclopropans es poden considerar com els anàlegs conformacionalment restringits de la cadena lineal dels substrats de la Δ^{11} -dessaturasa. La restricció conformacional s'introdueix per inserció d'un grup metilen entre C12 i C13. Com que, atenent a l'estereoespecificitat de la Δ^{11} -dessaturasa¹³², els compostos lineals de 15, 16 i 17 àtoms de carboni perden els àtoms d'hidrogen *pro*-(*R*) de C11 i C12, es pot concloure que només l'estereoisòmer (12*S*, 13*S*) (*cis*) de **47** i els dos estereoisòmers (12*S*, 13*S*) (*cis*) i (12*S*, 13*R*) (*trans*) de **45** i **46** seran dessaturats enzimàticament en 11,12. La representació d'aquestes dades (Figura 3.29) sugereix que el final del canal d'unió del substrat a la Δ^{11} -dessaturasa, que acomoda la part terminal de la cadena alquíllica del substrat, conté dues cavitats diferents: la gran (L, Figura 3.29), que acomoda els substrats *cis*-**45-47**, així com la conformació *eclipsada* dels substrats naturals, i la petita (S, Figura 3.29), que acomoda els substrats *trans*-**45-46**, però no el **47b**, així com el conformer *anticlinal* dels substrats naturals que forneixen el producte olefínic *E*. L'ús d'altres àcids grassos restringits conformacionalment o enantiomèricament purs, permetria obtenir informació addicional de la estructura tridimensional del domini d'unió del substrat a la Δ^{11} -dessaturasa.

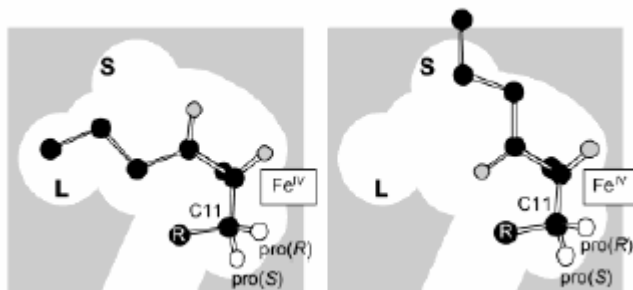


Figura 3.29 Models de (12*S*,13*S*)-**47a** (esquerra) i (12*S*,13*R*)-**47b** (dreta) i la hipotètica part terminal del canal d'unió del substrat a la Δ^{11} -dessaturasa mostrant les cavitats gran (L) i petita (S). Al dibuix de la dreta, es mostra com la cavitat petita no pot acomodar el grup metil terminal de **47b**. Les boles negres indiquen els àtoms de carboni i en gris clar els àtoms d'hidrogen del ciclopropà a C12 i C13. Els àtoms d'hidrogen proquirals C11 es mostren en blanc. El grup R indica (CH₂)₈COOH i el Fe^{IV} indica la posició del clúster de ferro oxidant. Aquest model ha estat obtingut amb el programa Hyperchem 6.0, treballant amb un angle dihedre C10-C11-C12-C13 de 0°

4.- ESFINGOLÍPIDS

4. ESFINGOLÍPIDS

4.1 INTRODUCCIÓ

Tal com s'ha indicat a l'inici d'aquesta memòria, un dels objectius actuals del nostre grup de recerca és estendre les investigacions sobre dessaturases a d'altres enzims d'interès biològic, com ara la dihidroceramida dessaturasa. Un primer pas en aquest sentit és dur a terme estudis d'especificitat pel substrat, dels quals no hi ha precedents més enllà de modificacions de la cadena de *N*-acil amb substituents de diferent llargada. Per tal d'obtenir un elevat nombre d'anàlegs per aquests estudis, es pensà en l'aplicació de les tècniques de química combinatòria. En relació amb aquesta temàtica, en aquest Capítol es descriu una metodologia per a la síntesi de quimiotèques d'anàlegs de ceramides i la seva aplicació per a la preparació d'una col·lecció exploratòria per tal d'estudiar els requeriments estructurals del substrat de la dihidroceramida dessaturasa.

4.1.1 Síntesi d'anàlegs d'esfingolípids

Atenent als punts de diversitat estructural dels SLs, que es representen a la Figura 4.1, hi ha alguns treballs on es descriu l'obtenció d'anàlegs resultants de modificar aquests punts^{138,139}, que presenten el desenvolupament de nous mètodes sintètics per a la introducció de grups diversos al cap polar, la variació de la llargada de les cadenes o bé modificacions en els àtoms de carboni terminals a fi d'introduir-hi grups polars i/o funcions reactives amb diferents propòsits.

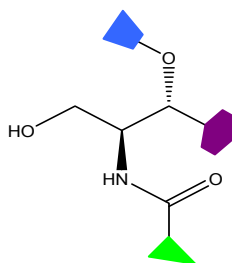


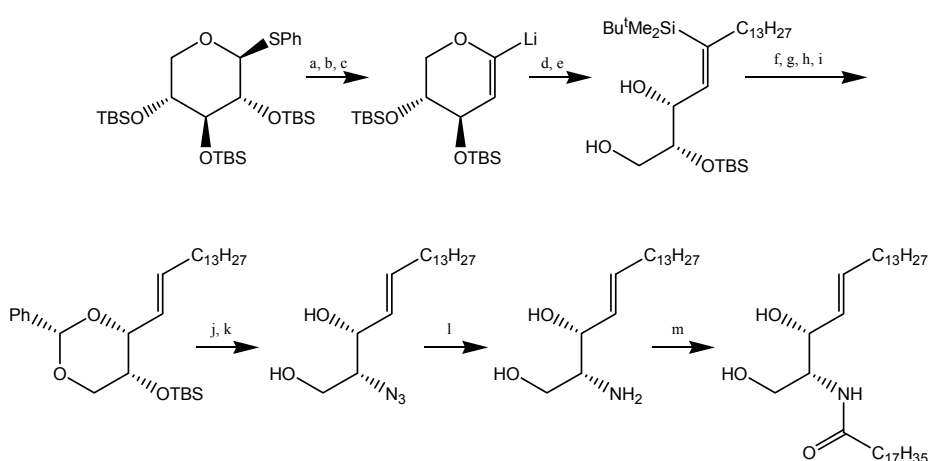
Figura 4.1 Regions de l'esquelet esfingoide susceptibles de modificació

4.1.1.1 Antecedents en la síntesi d'esfingolípids

El desenvolupament de nous mètodes de síntesi estereo i enantioselectiva d'esfingolípids, ha estat un camp molt actiu d'investigació. Des de la primera síntesi d'esfingolípids, desenvolupada per Shapiro^{140,141}, s'han descrit diferents aproximacions, algunes de les quals utilitzen precursors quirals com sucres o aminoàcids i d'altres que fan ús de la inducció asimètrica per tal de controlar l'estereoquímica dels nous centres estereogènics.

En el camp de la síntesi enantioselectiva, existeixen diversos treballs on s'han desenvolupat diferents mètodes¹⁴²⁻¹⁵⁴.

Els carbohidrats han estat molt utilitzats en la síntesi d'esfingolípids, degut a que són productes de partida assequibles en forma enantiomèricament pura¹⁵⁵⁻¹⁶². Freqüentment, es parteix d'un sucre natural, com ara la D-xilosa, la D-glucosa, la D-glucosamina, la D-galactosa o bé l'àcid D-isoascòrbic, els quals, mitjançant un trencament oxigen-carboni generen un aldehyd, que permet introduir la cadena alifàtica desitjada utilitzant reactius organometàl·lics. Dins d'aquesta estratègia de síntesi d'esfingolípids, cal destacar la publicada recentment per Milne i col¹⁶¹ l'any 2002, on es descriu la síntesi estereocontrolada de la D-eritro-esfingosina i la D-eritro-ceramida a partir de l'1-tio-β-D-xilopiranosid, on el pas clau és l'obertura estereoselectiva de l'anell mitjançant una transposició en presència de Cu(I) com a catalitzador (Figura 4.2).



Reactius i condicions: a) H_2O_2 ; b) LDA; c) *t*-BuLi; d) RLi, CuBr·SMe₂ / Et₂O·SMe₂ / -40°C a ta / 12h; e) H_2O ; f) PhCH(OMe)₂, H⁺; g) Bu₄NF; h) NaH, 15-crown-5; i) Bu₄NF; j) (PhO)₂P(O)N₃, DIAD, PH₃P; k) MeOH, H⁺; l) Zn; m) *n*-C₁₇H₃₅CO₂C₆H₄-*p*-NO₂

Figura 4.2 Síntesi d'esfingolípids de Milne i col.

L'ús d'aminoàcids^{152,163-183} com a precursors és, juntament amb l'ús de carbohidrats, l'alternativa sintètica més emprada, ja que proporciona la funcionalitat 2-amino-1,3-diol que contenen les bases esfingoides. L'aminoàcid més utilitzat ha estat la *L*-serina, sobretot a partir de l'any 1988, quan Garner i col¹⁶⁸ utilitzaren l'aldehid de la *L*-serina (aldehid de Garner, Figura 4.3), preparat a partir de l'èster metílic de la *L*-(*N*-Boc) serina, per a la síntesi d'anàlegs d'esfingolípids.

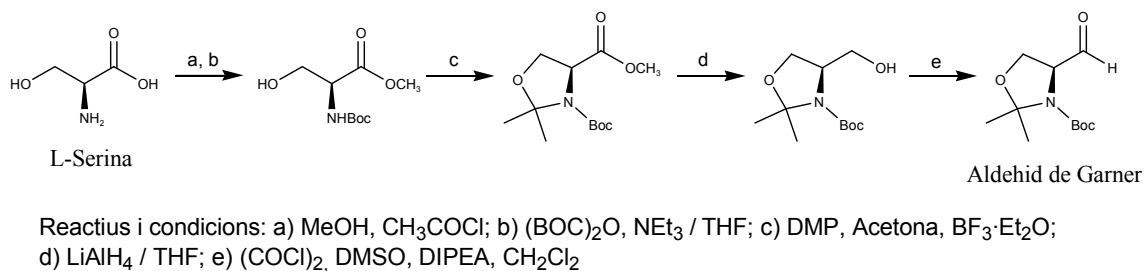


Figura 4.3 Síntesi de l'aldehid de Garner

A partir d'aquí es desenvoluparen diferents aproximacions per a la síntesi de SLs, entre les quals es destacaran les més representatives.

Una de les primeres va ser la desenvolupada pel mateix Garner¹⁶⁸ basada en l'addició de l'1-pentadecil liti sobre l'aldehid i que permet arribar a la *D-eritro*-esfingosina i a la *D-treo*-esfingosina amb elevat control estereoquímic, en aquest cas, amb una relació *eritro/treo* de 8:1 (Figura 4.4).

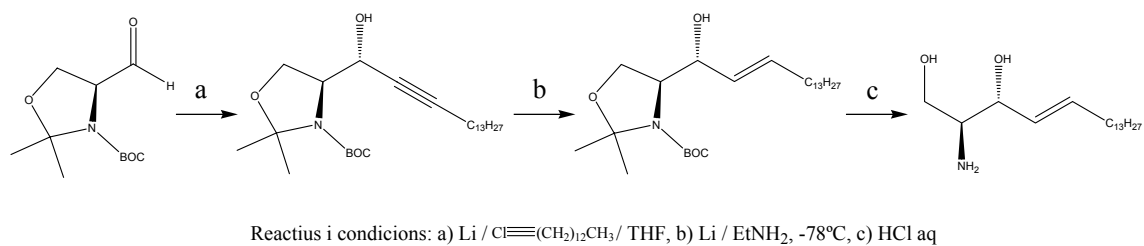


Figura 4.4 Síntesi de Garner i col. de l'esfingosina

Més tard, l'any 1988, Herold¹⁶⁹ va desenvolupar una via sintètica, perfeccionant el procediment de Garner, amb l'objectiu d'obtenir ambdós diastereomers (*eritro* i *treo*) de l'esfingosina amb elevada diastereoselectivitat. Herold va estudiar l'addició d'organometàl·lics sobre l'aldehid de Garner en diferents condicions i va demostrar que la diastereoselectivitat podia controlar-se en funció del dissolvent i del tipus d'espècie organometàl·lica emprada en la reacció.

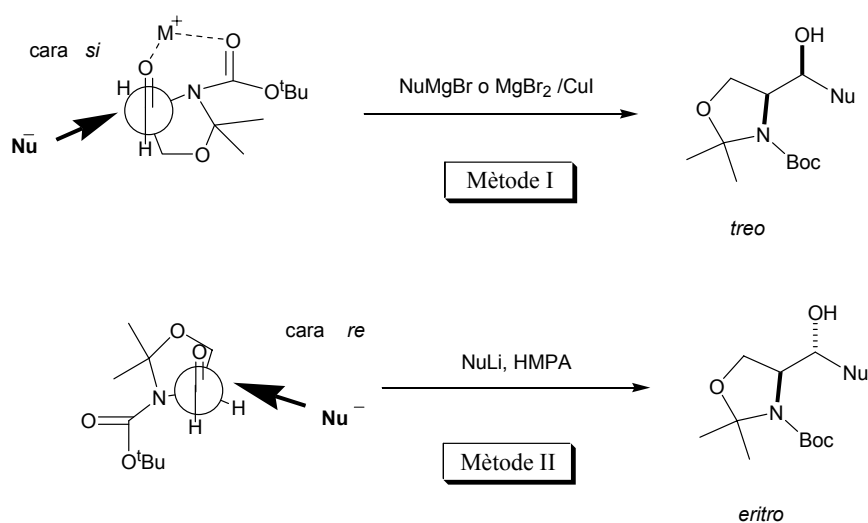
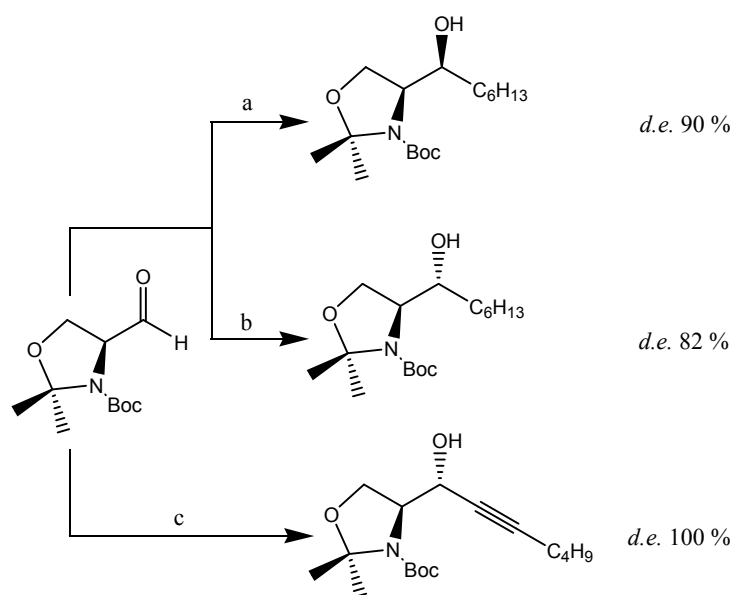


Figura 4.5 Control de la diastereoselectivitat de l'addició d'organometàl·lics a l'aldehid de Garner

Les elevades diastereoselectivitats obtingudes per l'isòmer *treo* s'aconseguien utilitzant MgBr_2 i CuI , fet que s'explica a partir d'un model basat en el control per quelació (Mètode I, Figura 4.5). En canvi, l'isòmer *eritro* s'obté majoritàriament quan s'afavoreixen les condicions no quelants (Mètode II, Figura 4.5), utilitzant reactius organolítics i HMPA com a cosolvent, ja que llavors el grup amino en α i el grup carbonil adopten un àngle dihedre de 90° , cosa que permet un atac de tipus Felkin-Anh sobre la cara *re* de l'aldehid¹⁶⁹.

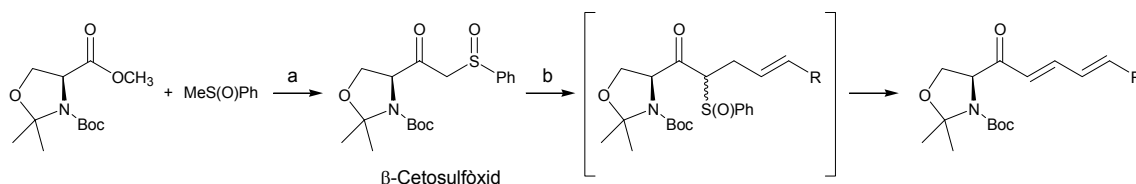
Villard i col. van descriure una síntesi estereoselectiva d'anàlegs de GalCer¹⁷⁷. La formació del precursor *eritro*, amb una elevada diastereoselectivitat, s'explica a partir de l'addició sobre l'aldehid de Garner d'organolítics (*d.e.* 100% de l'isòmer *eritro*) i organozincats, utilitzant *N,N*-dibutiletanolamina com a cosolvent (*d.e.* 82% de l'isòmer *eritro*). En canvi, el precursor *treo* s'obté per addició de reactius de Grignard obtenint una diastereoselectivitat del 90% (Figura 4.6).



Reactius i condicions: a) $C_6H_{13}MgBr$, Et_2O , t.a., 3h
 b) $(C_6H_{12})_2Zn$, N,N-dibutiletanolamina, toluè, t.a., 2h
 c) 1-hexinilliti, THF, t.a., 3h

Figura 4.6 Diastereoselectivitat dels diferents reactius emprats per Villard

Una altra aproximació interessant descrita per Chun per tal d'obtenir anàlegs d'esfingosina i esfinganina^{152,176}, es basa en l'alquilació en α d'un β -cetossulfòxid per generar un intermedi que, per eliminació, fornirà el doble enllaç desitjat (Figura 4.7).



Reactius i condicions: a) LDA, THF, $-78^\circ C$ a t.a.; b) $R-CH=CH-X$, K_2CO_3 , DMF, t.a., 3d

Figura 4.7 Síntesi d'esfingolípids per addició nucleòfila sobre un β -cetossulfòxid

Un mètode de síntesi d'anàlegs de SoP i SaP fou descrit per Schick i col.¹⁸⁴, mitjançant la formació de l'amida de Weinreb com a intermedi de la reacció (Figura 4.8). L'atac nucleòfil d'un reactiu de Grignard sobre aquesta amida i la posterior reducció de la cetona formada amb $NaBH_4$ forneix la mescla diastereomèrica d'aminoalcohols amb una relació *eritro-treo* de 3:1.

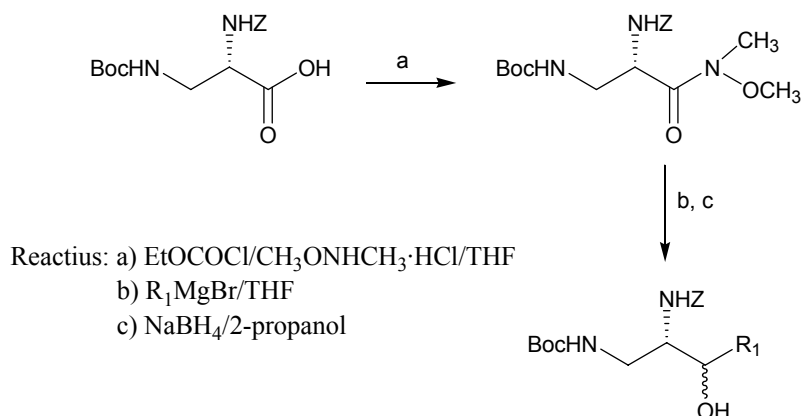


Figura 4.8 Síntesi descrita per Schick i col.

L'aldehid de Garner s'obté a partir de la serina o d'un equivalent sintètic de la mateixa, però en el cas de la *homo*-serina hi ha moltes dificultats per a generar aquest sistema cíclic en la protecció de l'hidroxil primari i del grup amino de la posició 3. A partir d'aquest fet, hi ha diferents autors, com Lee i Shikata^{173,174,182}, que descriuen la formació d'anàlegs de SLs a través de la formació d'un intermedi β -cetofosfonat i la posterior introducció del doble enllaç mitjançant la reacció de Horner-Wadsworth-Emmons (Figura 4.9). Finalment, la reducció estereoselectiva de la cetona proporciona l'equel·let de l'*homo*-esfingosina desitjat amb bona diastereoselectivitat.

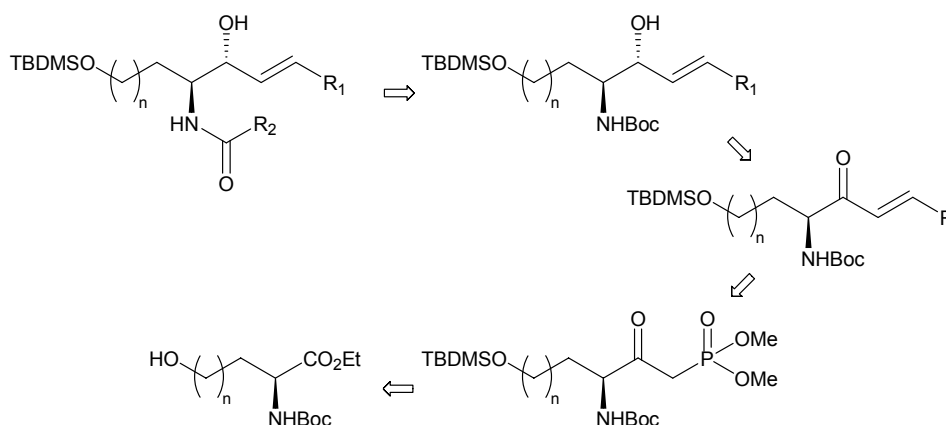


Figura 4.9 Esquema proposat per Lee i Shikata

D'entre les posteriors síntesis d'anàlegs d'homoesfingolípids, també en cal destacar les descrites per Kobayashi¹⁵³ i Nakamura¹⁵⁴, les quals utilitzen la reacció de Mannich, tot emprant Cu(II) com a catalitzador (Figura 4.10).

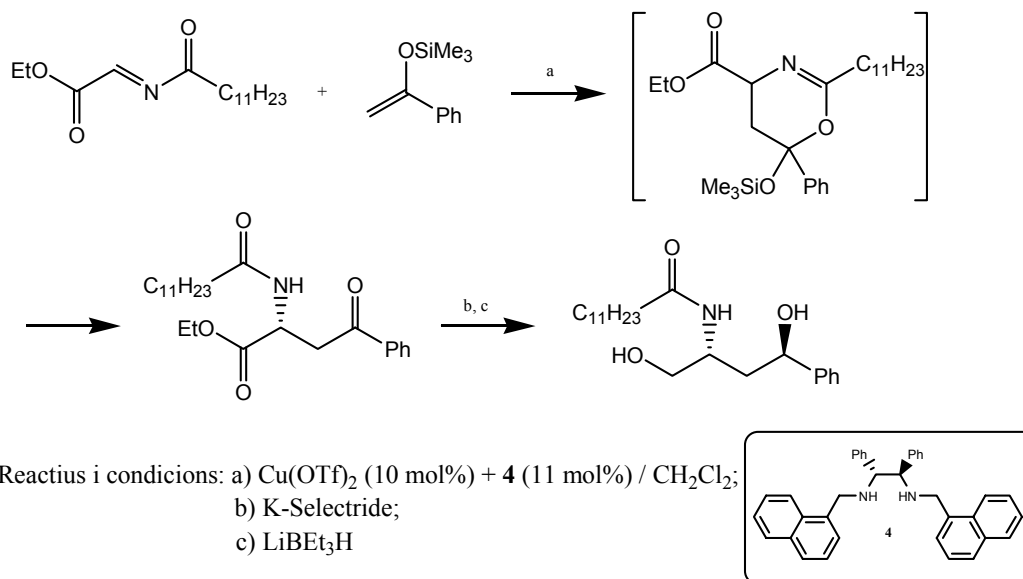


Figura 4.10 Síntesi d'esfingolípids via reacció de Mannich

Tal com ja s'ha comentat, la síntesi d'anàlegs de SLs, és un camp de recerca molt actiu. No obstant, cal destacar que l'ús de mètodes basats en la síntesi en fase sòlida, així com la síntesi d'anàlegs mitjançant aproximacions combinatòries, no està gens extès. A la bibliografia es troba descrit un únic exemple¹⁸⁵, on es mostra la formació d'una quimioteca de 528 anàlegs de ceramida a partir de 16 bases esfingoides i 33 grups acil diferents. Chang descriu la formació de l'enllaç amida fent ús d'èsters activats ancorats sobre un suport sòlid (Figura 4.11), sense necessitat de protegir l'alcohol secundari, ja que es demostra que la *N*-acilació és 10^5 vegades més ràpida que la *O*-acilació¹⁸⁶.

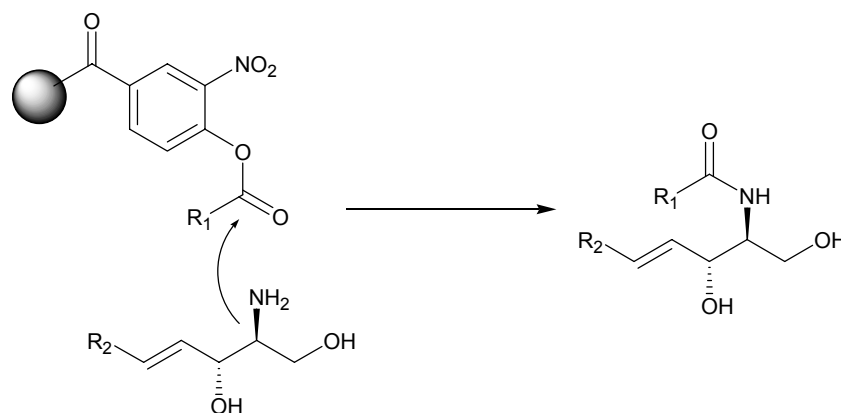


Figura 4.11 Formació d'anàlegs de ceramida en fase sòlida mitjançant l'ús d'èsters activats

4.1.2 Introducció a la síntesi en fase sòlida

En els darrers anys, la síntesi orgànica en dissolució està essent complementada per un altre tipus d'aproximació basada en l'ancoratge dels reactius i/o productes a un suport de tipus polimèric; és l'anomenada síntesi orgànica en fase sòlida (SPOS).

La síntesi de pèptids en fase sòlida va ser introduïda per primer cop l'any 1963 per Merrifield¹⁸⁷. Aquesta fou conduïda sobre un suport format per una matriu de poliestirè entrecreuat amb un 2% de divinil benzè. Les tècniques de fase sòlida s'han perfeccionat durant els anys per tal d'obtenir pèptids amb molt bon rendiment, però no va ser fins a la segona meitat de la dècada dels 80, que es va aplicar aquesta tècnica per obtenir diversos pèptids de forma simultània en un mateix recipient de reacció. L'any 1991, Bayer emprà un polímer insoluble, com ara el poliestirè, amb possibilitat de ser filtrat, que funcionava alhora com a grup protector de l'extrem carboxil terminal de l'aminoàcid¹⁸⁸. D'aquesta forma, mitjançant successives etapes d'acoblament-desprotecció de l'extrem amino terminal, s'aconseguiria la formació del polipèptid desitjat, el qual es podia alliberar de la resina i purificar. L'estalvi de temps, comparat amb el mètode clàssic en dissolució, és força considerable, ja que els reactius químics emprats en les diferents etapes de reacció es poden eliminar simplement per filtració.

Amb la síntesi de pèptids més llargs, ràpidament es va veure que l'entrecreuant de la resina havia de ser optimitzat. Els millors resultats es van aconseguir emprant una resina amb un entrecreuant de l'1%. Aquesta resina conté una estructura molecular interna de poliestirè, formada a partir de la polimerització d'1% de divinilbenzè amb estirè i la posterior clorometilació dels grups benzè (Figura 4.12). Aquest grau d'entrecreuant és el suficient per obtenir una resina amb una elevada duresa mecànica i insolubilitat, però no és massa gran com per evitar l'inflat de l'estructura en dissolvents orgànics; característica essencial que dona una flexibilitat interna al polímer, facilitant la difusió dels dissolvents i dels reactius cap al seu interior, afavorint la funcionalització.

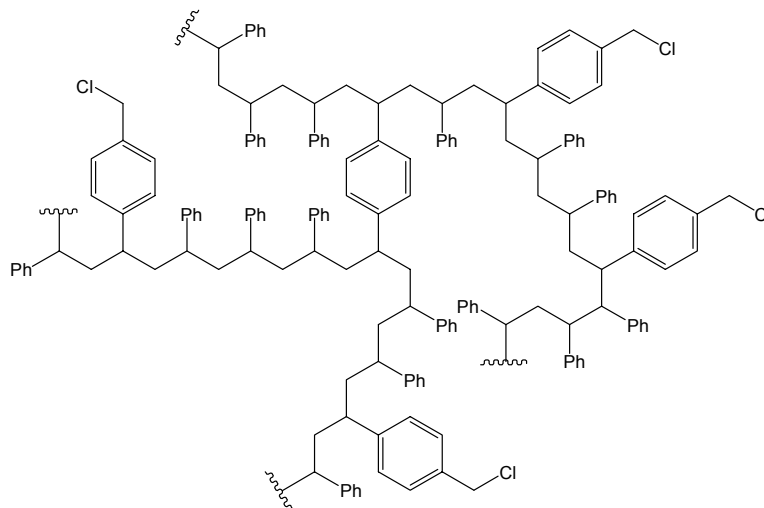


Figura 4.12 Estructura de la resina tipus Merrifield

Durant gairebé quatre dècades, aquest mètode ha estat investigat i optimitzat d'una forma exhaustiva degut al seu ús en el camp de la química de pèptids.

Alguns dels avantatges de la fase sòlida envers de la química en dissolució es resumeixen a continuació¹⁸⁹:

- Simplificació considerable dels procediments de reacció. S'eliminen les etapes de purificació i aïllament dels intermedis, degut a què tant els substrats com els productes finals estan units covalentment al suport. S'utilitza un excés de reactius i, un cop finalitzada la reacció, només cal filtrar el suport i rentar-lo exhaustivament.
- Es poden obtenir rendiments elevats (>99.9%) emprant un gran excés de reactius sempre que no es produeixin reaccions colaterals indesitjables. De fet, una síntesi de molts passos sense purificació només pot furnir un producte pur si cada pas de reacció procedeix unívocament i de forma quantitativa.
- Existeix la possibilitat de regenerar el suport i reutilitzar-lo per a una nova síntesi, sempre i quan s'hagin escollit les condicions apropiades de desancoratge del producte de la resina. Tanmateix, el preu del suport no esdevé el factor limitant quan es tracta de la síntesi d'un producte d'alt valor afegit.
- S'aplica el principi de dilució elevada. D'aquesta forma, amb la utilització de suports amb un nivell de càrrega baix, és a dir, amb una baixa funcionalització (< 0,8 mmol de grup funcional/g), es poden suprimir les reaccions colaterals indesitjables, com ara la formació d'entrecreuaments, els acoblaments múltiples, etc.
- Possibilitat d'automatització.

No obstant això, també cal considerar una sèrie de desavantatges respecte de la química en dissolució:

- Si hom considera que la major part dels punts de reacció (>99%) es troben a l'interior de la resina, un paràmetre molt important en la química en fase sòlida és l'inflament del suport, equivalent a la solvatació en dissolució, proporcionant lliure accés dels reactius als grups funcionals del polímer¹⁹⁰. És a dir, un polímer que no s'infla quan es posa en contacte amb un dissolvent proporciona poques oportunitats als reactius per què interaccionin.
- La sensibilitat de la resina a la fricció fa que aquesta presenti una baixa estabilitat mecànica, fet que impedeix l'ús d'agitació magnètica en la química en fase sòlida, ja que una resina trencada comporta pèrdues importants a l'hora de filtrar.
- La caracterització dels intermedis de reacció de cada etapa d'una síntesi sobre suport sòlid suposa actualment un gran problema. Quantificar la càrrega de la resina (rendiment) i determinar l'estructura del producte unit al suport, així com dels possibles subproductes, etapa que és bastant directa en dissolució, esdevé un problema de difícil solució. Els paràmetres típics que determinen la qualitat d'una síntesi com són la puresa, el rendiment, la estereoespecificitat, etc, no poden ser determinats d'una forma trivial. Malgrat tot, durant els darrers anys s'han desenvolupat diversos mètodes analítics per a la caracterització dels compostos units a un suport polimèric, capaços de donar informació sobre l'extensió de la reacció. En destaquen:

- Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FT-IR) i FT-Raman: degut a la interferència de l'esquelet del polímer, i de les baixes càrregues emprades, els espectres d'IR convencionals són difícils d'interpretar i són sovint bastant incerts. L'espectre de FT-IR, mesurat sota condicions definides i la possibilitat d'enregistrament d'espectres a partir d'un únic gra (*single bead FT-IR*), proporciona informació tant a nivell qualitatiu com quantitatiu, i resulta especialment útil quan s'observa l'aparició o desaparició d'una banda no interferida per l'esquelet polimèric¹⁹¹.
- Espectroscòpia en estat sòlid MAS (*magic angle spinning*) de ¹H i de ¹³C^{192,193} i en suspensió (*gel fase*)¹⁹⁴ de ¹³C.

- Espectrometria MALDI-TOF¹⁹⁵.
- Anàlisi elemental: aplicable quan un element (N, P, S, halogen, etc) es perd o es guanya durant la reacció química. És una tècnica destructiva que consumeix grans quantitats de resina (5-50 mg), alhora que resulta molt difícil alliberar completament el suport de reactius o dissolvents, els quals poden interferir en la quantificació.
- Valoració colorimètrica de grups reactius. Els tests de Kaiser¹⁹⁶ i de l'ester de p-nitrofenil¹⁹⁷ per a la determinació tant qualitativa com quantitativa de grups $-NH_2$ lliures i el test d'Ellman¹⁹⁸ per a la determinació de grups $-SH$ en són bons exemples.
- Gravimetria. És un mètode poc fiable.

4.1.3 Introducció a la química combinatòria

El tret característic i essencial de la química combinatòria és la capacitat de generar una gran quantitat de compostos simultàniament. El seu origen es troba lligat al desenvolupament de la síntesi de pèptids en fase sòlida.

Tradicionalment, la síntesi química es caracteritza per ser lenta, i costosa; la química combinatòria ha trencat amb molts prejudicis i permet assolir un nivell de productivitat química inimaginable fa només deu anys, ja que descarta dos dels conceptes més clàssics de la síntesi orgànica, com són la purificació i la caracterització dels intermedis a cada etapa.

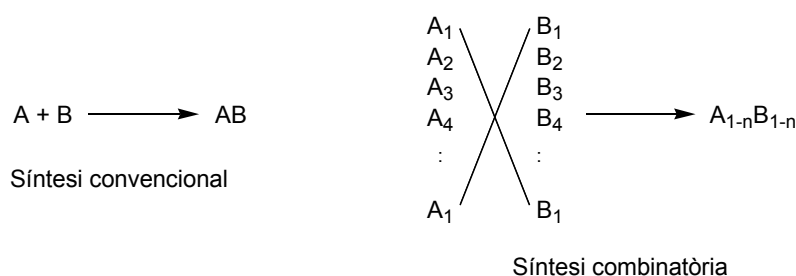


Figura 4.13 El contrast entre la química convencional i la combinatòria es troba en el nombre de productes finals

Convencionalment, la síntesi en dissolució proporciona un producte en cada etapa, el qual cal purificar per diversos mètodes, com ara la cristallització, la destil·lació o les tècniques cromatogràfiques. En contrast amb aquesta aproximació, la química combinatòria ofereix la possibilitat de realitzar múltiples combinacions de reactius, obtenint una gran varietat de productes. Aquesta diferència entre les dues tècniques es pot observar en la Figura 4.13. El rang d'aplicació d'aquesta tècnica és molt divers i es pot treballar tant en fase sòlida com en dissolució.

L'ús més remarcable d'aquesta metodologia rau en la preparació de sèries de compostos a partir d'una estructura base, mitjançant la introducció d'elements de diversitat en determinats punts de la molècula (Figura 4.14).

Mitjançant la química combinatòria es poden crear col·leccions d'un gran nombre de compostos; és per aquest motiu que en els darrers anys s'ha començat a aplicar en molts camps de la química, com ara la síntesi de catalitzadors i nous materials, en el camp de la química inorgànica.

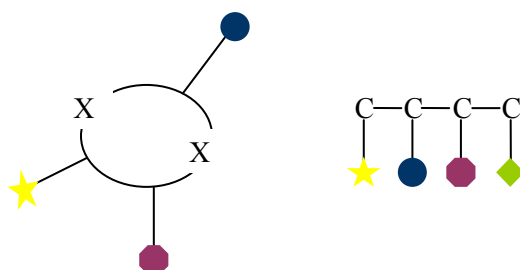


Figura 4.14 Representació de la introducció del grau de diversitat a les molècules

4.2 OBJECTIUS

Prenent com a objectiu general l'aplicació de la química combinatòria i de la química en fase sòlida per a la síntesi d'anàlegs de SLs, i centrant-nos en la manipulació de dos punts de diversitat sobre l'esquelet del 2-amino-1,3-propandiol (Figura 4.15), els objectius d'aquest capítol foren:

1. Disseny i optimització d'una ruta sintètica en fase sòlida per l'obtenció d'anàlegs d'esfingolípids.
2. Construcció d'una petita quimioteca d'anàlegs de ceramida per tal de demostrar la validesa de la metodologia sintètica posada a punt.

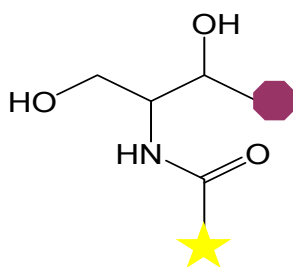


Figura 4.15 Punts de diversitat presents en la molècula de SLs

4.3 SÍNTESI D'ANÀLEGS D'ESFINGOLÍPIDS EN FASE SÒLIDA

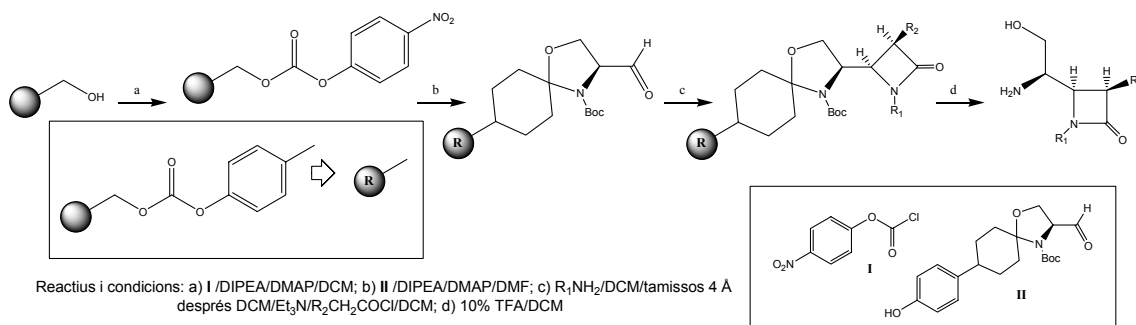


Figura 4.16 Síntesi en fase sòlida emprant un derivat de l'aldehyd de Garner ancorat sobre suport sòlid

L'aldehyd de Garner ha estat el precursor més emprat en la síntesi d'anàlegs de SLs en dissolució. A l'inici d'aquest treball es coneixia l'existència d'un derivat de l'aldehyd de Garner ancorat sobre suport sòlid¹⁹⁹ (Figura 4.16). Malgrat tot, la naturalesa del *linker* utilitzat (un carbonat) no semblava adequada per a la síntesi de SLs, ja que presentava incompatibilitat amb les reaccions d'addició sobre l'aldehyd. Un cop avançant aquest treball, el mateix grup va publicar una nova versió més resistent de l'aldehyd de Garner ancorat sobre suport sòlid²⁰⁰ (Figura 4.17).

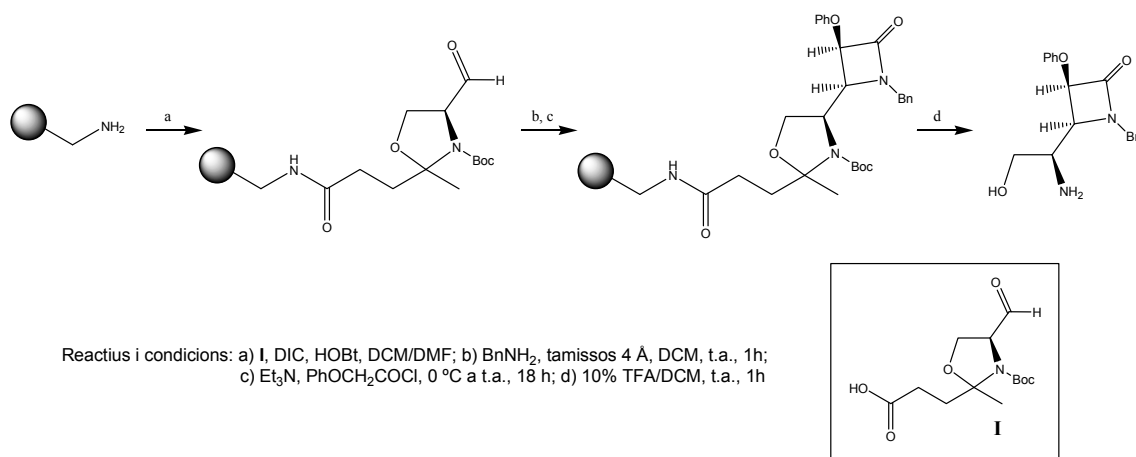


Figura 4.17 Síntesi en fase sòlida emprant un derivat de l'aldehyd de Garner ancorat sobre suport sòlid

En el nostre cas, per a la síntesi dels anàlegs de ceramida proposats (veure 4.3.5), ens varem plantejar l'esquema retrosintètic que es mostra a la Figura 4.18.

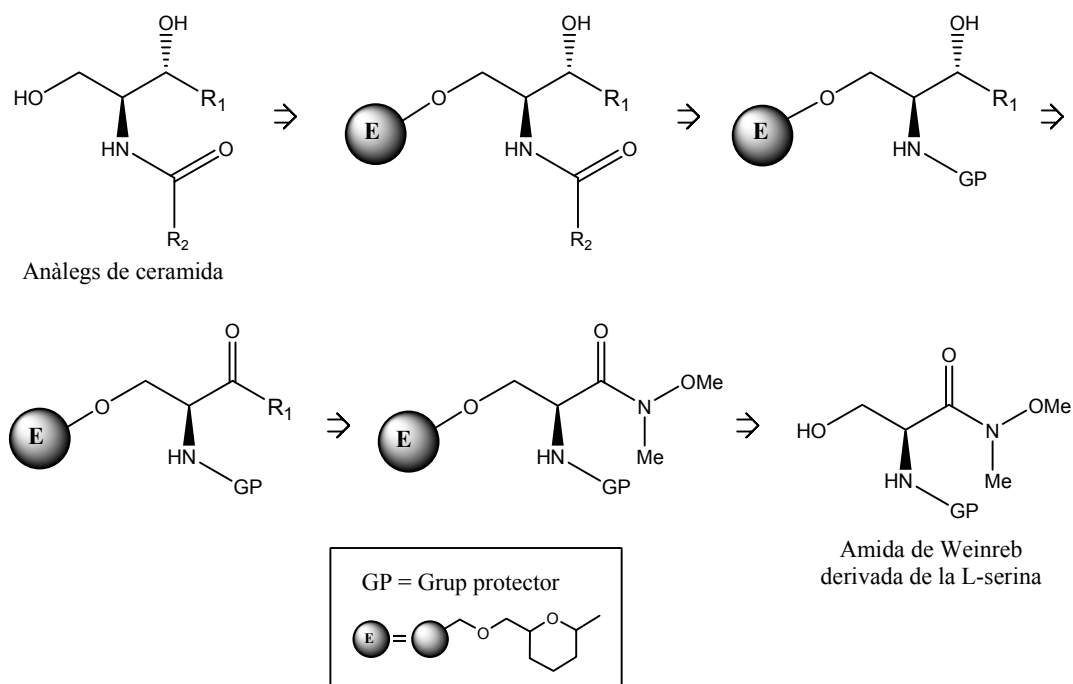


Figura 4.18 Esquema retrosintètic per a la síntesi dels anàlegs **58**, **73–101**

L'addició d'organomagnèsians a les amides de Weinreb (*N*-metoxi-*N*-metil amida) ha estat àmpliament estudiada com un bon mètode de formació d'aminocetones, utilitzant aminoàcids com a reactius de partida i mantenint la configuració de l'amina en posició α respecte al carbonil^{201,202}. Per tant, el primer punt de diversitat s'introdueix per atac nucleòfil d'un reactiu de Grignard sobre una amida de Weinreb (*N*-metoxi-*N*-metil amida), seguit de la reducció estereoselectiva de la cetona intermèdia. El segon punt de diversitat s'introdueix per acilació de l'amina.

Alhora de plantejar aquesta ruta sintètica es buscaren grups protectors ortogonals per l'alcohol primari i l'amina. Com que el suport sòlid s'emprà formalment com a grup protector de l'alcohol primari, només calia cercar un grup protector per a l'amina, ortogonal respecte el desancoratge de l'alcohol del suport sòlid. Abans, però, s'havia d'escollir el suport polimèric adient. Segons la bibliografia²⁰³, un bon suport sòlid per ancorar alcohols primaris, és aquell que conté un *linker* de tetrahidropirà (THP), és a dir, la resina d'Ellman. Un cop escollit el suport sòlid i tenint en compte que el desancoratge es realitza en medi àcid, es buscà un grup protector per a l'amina, el qual hauria de ser làbil en medi bàsic. En aquest sentit, s'escollí el grup Fmoc com a grup protector.

4.3.1 Síntesi de l'amida de Weinreb, **54**

La ruta sintètica de l'amida de Weinreb de la *L*-serina, **54**, es troba representada a la Figura 4.19.

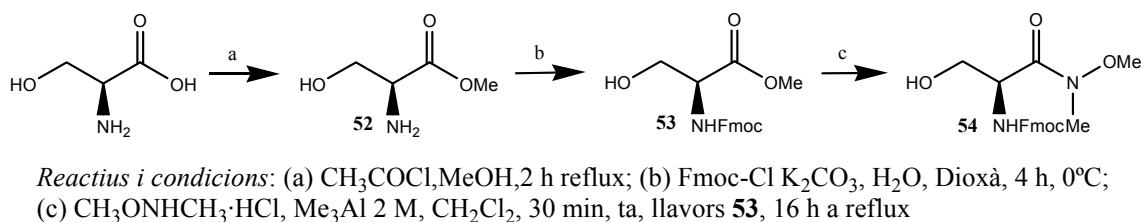


Figura 4.19 Esquema d'obtenció de l'Amida de Weinreb **54** a partir de la *L*-serina

Aquesta síntesi s'inicià amb la formació de l'èster metílic de la *L*-serina, seguint el procediment descrit a la literatura¹¹⁷. A continuació, l'amina secundària fou protegida en forma de carbamat amb el cloroformat de fluorenilmetil²⁰⁴ (FmocCl).

Finalment, per tal de formar l'amida de Weinreb a partir de l'èster metílic s'utilitzà el mètode descrit per Jacobi i col.²⁰⁵, en el qual s'emprà l'hidroclorur de *N,O*-dimetilhidroxilamina i trimetilalumini sota atmosfera inert. La formació de l'amida es féu palesa a l'espectre de RMN de ^1H , on s'observà l'aparició de dos singlets a δ 3.21 i 3.75, els quals corresponen als grups metil i metoxi de l'amida, respectivament.

En un primer moment, la purificació d'aquesta amida fou realitzada per cromatografia en columna de gel de sílice, eluint amb un gradient d'hexà/ AcOEt . Però, segons De Jonghe²⁰⁶, aquests compostos són susceptibles de racemització en contacte amb la sílice. Per tant, es decidí realitzar una purificació per cristal·lització amb MeOH . Per a comprovar si el que descriu De Jonghe també es pot extrapolar a aquesta amida, es va determinar la rotació específica de les amides **54** obtingudes per cadascun dels mètodes, observant que no hi havia variació; per tant, es concloué que l'amida **54** no era susceptible de racemització en les condicions de purificació per cromatografia en gel de sílice.

4.3.2 Preparació de la resina d'Ellman, e

Ja s'ha esmentat anteriorment que un dels millors suports sòlids descrits per ancorar alcohols és la resina de Ellman. Aquesta resina, tal com es mostra a la Figura

4.20, fou preparada per reacció de la sal sòdica del 2-hidroximetil-2,3-dihidro-4*H*-pirà sobre la resina de Merrifield comercial²⁰³.

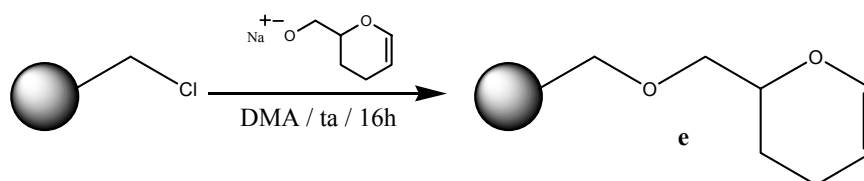


Figura 4.20 Preparació de la resina de Ellman, e

Mitjançant anàlisi elemental de clor, es comprovà que el grau de càrrega de la resina de Merrifield donat pel proveïdor era correcte i que la funcionalització de la resina de Ellman, preparada per nosaltres, havia estat total. Les anàlisis permeteren observar que la reacció havia estat complerta, ja que la resina de Ellman obtinguda no contenia clor.

4.3.3 Ancoratge de l'amida de Weinreb 54 sobre la resina d'Ellman

Un cop preparada la resina de Ellman, la unió de l'amida **54** sobre aquest suport sòlid es realitzà en condicions de catàlisi àcida. Per tal de portar a terme aquest ancoratge es seguí el procediment descrit a la bibliografia²⁰³, utilitzant *p*-toluensulfonat de piridini i dicloroetà a 80 °C (Figura 4.21).

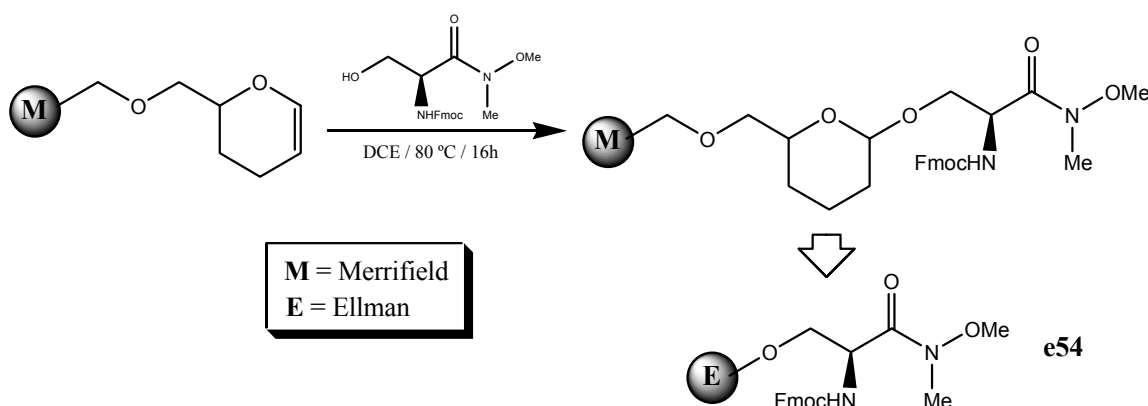
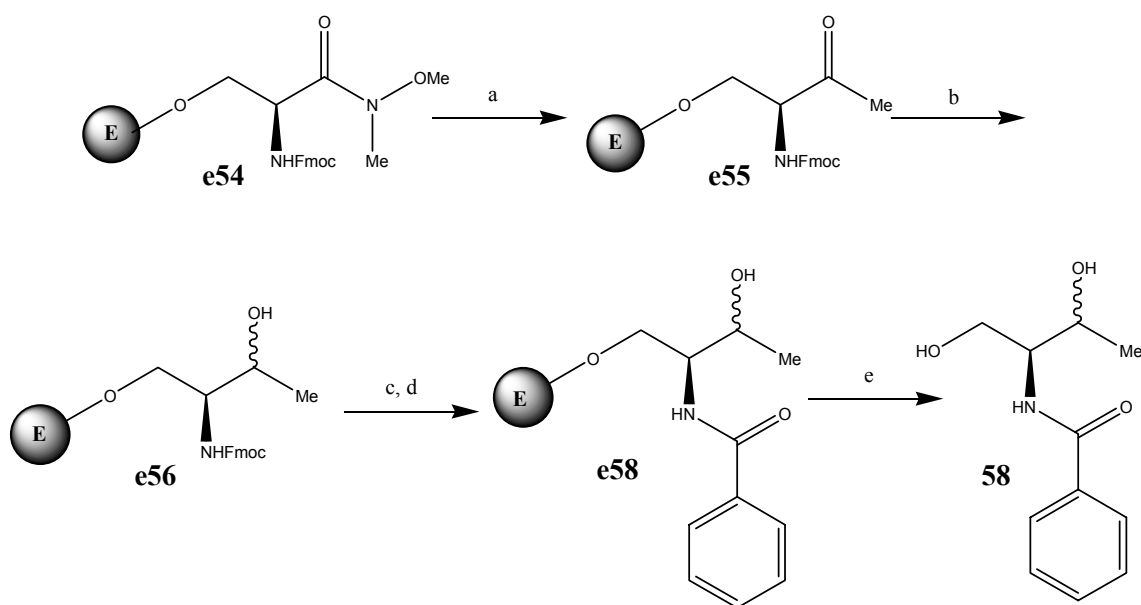


Figura 4.21 Ancoratge de l'amida de Weinreb **54** sobre el suport sòlid

4.3.4 Posta a punt de la síntesi en fase sòlida

Abans de començar a sintetitzar la quimioteca d'anàlegs de ceramida, es realitzà la posta a punt de les condicions de reacció. Per això, es va plantejar la síntesi d'un model que permetés caracteritzar fàcilment els intermedis de reacció, després de desancorar el producte del suport sòlid i que, a més, procedís de reactius fàcilment assequibles. En aquest sentit, d'acord amb el plantejament indicat a la Figura 4.22, s'escollí com a organomagnesià el bromur de metilmagnesi, que hauria de conduir a **e56** (barreja de diastereòmers) després de la reducció del grup carbonil. El desancoratge d'aquest intermedi conduiria a una barreja d'aminoalcohols, la composició diastereomèrica dels quals es podria determinar amb l'ajuda d'un patró preparat a partir del *L*-treoninol comercial (Figura 4.23).



Reactius i condicions: (a) MeMgBr 3M, THF, 16 h, ta; (b) Zn(BH₄)₂, THF, 16 h, ta; (c) Piperidina 20%, DMF-CH₂Cl₂, 1h, ta; (d) Benzoat de *p*-nitrofenil, DMF, 16 h, ta (e) DCM/EtOH/TFA (2:1.2:2 mL)

Figura 4.22 Síntesi del (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroxi-metilpropil)benzamida, **58**

D'altra banda, la elecció del grup benzoil com a model de grup acilant es deu a la bona absorbància d'aquest cromòfor a l'UV, la qual cosa facilitaria la detecció per HPLC del producte final.

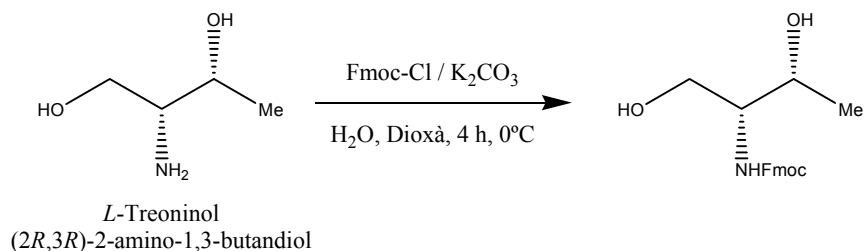


Figura 4.23 Patró sintètic obtingut per protecció de l'amina del *L*-Treoninol

4.3.4.1 Alquilació amb el bromur de metilmagnesi

Tal com s'ha comentat anteriorment, l'alquilació de les amides de Weinreb amb organomagnèsians és un procés molt emprat en la síntesi d'aminocetones per a mantenir la configuració de l'amina en α a la cetona. Aquest fet, fou útil en la present tesi, ja que interessava mantenir la configuració *S* de l'amina, que provenia de la *L*-serina.

L'alquilació de l'amida de Weinreb **e54** es va dur a terme amb el bromur de metilmagnesi²⁰⁷, treballant sota condicions d'atmosfera d'argó i a temperatura ambient (Figura 4.24).

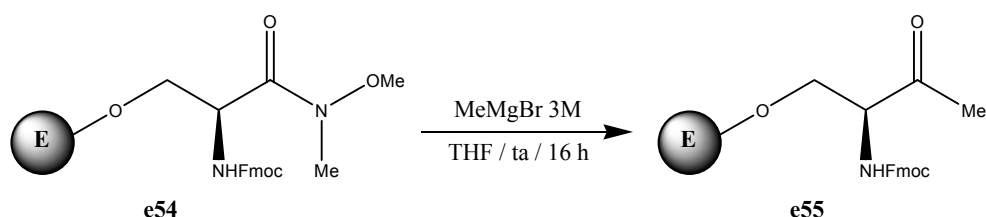


Figura 4.24 Alquilació de l'amida de Weinreb **e54** sobre suport sòlid

La formació de **e55** es féu palesa a l'espectre de RMN de ^{13}C en fase gel, on s'observà l'aparició d'un senyal δ 208.2 ppm, el qual correspon al grup carbonil de la cetona. A més, per tal d'obtenir l'espectre de RMN de ^1H del producte, es realitzà un espectre de RMN en fase sòlida MAS (*magic angle spinning*), per tal de minimitzar els senyals del suport polimèric. En les ressonàncies de l'amida de Weinreb **e54** i de la metilcetona **e55**, realitzades sota aquestes condicions, s'observa que en la primera hi ha dos singlets a δ 3.33 i 3.86 ppm, que corresponen, respectivament, als grups metil i metoxil de l'amida, que desapareixen en l'espectre de la metilcetona (Figura 4.25).

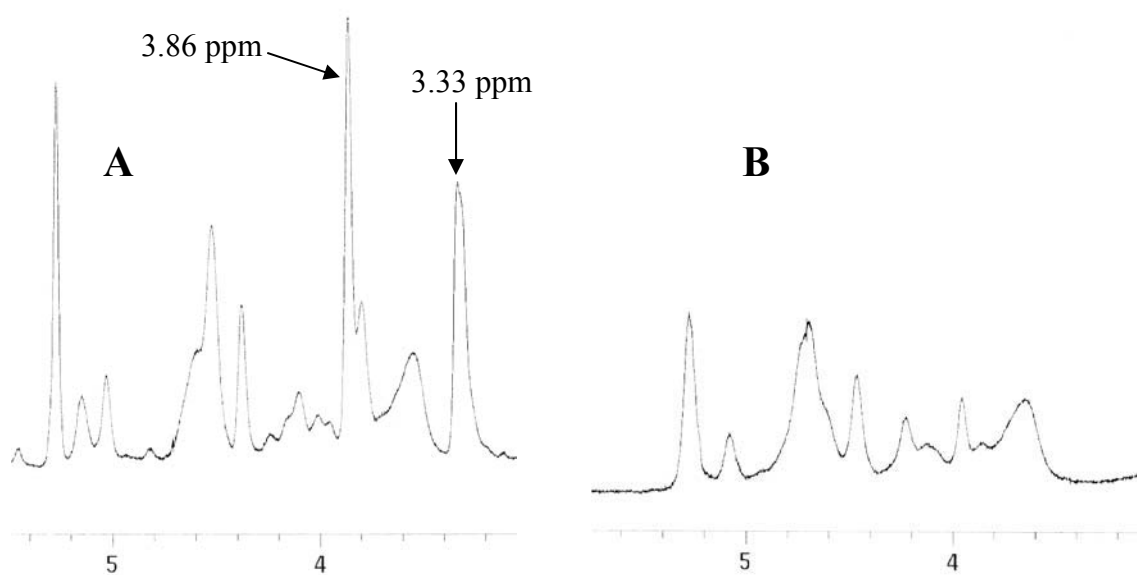


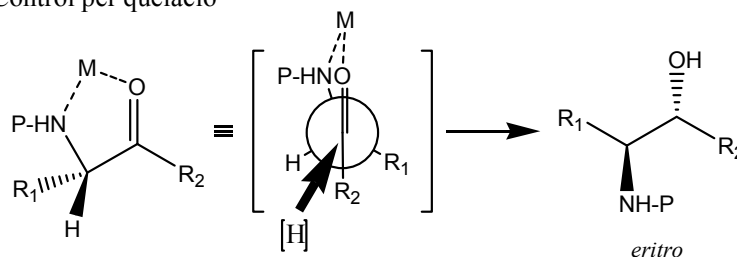
Figura 4.25 Comparació dels espectres de HRMAS de **e54** (A) i **e55** (B)

4.3.4.2 Reducció de la cetona e55

En la síntesi d'aminoalcohols per reducció d'amino cetones *N*-protegides hi ha dues formes d'estereocontrol, per tal d'afavorir la diastereoselectivitat del procés de reducció¹⁷⁵:

- *Control per quelació*, en el qual un àcid de Lewis o un ió metàl·lic coordinen l'àtom d'oxigen del carbonil i l'àtom de nitrogen de l'amina, forçant una relació sin-periplanar entre l'amina i la cetona, fornint l'isòmer *eritro* (Figura 4.26a).
- *Control per Felkin-Anh*, en el qual es forma un angle dihedre de 90° aproximadament entre l'amina i la cetona, fornint l'isòmer *treo* per atac sobre la cara menys impedida del grup carbonil (Figura 4.26b).

a. Control per quelació



b. Control per Felkin-Anh

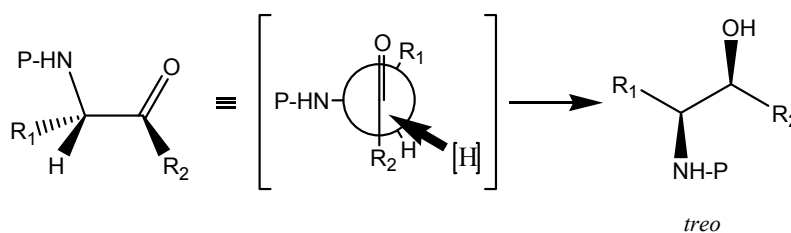


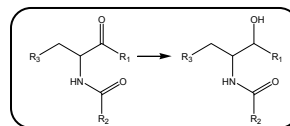
Figura 4.26 Estereocontrol de la diastereoselectivitat del procés

Els grups protectors d'amines més emprats en aquests processos han estat els grups carbamat. Hoffman¹⁷⁵ descriu que l'estereocontrol en la reducció d'amino cetones protegides amb aquests grups es veu afavorida pel control per quelació, ja que l'oxigen de la cetona i el nitrogen del carbamat es troben estèricament accessibles per coordinar amb l'àcid de Lewis o amb un ió metàl·lic. Així, el control per quelació en la reducció d'aquestes amino cetones, protegides amb un grup carbamat, permet la síntesi estereoselectiva d'amino alcohols *eritro*.

Per a trobar els agents reductors amb millor diastereoselectivitat, així com les seves condicions de reacció, es realitzà una cerca bibliogràfica, tal i com s'indica a la Taula 4.1. A continuació es va fer una selecció d'agents reductors tenint en compte que les condicions de reacció requerides fossin compatibles amb la nostra resina. Amb aquestes consideracions es varen triar els següents:

- $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$
- L-selectride
- $\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$
- DIBAH.

Taula 4.1 Agents reductors més emprats



Grup protector	Reductor	Dissolvent	Additiu	t / °C	eritro/treo	Referència
NH-Cbz	NaBH ₄	EtOH	CeCl ₃	0 a t.a.	8 : 3	a
NH-Tr			-	-	1 : 9	
NH-Bn ₂	NaBH ₄	MeOH	-	-	1 : 9	b
NH-Tr			-	-	1 : 9	
NH-Boc			-	-	9 : 1	
NH-Boc	NaBH ₄	MeOH		-15	3 : 7	c
NH-Boc	L-Selectride	-	-	-	3 : 7	d
	NaBH ₄	-	Ce (III)	-	10 : 1	
	DIBAH	-	-	-	1 : 1	
NH-PMB OH	NaBH ₄	EtOH	-	-	0.9 : 1	e
	DIBAH	THF	-	-	2.6 : 1	
	DIBAH	THF	ZnCl ₂	-	8 : 1	
	L-Selectride	THF	-	-	4.3 : 1	
	Zn(BH ₄) ₂	THF	-	-	49 : 1	
	Me ₃ NBH(OAc) ₃	CH ₃ CN-AcOH	-	-	1 : 7	
NH-PMB OTBS	NaBH ₄	EtOH	-	-	3.8 : 1	e
	DIBAH	THF	-	-	49 : 1	
	DIBAH	THF	ZnCl ₂	-	49 : 1	
	L-Selectride	THF	-	-	4.2 : 1	
	Zn(BH ₄) ₂	THF	-	-	49 : 1	
	Me ₃ NBH(OAc) ₃	CH ₃ CN-AcOH	-	-	8.5 : 1	
NH-Boc-PMB OH	NaBH ₄	MeOH	-	-	1 : 19	
NH-Tr	NaBH ₄	MeOH	CeCl ₃	0	1 : 9	f
NH ₂	Zn(BH ₄) ₂	THF	-	-78	9 : 1	
NH-Boc OTBDMS	DIBAH	Toluè	-	-78	8.6 : 1	g
	DIBAH	CH ₂ Cl ₂	-	-78	4.9 : 1	
	Zn(BH ₄) ₂	THF	-	0	2 : 1	
	NaBH ₄	MeOH	CeCl ₃	t.a.	2.5 : 1	
	L-Selectride	THF	-	-78	0.8 : 1	
NH-Boc	DIBAH	THF	-	0	26 : 1	h
	NaBH ₄	MeOH	-	0 a t.a.	1 : 3.2	
	LiBH ₄	MeOH	-	0 a t.a.	1 : 2.9	
	Red-Al	toluè	-	0	1 : 2.3	
NH-Cbz	NaBH ₄	EtOH	-	-78	7 : 1	i
	LiBH ₄	EtOH	-	-78	7 : 1	
	KBH ₄	EtOH	-	-78	7 : 1	
	Me ₂ N ⁺ BH ₄ ⁻	EtOH	-	-78	7 : 1	
	NaBH ₄	EtOH	-	-78	7 : 1	
	Zn(BH ₄) ₂	THF	-	-78 a 0	2 : 1	
	Zn(BH ₄) ₂	eter	-	-78 a 0	1 : 2	
	L-Selectride	THF	-	-78	1 : 9	
	N-Selectride	THF	-	-78	1 : 9	
	LiAl(O ⁻ Bu) ₃ H	THF	-	-78 a -20	1 : 1	
LiAl(O ⁻ Bu) ₃ H	EtOH	-	-78	19 : 1		
NH-Tr	NaBH ₄	EtOH	-	-	1.5 : 1	
	L-Selectride	EtOH	-	-	1.6 : 1	
	LiAl(O ⁻ Bu) ₃ H	THF	-	-5	18 : 1	
NH-Boc	NaBH ₄	THF/MeOH	-	-60	6 : 4	j
	NaBH ₄	EtOH	CeCl ₃	-60	7 : 3	
	Red-Al	THF	-	-78	7 : 3	
	LABOH	THF	-	-78	5 : 5	
	DIBAH	THF	-	-78	8 : 2	
	L-Selectride	THF	-	-78	19 : 1	
	L-Selectride	THF	ZnBr ₂	-78	8 : 2	

Referències: (a)²⁰⁶; (b)²⁰⁸; (c)¹⁵²; (d)¹³⁹; (e)¹⁴⁴; (f)¹⁷⁴; (g)¹⁷³; (h)²⁰⁹; (i)¹⁷⁵; (j)²¹⁰

4.3.4.2.1 Resultats de la reducció de la cetona **e55**

La reducció de la cetona **e55** es va dur a terme utilitzant cada un dels quatre reductors indicats abans (Figura 4.27).

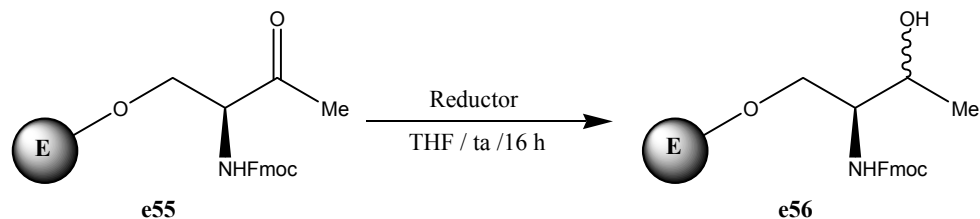


Figura 4.27 Reducció de l'amino cetona **e55** sobre suport sòlid

Taula 4.2 Reduccions de la cetona **e55**

Assaig nº	Reductor	Condicions de reacció	<i>eritro</i> / <i>treo</i>
1	Zn(BH ₄) ₂	t.a	7 : 3
2	Zn(BH ₄) ₂	t.a. / ZnCl ₂	7 : 3
3	Zn(BH ₄) ₂	-78°C	7 : 3
4	L-Selectride	-	-
5	LiAl(O- ^t Bu) ₃ H	t.a.	1 : 1
6	DIBAH	t.a	9 : 1

Un cop finalitzada la reacció amb el primer agent reductor, Zn(BH₄)₂, l'alcohol **e56** obtingut es desancorà del suport sòlid, i fou analitzat per HPLC, emprant la columna LiChroCART[®] RP-18 (Merck) de 5µm i 3,9 x 150 mm. Els cromatogrames presentaven dos pics (*t_R* = 42.27 min i *t_R* = 45.10 min (Figura 4.28)), que s'identificaren com els isòmers *eritro* i *treo* **56**, mostrant una relació *eritro*/*treo* de 7:3 (Taula 4.2, entrada 1). L'assignació d'aquests isòmers es realitzà per HPLC, mitjançant la identificació de l'isòmer *treo* per coinjecció de la mescla de reacció amb *L*-Fmoc treoninol, preparat a partir del *L*-treoninol comercial (Figura 4.23).

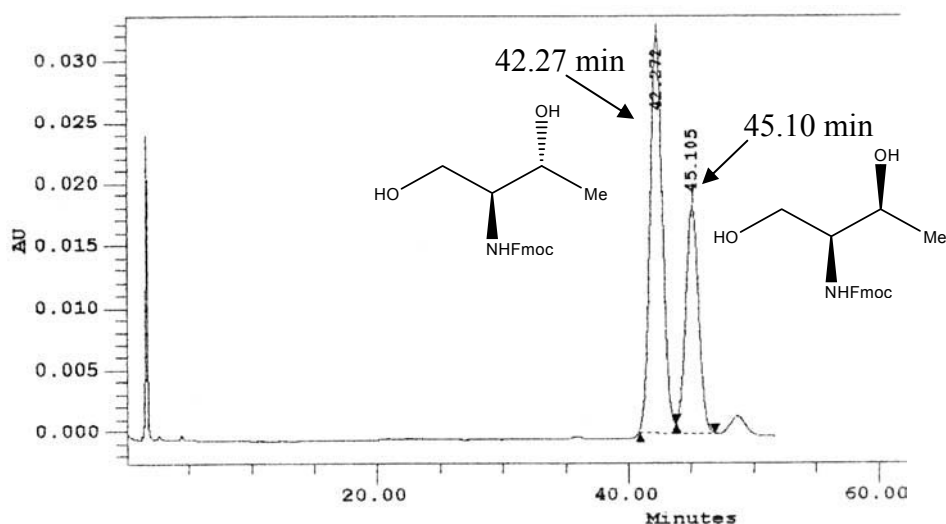


Figura 4.28 Cromatograma de HPLC corresponent a la mescla d'isòmers de la reducció amb $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$

Per tal de millorar la diastereoselectivitat del procés, en la reducció de la cetona **e55** s'intentà afavorir la quelació per addició d'un àcid de Lewis com el ZnCl_2 , però no es va observar cap millora en la formació majoritària de l'isòmer *eritro* en vers del *treo* (Taula 4.2, entrada 2).

En vista d'aquests resultats i de la importància que sembla tenir el control de la temperatura sobre la diastereoselectivitat, per tal d'afavorir la formació de l'isòmer *eritro*, es repetí la reducció de la cetona **e55** mantenint la temperatura a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Malhauradament, no s'observà cap millora en la diastereoselectivitat d'aquest procés (Taula 4.2, entrada 3).

Les reaccions amb la resta d'agents reductors van proporcionar els alcohols **e56**, que es desancoraren del suport sòlid i foren analitzats per HPLC. En els corresponents cromatogrames (Figura 4.29), es va observar que, de la reducció realitzada amb *L*-Selectride, no eluïa cap pic a la zona esperada; en canvi, les mostres procedents de les altres dues reduccions presentaren dos pics ($t_R = 41\text{ min}$ i $t_R = 43\text{ min}$) corresponents a cada isòmer. Les relacions de diastereomers *eritro:treo* foren de 1:1 i de 9:1 emprant $\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$ i DIBAH, respectivament (Taula 4.2, entrades 5 i 6).

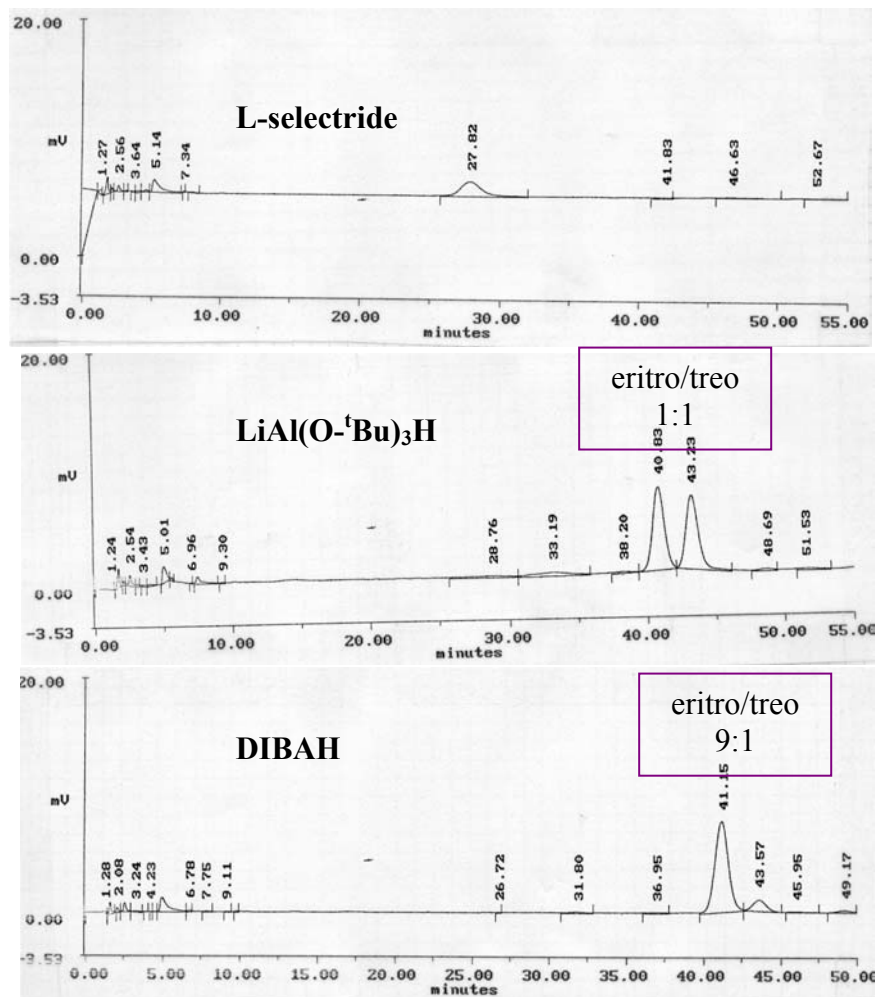


Figura 4.29 Cromatogrames de HPLC corresponents a les reduccions de la cetona **e55** emprant diferents reductors

A partir d'aquest resultat, es decidí que les reaccions de reducció de la quimioteica es realitzarien emprant com agent reductor el DIBAH. A més, per a continuar la síntesi s'utilitzaria la mescla de diastereòmers.

4.3.4.3 Desprotecció de l'amina

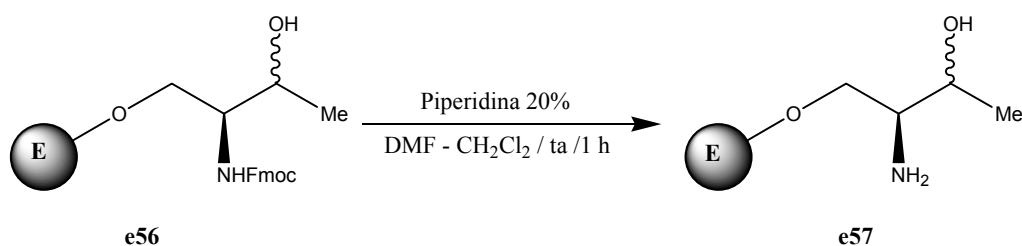


Figura 4.30 Desprotecció de l'amina sobre suport sòlid

Un cop optimitzada la reducció de l'alcohol, la desprotecció del grup Fmoc de l'aminoalcohol **e56** es va dur a terme emprant un 20% de piperidina en DMF i/o CH_2Cl_2 ²¹¹ (Figura 4.30). Els millors resultats en la desprotecció de l'amina s'obteniren en realitzar dos cicles emprant un dissolvent diferent en cada cicle (Taula 4.3).

Taula 4.3 Condicions de desprotecció del Fmoc

Condicions de reacció	Rendiment (%)
DMF, 1 cicle (1h)	65
CH_2Cl_2 , 1 cicle (1h)	72
DMF, 1 cicle (1h) i CH_2Cl_2 , 1 cicle (1h)	88

En vista d'aquest resultat, es decidí realitzar la desprotecció en dues fases, en la primera es realitzaren dos cicles emprant DMF com a dissolvent i, en la segona, dos cicles més utilitzant CH_2Cl_2 .

4.3.4.4 Acilació de l'amina e57

Després de la desprotecció de l'amina, només calia acilar-la per tal d'arribar al compost **e58**. Existeix a la bibliografia una gran quantitat d'informació sobre la formació d'enllaços amida, degut a la necessitat, derivada de la química de pèptids, de trobar reactius d'acoblament cada cop més suaus i específics. Malgrat això, no tota aquesta informació és útil en el nostre cas, ja que la presència d'un alcohol lliure, susceptible també d'acilació, no es contempla en molts d'aquests casos, si bé, moltes publicacions recents ho tenen en compte^{186,212,213}.

Per tant, el pas clau, en la síntesi d'aquests compostos, és la formació quimioselectiva d'amides controlant la *O*-acilació del grup hidroxil present en la molècula.

4.3.4.4.1 Acilació de l'amina amb un èster activat

Al 1999, es descobrí que l'utilització d'èsters de nitrofenol ancorats sobre suport sòlid conduïa a *N*-acilacions d'amino alcohols sense traces de *O*-acilació; degut a que la velocitat de reacció amb èsters activats de l'amina en front de l'alcohol és superior a 10^{5185} .

En aquest sentit, s'emprà una variant de la síntesi descrita per Chang i col.¹⁸⁵, utilitzant el benzoat de *p*-nitrofenil com agent acilant, en l'acilació de l'amina **e57** ancorada sobre suport sòlid. El benzoat de *p*-nitrofenil, **59**, es va obtenir amb molt bon rendiment per reacció del clorur de benzoil amb *p*-nitrofenol, mitjançant catalisi bàsica, tal com es mostra a la Figura 4.31, seguint un procés descrit per Colthurst²¹⁴.

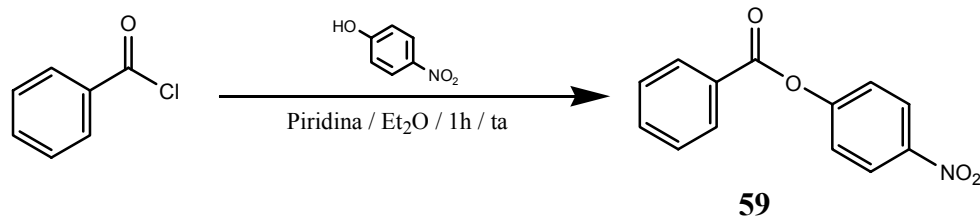


Figura 4.31 Síntesi del benzoat del *p*-nitrofenil, **59**

La formació d'aquest èster es féu palesa a l'espectre de RMN de ¹³C, on s'observa l'aparició de dos nous senyals a δ 155.7 i 145.1, els quals corresponen als àtoms de carboni **a** i **b**, respectivament, tal com es mostra a la Figura 4.32.

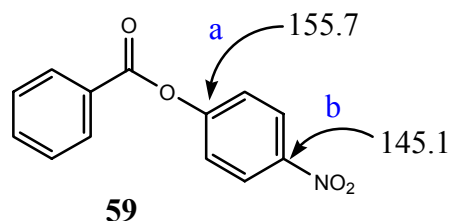


Figura 4.32 Estructura del benzoat de *p*-nitrofenil, **59**

La reacció d'acilació es va portar a terme addicionant la solució de l'èster activat en DMF sobre l'amino alcohol **e57**. Mitjançant el test de Kaiser, s'observà que la reacció no va tenir lloc fins que s'addicionà piridina en el medi de reacció.

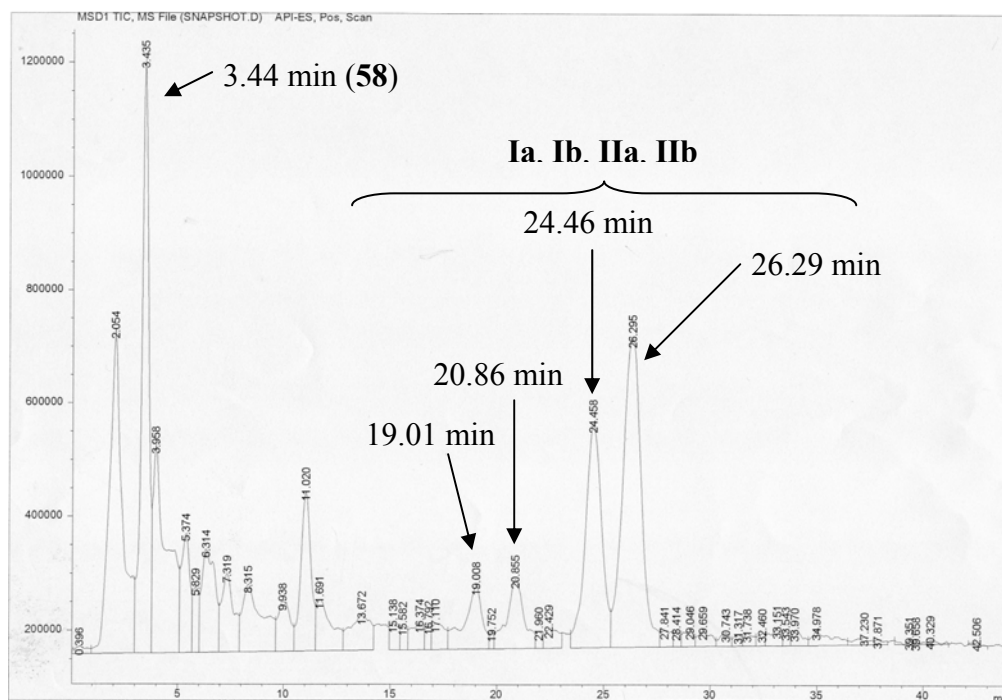


Figura 4.33 Cromatograma de HPLC corresponent a l'anàlisi del producte obtingut de la reacció d'acilació

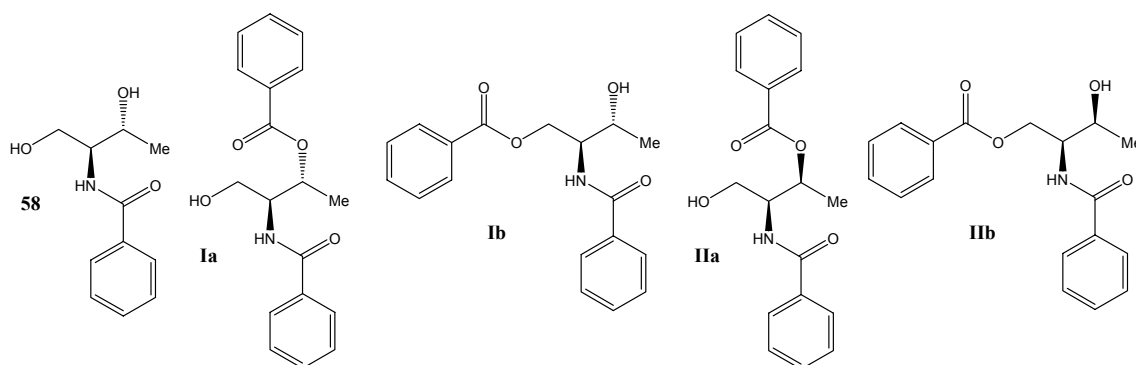


Figura 4.34 Compostos resultants de l'acilació i desancoratge de **e58** amb el benzoat de p-nitrofenil, **59**.

El compost acilat es va desancorar de la resina amb el sistema format per TFA/CH₂Cl₂/EtOH, d'acord amb les condicions de Wallace.²⁰⁷ En l'anàlisi per HPLC acoblat a EM (Figura 4.33) s'observaren cinc pics: el primer a 3.44 min, que

s'identificà, gràcies a l'espectre de masses, com la (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)benzamida **58** desitjada. En canvi, els altres quatre pics, eluïts a 19.01, 20.86, 24.46 i 26.29 min, presentaven espectres de masses similars que indicaven la presència de dos grups acil. Una possible explicació estaria d'acord amb la formació dels corresponents derivats N,O-diacilats indicats a la Figura 4.34. La formació de **Ib** i de **IIb** pot interpretar-se com a resultat d'una migració d'acil a partir dels derivats diacilats **Ia** y **IIa**, respectivament, durant el procés de desancoratge de la resina.

4.3.4.4.2 Acilació de l'amina e57 sota condicions de Schotten-Baumann

Per a evitar la reacció secundària en la formació d'amides a partir de clorurs d'àcid i amines, Schotten²¹⁵ i Baumann²¹⁶, a finals del segle XIX, publicaren un mètode, el qual implicava treballar amb un sistema bifàsic (CH₂Cl₂-NaOH/H₂O), on l'amina i el clorur d'àcid es trobaven a la fase orgànica, mentre que el HCl generat durant la reacció es dissol i es neutralitza a la dissolució aquosa de la base.

Aquesta reacció ha estat emprada en reaccions de formació d'amides a partir d'amino alcohols evitant la O-acilació. En aquest sentit, es va creure convenient aplicar el mètode de Schotten-Baumann per l'acilació de l'amina e57.

La reacció de Schotten-Baumann es va dur a terme utilitzant el clorur de benzoil com agent acilant i una dissolució aquosa d'acetat de sodi al 50% com a medi bàsic²¹⁷. La reacció es va controlar mitjançant el test colorimètric de Kaiser fins el consum total de l'amina lliure en el medi de reacció.

Un cop desancorat el compost resultant del suport sòlid, s'analitzà per HPLC i s'observà que en cap cas s'havia produït O-acilació i només s'obtingué l'amida **58** (t_R = 3.2 min).

Aquests resultats indiquen que les condicions Schotten-Baumann no solament son un mètode adequat per l'acilació d'amines en fase sòlida sinó que permeten evitar la formació dels productes de O- i N- dialquilació observats al emprar un agent acilant de tipus èster de p-nitrobenzoat.

4.3.5 Disseny de la quimioteca d'anàlegs de ceramida

Un dels objectius d'aquest capítol era construir una quimioteca d'anàlegs d'esfingolípids fent ús de la química combinatòria, tenint en compte els dos possibles punts d'introducció de diversitat presents a la molècula. Anteriorment, s'ha vist que els reactius necessaris per a introduir la diversitat a la molècula són els organomagnesianos i els halurs d'acil. Hi ha una gran quantitat d'aquests reactius en el mercat, fet que dificulta la selecció dels més representatius.

En el disseny de quimiotèques, la química combinatoria juga un paper estratègic, conduït per la creixent demanda pel disseny eficient i per la selecció racional de nous mètodes. Aquest es du a terme incrementant la diversitat (en el disseny de biblioteques universals) o la similitud (en llibreries focalitzades), confiant en la següent hipòtesi: "compostos pròxims en l'espai del descriptor mostraran unes propietats biològiques similars"²¹⁸.

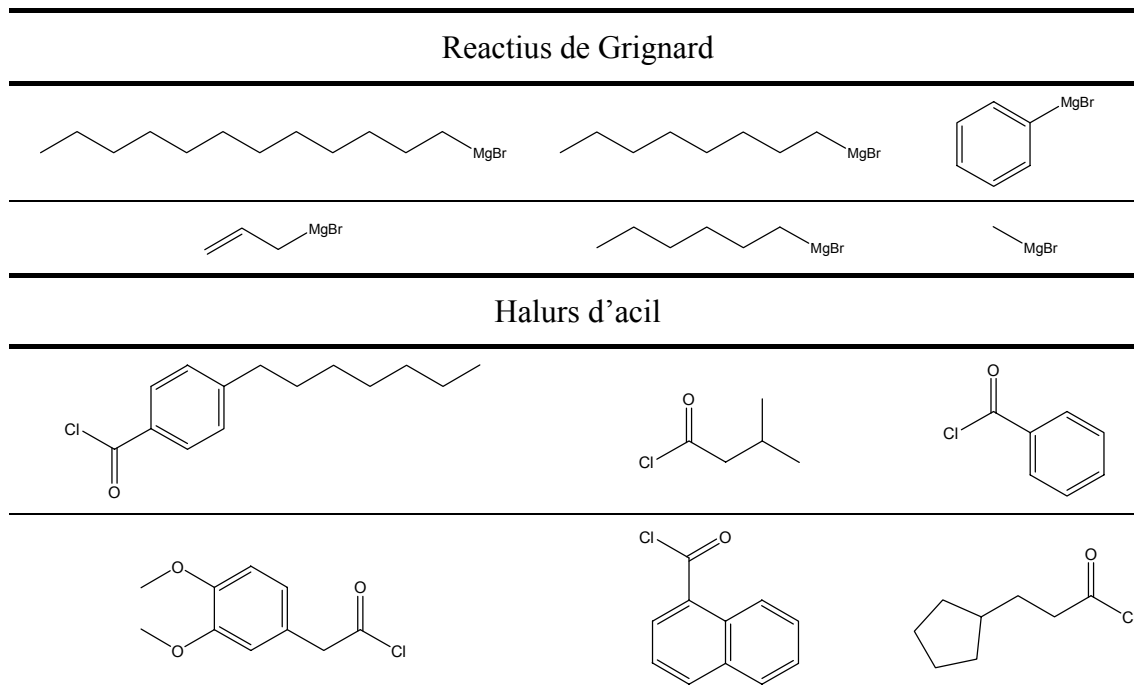
Un altre punt important en el disseny de biblioteques és la selecció del reactiu basada en les propietats del producte final, ja que comporta avantatges experimentals i econòmiques. Així, aquesta selecció és anomenada sub-biblioteca, sèrie o sèrie total, si aquests productes seleccionats representen totes les combinacions possibles dels reactius comercials, conduït a unes propietats del producte preseleccionades.

En aquest sentit, per tal de construir la quimioteca d'anàlegs de ceramida, es sol·licità l'ajuda del Grup d'Enginyeria Molecular de l'Institut Químic de Sarrià (IQS) de Barcelona, dirigit pel Dr. Jordi Teixidó. Aquest grup, té una àmplia experiència en aquest camp, ja que han construït el programa Pralins (**P**rogram for **R**ational **A**nalysis of **L**ibraries *in Silico*)²¹⁹, que ha estat aplicat a moltes de les principals estratègies de selecció amb variacions particulars específiques per a cada cas.

D'aquesta manera, a partir d'una biblioteca de 286 compostos, formada per 13 reactius de Grignard i 22 halurs d'acil, es va dissenyar una sub-biblioteca de 6 x 6, és a dir, de 36 compostos. Per a dissenyar aquesta biblioteca de 36 compostos, a partir de la de 286, es realitzà una minimització amb el ForceField MMF98, utilitzant un gradient de 0.1 i calculant una sèrie de descriptors, tant estructurals com fisico-químics. Un cop minimitzada, amb el programa Pralins, es realitzà un anàlisi de components principals, de tal manera que quedés representada el 90% de la variança, el que s'aconsegueix amb 7 components. Finalment, es realitzà un clustering jeràrquic complet, amb selecció d'una sub-biblioteca i optimització per recobriment de població, aconseguint un recobriment del 95.1% de població i del 83.3% de nombre de clusters.

Els reactius seleccionats mitjançant aquest procés, són els que es mostren a la Taula 4.4.

Taula 4.4 Reactius seleccionats per a construir la sub-biblioteca



Un cop seleccionats els reactius, només cal preparar els agents acilants per a la reacció d'acilació, ja que aquesta reacció es realitza amb èsters activats.

4.3.5.1 Formació de les cetones e55, e60 - e64

L'alquilació de l'amida de Weinreb **e54** amb els diferents organomagnèsians per proporcionar les corresponents cetones **e55**, **e60** - **e64** es va dur a terme de la mateixa manera que es descriu a l'apartat 4.3.4.1 pel bromur de metilmagnesi. El procés es mostra a la Figura 4.35.

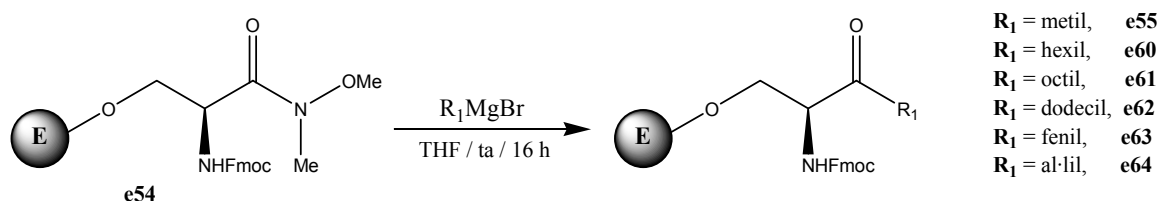


Figura 4.35 Síntesi de les diferents resines amb la funcionalitat cetona

Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtrà i es rentà successivament amb CH_2Cl_2 , DMF/ H_2O (1:1), DMF, THF i CH_2Cl_2 , de manera que s'obtingueren les resines amb la funcionalitat cetona **e55**, **e60** – **e64**. Aquestes foren analitzades per RMN de ^1H , després del desancoratge dels substrats del suport sòlid seguint el procediment descrit anteriorment. Amb l'anàlisi s'observà que totes les reaccions havien funcionat correctament, excepte la realitzada amb el bromur d'al·lil magnesi, **e64**, ja que l'espectre de RMN de ^1H no mostrava els senyals característics de doble enllaç a la zona de 5-6 ppm. Per tant, aquest magnesià fou descartat de la quimioteca.

4.3.5.2 Reducció de les cetones **e55**, **e60** - **e63**

La reducció de les cetones **e55**, **e60** - **e63** es va portar a terme inicialment utilitzant DIBAH com agent reductor, segons les condicions prèviament optimitzades per la reducció de la metilcetona model **e55**, tal i com es descriu a l'apartat 4.3.4.2.

Un cop filtrades i rentades les resines, una al·lota d'aquestes fou tractada amb TFA/ CH_2Cl_2 /MeOH per desancorar els corresponents alcohols, els quals foren analitzats per RMN de ^1H . En tots els casos, es van obtenir espectres molt complexos que no van permetre la confirmació de les estructures esperades. D'altra banda, la desaparició a l'espectre d'IR del senyal del grup carbonil de la cetona de partida no es va poder corroborar de forma inequívoca per la seva superposició parcial amb el grup carbonil de la funció carbamat. Semblava, doncs, que la reducció amb DIBAH no havia funcionat tal i com s'esperava. Per tal de confirmar aquest fet, es va tractar una de les resines, en concret l'octilcetona **e61**, amb $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$, segons les condicions utilitzades per aquest reductor amb la resina model **e55**. En aquest cas, l'anàlisi per RMN de ^1H del cru de reacció concordava amb el producte esperat, el que fa pensar que la reducció amb DIBAH, malgrat els resultats obtinguts amb la resina model **e55** (veure apartat 4.3.4.2.1), havia donat lloc a nombrosos productes de degradació.

En vista d'aquests resultats, es cregué convenient l'ús del $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$, malgrat la més baixa diastereoselectivitat. Per tant, es va tornar a repetir la reducció de totes les cetones **e55**, **e60** - **e63**, però emprant $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ com agent reductor, per obtenir les resines amb la funcionalitat alcohol **e56**, **e65** - **e68**. Aquesta reducció es realitzà emprant les condicions descrites a l'apartat 4.3.4.2.1, que havien conduït a una relació *eritro:treo* d'aproximadament 7:3. El procés es mostra a la Figura 4.36.

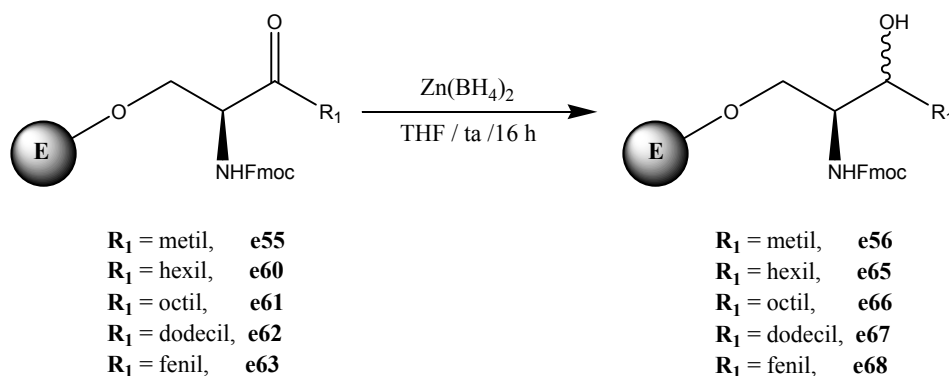


Figura 4.36 Síntesi de les diferents resines amb la funcionalitat alcohol

Un cop filtrades i rentades les resines, es desancoraren els alcohols **56**, **65** - **68** emprant TFA/CH₂Cl₂/EtOH, i s'analitzaren per RMN de ¹H. La formació dels alcohols es féu palesa a l'espectre de RMN de ¹H, on s'observà la desaparició del senyal corresponent al CH₂ en α al carbonil i la presència dels diferents grups alquils i fenil introduïts a la molècula. No se'n poden diferenciar els diastereòmers, ja que les senyals corresponents a la base esfingoide són molt complexes.

En les següents reaccions s'utilitzà la mescla de diastereòmers.

4.3.5.3 Desprotecció dels grups carbamats de e56, e65 - e68

La desprotecció dels grups carbamats **e56**, **e65** - **e68** utilitzant piperidina al 20%, es va dur a terme en dues fases. En la primera es realitzaren dos cicles emprant DMF com a dissolvent i, en la segona, dos cicles més utilitzant CH₂Cl₂, tal com es descriu a l'apartat 4.3.4.3 (Figura 4.37).

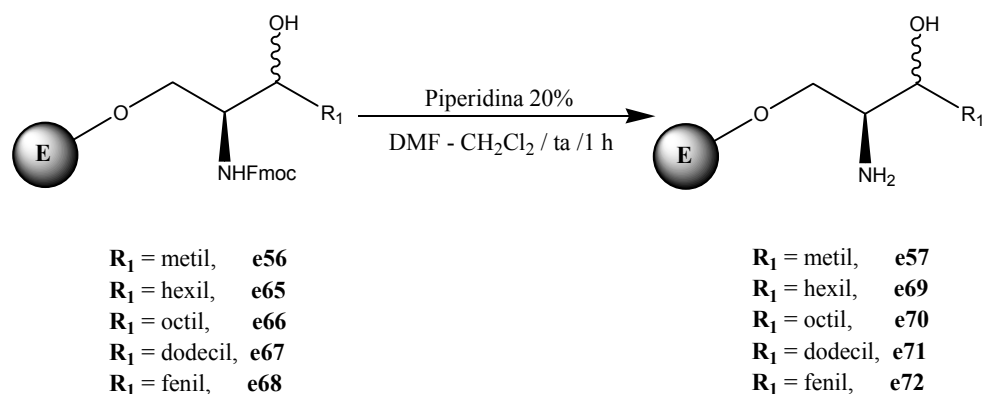


Figura 4.37 Síntesi de les diferents resines amb la funcionalitat aminoalcohol

Aquestes resines aminoalcohol **e57**, **e69** - **e72**, un cop rentades, foren emprades directament, sense cap tractament més, en la següent reacció.

4.3.5.4 Acilació i desancoratge de les amines **e57**, **e69** – **e72**

Un cop desprotegides les amines, només quedava acilar-les per tal d'introduir el segon punt de diversitat, emprant els diferents clorurs d'àcid seleccionats en el disseny de la biblioteca.

En un assaig preliminar, es va fer una prova de les condicions de reacció emprant la resina de tipus octilaminoalcohol, **e70**, i el clorur de 3-ciclopentilpropionil com agent acilant (Figura 4.38). Aquesta reacció es realitzà utilitzant les condicions de Schotten-Baumann descrites a l'apartat 4.3.4.4.2.

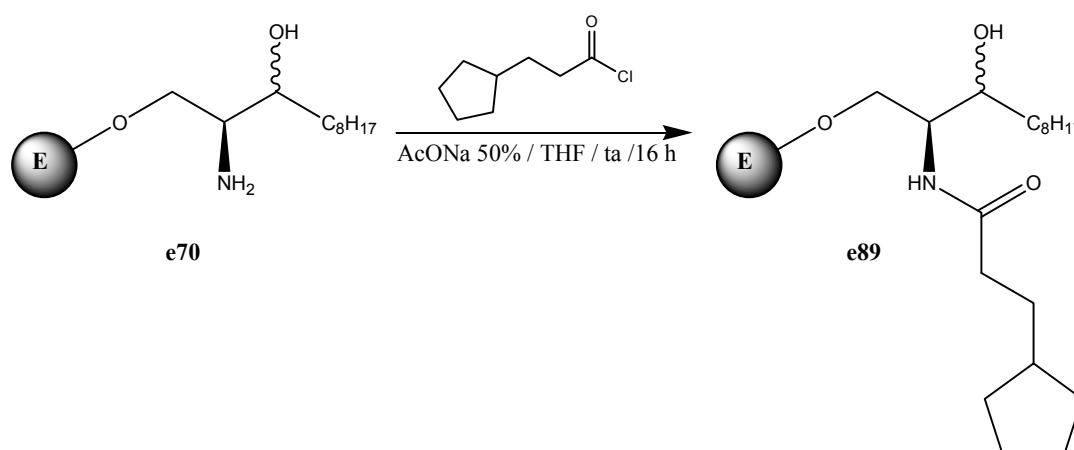


Figura 4.38 Síntesi de l'anàleg **e89**

En obtenir un test de Kaiser negatiu es donà per finalitzada la reacció i es desancorà el compost del suport polimèric, emprant el sistema TFA/CH₂Cl₂/EtOH, d'acord amb les condicions descrites per Wallace²⁰⁷.

El producte resultant s'analitzà per RMN de ¹H i HPLC-EM, observant en ambdós casos el producte desitjat. En vista d'aquest resultat, la resta d'acilacions es realitzaren emprant els corresponents clorurs d'àcid, treballant sota condicions de Schotten-Baumann (Figura 4.39), finalitzant les reaccions quan el test de Kaiser era negatiu.

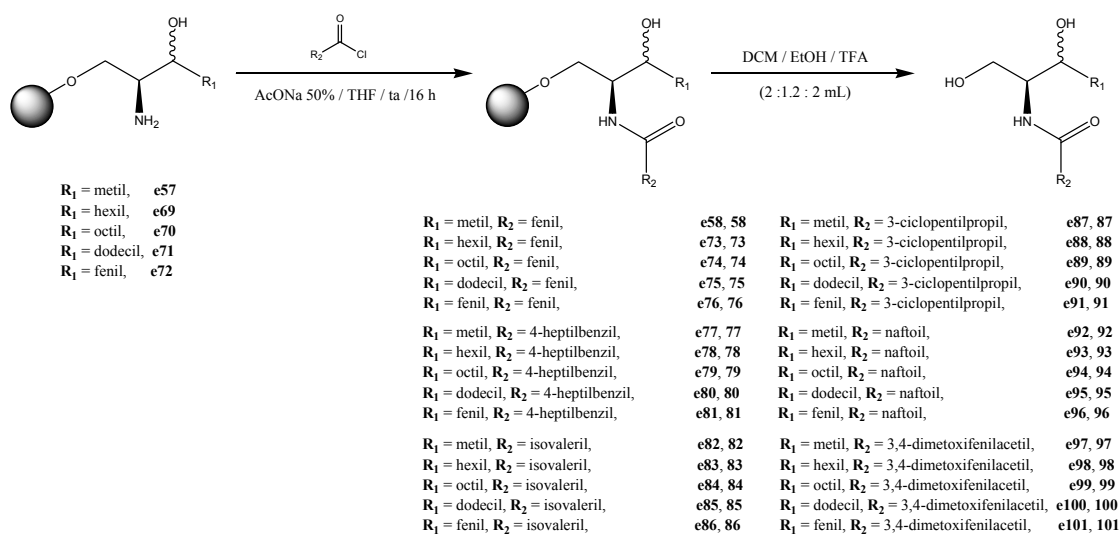


Figura 4.39 Síntesi de les diferents resines d'anàlegs de ceramida. La numeració **e58, e73 - e101** correspon al producte ancorat, en canvi, la **58, 73 - 101** ens indica el producte desancorat

Un cop desancorats els compostos del suport polimèric, els anàlegs de ceramida **58, 73 - 101** obtinguts foren analitzats per RMN de ^1H , identificant els productes esperats. Tots ells van mostrar senyals característics concordants amb les estructures esperades. Per tal de determinar el grau de puresa i la relació diastereomèrica *eritro/treo*, els acetamido alcohols resultants foren derivatitzats amb la *N,O-bis*(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BTMSTFA)²²⁰ (Figura 4.40) i s'analitzaren per CG-EM.

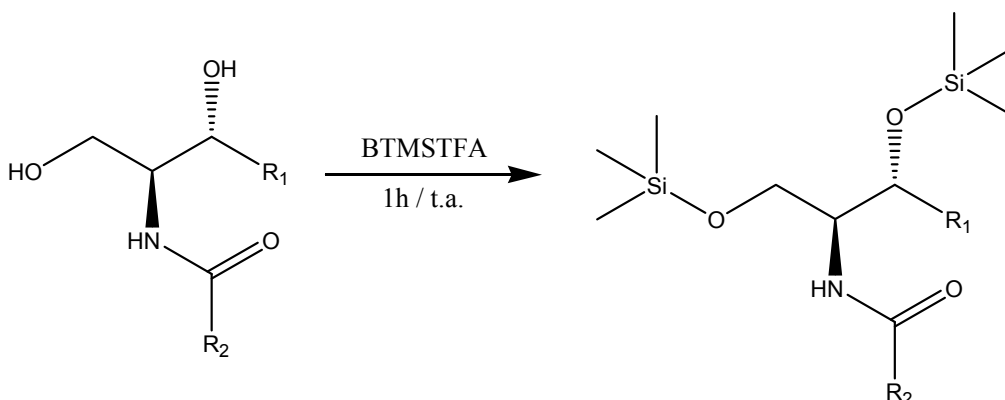


Figura 4.40 Esquema de la reacció de derivatització dels alcohols amb BTMSTFA

D'aquest anàlisi s'observà, tal com s'indica a taula de la Figura 4.41 la variació de temps de retenció segons el grup acil emprat segueix un mateix perfil per les diferents cadenes alifàtiques utilitzades. És interessant destacar que la relació *eritro/treo* s'ha pogut deduir a partir de la comparació de temps de retenció de compostos relacionats de configuració coneguda. En general, els isòmers *treo* mostren un menor temps de retenció que els corresponents isòmers *eritro*. Com era previsible, a la vista dels estudis de reducció amb la cetona model **e55**, l'isòmer majoritari és l'*eritro*. La relació diastereomèrica obtinguda per la majoria de compostos està al voltant de 6:4, excepte en el cas de **58**, **75**, **87** - **89**, que és de 7:3 i de **94**, que és de 1:1. Pels derivats del grup R₁ = fenil, **76**, **81**, **86**, **91**, **96** i **101**, no és possible donar una relació diastereomèrica ja que, en les condicions d'anàlisi emprades, no hi ha una bona resolució dels pics corresponents a cadascun dels diastereòmers.

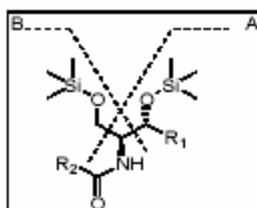
La puresa dels compostos de la quimioteca sintetitzada s'ha determinat, a partir del espectre de GC-MS, per integració dels ions corresponents a l'ió molecular i als de les dues fragmentacions (A i B) característiques d'aquests sistemes (Figura 4.41). D'altra banda, en alguns casos s'han observat senyals corresponents als derivats monosililats que s'han tingut també en compte alhora del càlcul.

Com es pot apreciar a la gràfica adjunta a la Figura 4.41, el 80% dels compostos (24 d'un total de 30) mostren un grau de puresa igual o més gran del 70%, el que demostra la validesa del mètode sintètic emprat per la construcció de la quimioteca.

Quant als "building blocks" emprats, s'observa que no n'hi ha diferències significatives en variar l'organomagnesià (grup R₁) o l'agent acilant (grup R₂) (Taula 4.5). En tots el casos, les mitjanes dels rendiments són iguals o superiors al 70%.

Taula 4.5 Mitjana de percentatges de puresa obtinguts amb cadascun dels "building blocks" emprats en la quimioteca

R ₁	% mitjà	R ₂	% mitjà
Metil	75	Fenil	83
Hexil	74	4-Heptilfenil	72
Octil	74	Isovaleril	81
Dodecil	73	3-Ciclopentiletíl	75
Fenil	83	Naftil	74
		Dimetoxifenilacetil	70



Compost	R ₁	R ₂	M	M-15	A	B	Temps de retenció (min)			puresa (%)	eritro/treo
							eritro	treo	dif. t.r.		
58	metil	fenil	353	338	250	236	27,07	26,29	0,78	70	7:3
77		4-heptilfenil	451	436	348	334	36,37	35,95	0,42	75	6:4
82		isovaleril	333	318	230	216	18,63	17,65	0,96	80	6:4
87		3-ciclopentiletil	373	358	270	256	26,25	25,41	0,84	76	7:3
92		naftil	403	388	300	286	33,45	32,76	0,69	77	6:4
97		dimetoxifenilacetil	427	412	324	310	32,58	31,72	0,86	71	6:4
73	hexil	fenil	423	408	320	236	31,24	30,43	0,81	85	6:4
78		4-heptilfenil	521	506	418	334	40,65	40,14	0,51	67	6:4
83		isovaleril	403	388	300	216	25,69	24,54	1,15	83	6:4
88		3-ciclopentiletil	443	428	340	256	32,08	31,08	1	74	7:3
93		naftil	473	458	370	286	38,38	37,65	0,73	73	6:4
98		dimetoxifenilacetil	497	482	394	310	37,24	36,3	0,94	63	6:4
74	octil	fenil	451	436	348	236	33,85	33,12	0,73	82	6:4
79		4-heptilfenil	549	534	446	334	42,84	42,31	0,53	70	6:4
84		isovaleril	431	416	328	216	28,77	27,67	1,1	77	6:4
89		3-ciclopentiletil	471	456	368	256	34,87	33,87	1	68	7:3
94		naftil	501	486	398	286	40,60	39,96	0,64	76	1:1
99		dimetoxifenilacetil	525	510	422	310	39,52	38,65	0,87	70	6:4
75	dodecil	fenil	507	492	404	236	39,34	38,64	0,70	89	7:3
80		4-heptilfenil	605	590	502	334	47,26	46,75	0,51	69	6:4
85		isovaleril	487	472	384	216	34,72	33,78	0,94	84	6:4
90		3-ciclopentiletil	527	512	424	256	40,14	39,25	0,89	73	6:4
95		naftil	557	542	454	286	45,34	44,7	0,64	65	6:4
100		dimetoxifenilacetil	581	566	478	310	44,25	43,45	0,80	59	7:3
76	fenil	fenil	415	400	312	236	31,32			88	ns
81		4-heptilfenil	513	498	410	334	41,19			81	ns
86		isovaleril	395	380	292	216	25,89	25,42	0,47	83	ns
91		3-ciclopentiletil	435	420	332	256	32,68			83	ns
96		naftil	465	450	362	286	39,03			78	ns
101		dimetoxifenilacetil	489	474	386	310	37,83	37,41	0,42	85	ns

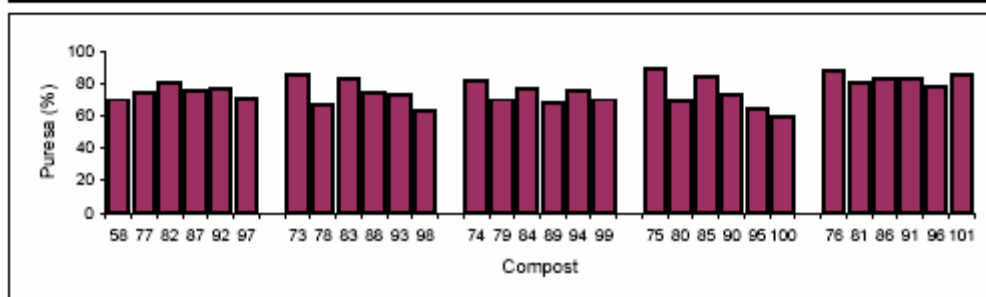


Figura 4.41 Taula i gràfica de l'anàlisi dels compostos 58, 73-101 per CG-EM

5.- PART EXPERIMENTAL

5. PART EXPERIMENTAL

5.1 QUÍMICA

5.1.1 Dades generals

Els espectres d'infraroig s'han registrat en un espectròmetre Bomem MB-120 amb transformada de Fourier en film de cloroform o en pastilla de KBr. Els espectres de ressonància magnètica nuclear s'han realitzat en un espectròmetre Varian Inova 500 MHz treballant a 500 MHz i 125 MHz per a ^1H i ^{13}C respectivament o en un espectròmetre Varian Unity 300 treballant a 300 MHz i 75 MHz pel ^1H i a 50 MHz pel ^{13}C . En algunes de les resines s'han realitzat espectres d'HRMAS, utilitzant un espectròmetre Bruker DMX500 (ubicat a la Universitat de Barcelona), treballant a 500 MHz i a una temperatura de 27 °C. Com a dissolvent s'ha fet servir cloroform deuterat (CDCl_3) i metanol deuterat (MeOD) i, com a referència interna, s'han referit els desplaçaments químics del ^1H i ^{13}C , en el cas del cloroform ($\delta=7,24$ ppm, i 77,0 ppm, respectivament) i pel metanol ($\delta=3,31$ ppm, i 49,0 ppm, respectivament). Els desplaçaments químics es donen en parts per milió (ppm) i les multiplicitats observades en l'assignació de senyals apareixen en el text de la següent manera: s, singlet; d, doblet; t, triplet; q, quadruplet; quin, quintet; hept, heptuplet; m, multiplet; dd, doblet; dt, doble triplet; tt, triplet de triplets; sa, senyal ample; sc, senyal complex. Les constants d'acoblament (J) estan donades en Hertz (Hz).

El procediment emprat per a realitzar espectres en fase gel és el següent: S'ompla el tub de RMN (aproximadament 1.5-2 cm) amb resina prèviament secada al buit i s'addiciona, gota a gota, la mínima quantitat de dissolvent possible per tal de inflar la resina i s'agita la mescla fins a eliminar les bombolles d'aire.

Les anàlisis per CG s'han dut a terme en un cromatògraf TRACE CG, sèrie 2000, acoblat a un detector d'ionització de flama, amb una columna HP-5 (25m x 0.20mm de d.i., 0.33 μm de fase) i heli com a gas portador.

Les anàlisis per CG-EM s'han dut a terme en un cromatògraf de gasos Fisons (sèrie 8000), amb mode d'injecció splitless, acoblat a un detector selectiu de Masses Fisons MD-800 amb analitzador quadrupolar, s'ha emprat una columna DB-5 (J&W) de 25m x 0.25 μm x 0.22mm d.i. i s'ha utilitzat heli com a gas portador. El mode

d'ionització és per impacte electrònic. La temperatura de la font era de 200 °C, la de l'injector, de 250 °C i la del transfer, de 250 °C. En la injecció de la mostra la vàlvula split restà tancada 48 segons. Les anàlisis es feren per adquisició en SCAN, adquirint de 45 a 300 uma en 1 s.

Les anàlisis per HPLC es van realitzar amb l'equip Merck D-6000 tot emprant una columna LiChroCART® RP-18 (Merck) de 5µm i 3,9 x 150 mm. El detector és de fotodiode, de la casa Merck (model L-6000).

Les anàlisis elementals s'han determinat en un analitzador Carlo Erba 1106 al servei de microanàlisi del IIQAB-CSIC.

La cromatografia en capa fina analítica s'ha efectuat sobre plaques de sílice Merck 60F₂₅₄ de 0,2 mm de gruix, emprant com a revelador llum ultraviolada ($\lambda=254$ nm), una dissolució d'àcid fosfomolíbdic en EtOH (6%, p/v), una solució de *p*-anisaldehid en EtOH i H₂SO₄ (2,5 % v/v) o una solució de Ninhidrina en EtOH (2% p/v).

En la purificació de productes mitjançant cromatografia en columna s'ha fet servir gel de sílice de 35-70 µm de partícula.

Els dissolvents anhidres es van preparar de la següent forma: THF i Et₂O per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre sodi i benzofenona en atmosfera d'argó; CH₂Cl₂, hexà i DCE per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre CaH₂ en atmosfera d'argó; Et₃N i piridina per destil·lació sobre KOH; i DMF per destil·lació sobre CaH₂ a pressió reduïda, guardats sobre tamisos moleculars de 4Å sota atmosfera d'argó.

La valoració del MeLi i n-BuLi s'ha fet amb àcid difenilacètic emprant THF anhidre com a dissolvent en tots els casos.

Els àcids **12** i **18** s'esterificaren amb BF₃·MeOH²²¹ (Aldrich).

El diazometà utilitzat per a esterificar l'àcid **28** fou preparat en un vas de precipitats de la següent manera: es preparen 10 mL de KOH al 50% en H₂O, sobre els quals s'hi addicionen 10 mL d'Et₂O. En aquesta mescla s'hi introdueix, a poc a poc i amb l'ajut d'una vareta de vidre, *N*-metil-*N*-nitrosourea, de tal manera que en reaccionar amb el KOH s'obté el diazometà, que es va dissolen en la fase orgànica. Quan la fase aquosa està saturada de diazometà, es decanta la fase orgànica i s'extreu l'aquosa amb més Et₂O. Per tal de decantar la fase orgànica, es congela la fase aquosa en un bany de nitrogen líquid. El diazometà obtingut es guarda en un vial ben tapat a -20 °C fins a la seva utilització.

Les reaccions realitzades sobre suport polimèric, es van dur a terme en xeringues de polipropilè proveïdes de filtre de polietilè de 20 μm i de dos taps, emprant un mètode d'agitació contínua de 360° a 30 rpm. Com a excepció, la reacció d'ancoratge de l'amida de Weinreb sobre el suport sòlid es realitzà en un matràs de 100 mL proveït d'agitació mecànica.

Els rentats es van fer de manera seqüencial i per triplicat utilitzant 6 mL i triant una combinació de dissolvents que inflessin i dessinflessin la resina. Els dissolvents emprats foren de qualitat HPLC, per evitar impureses en les successives etapes de rentat. Per tal d'eliminar els dissolvents dels rentats, la xeringa s'acobla al sistema Versaplate[®] (Varian), que succiona els dissolvents restant la resina a l'interior de la xeringa.

Al final del procés, el desancoratge dels productes del suport sòlid es realitzà seguint la metodologia descrita per Wallace²⁰⁷, tot utilitzant TFA, CH_2Cl_2 i EtOH amb les proporcions (2:2:1.2 mL).

La derivatització dels productes **58**, **73-101** es realitzà amb 50 μL de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (Fluka) i deixant reaccionar durant 1h a temperatura ambient.

Assignació numèrica escollida en aquesta part experimental a l'hora de descriure per ressonància magnètica nuclear els ciclopropens apareguts a la memòria:



5.1.2 Síntesi dels àcids 12 i 18

5.1.2.1 12,14-Dioxa-1-bromopentadecà, 1

En un matràs de 250 mL s'agiten durant 16 h a temperatura ambient 10 g (39.8 mmol) de 11-bromo-1-undecanol, 691 mg (8.0 mmol) de LiBr, 681 mg (3,6 mmol) d'àcid p-toluensulfònic i 80.1 mL (0.9 mol) de dimetoximetà. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 8:2). Un cop finalitzada la reacció, el producte s'extreu amb hexà (3 x 25 mL). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 11.28 g (39.8 mmol, 96% de rendiment) d'un oli groguenc que s'identifica com a 12,14-dioxa-1-bromopentadecà, **1**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.38 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂-Br), 3.33 (s, 3H, CH₃), 1.82 (tt, *J*₁=*J*₂=7.0 Hz, 2H, CH₂_(α)(Br)), 1.56 (sc, 2H, CH₂_(ω)(OMOM)), 1.26 (sa, 14H, CH₂)

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ: 96.3 (O-CH₂-O), 67.81 (O-CH₂), 55.0 (CH₃), 33.9 (CH₂_(α)(Br)), 32.8 (CH₂-Br), 29.7 (CH₂_(ω)(OMOM)), 29.5, 29.4, 29.4, 28.7 (CH₂), 28.1 (CH₂_(β)(Br)), 26.2 (CH₂_(γ)(OMOM))

IR (film)/ν: 2927, 2854, 1465, 1440, 1214, 1149, 1110, 1045, 919, 728 cm⁻¹

5.1.2.2 12,14-Dioxapentadecanal, 2

En un matràs de dues boques de 100 mL, proveït d'agitació magnètica i refrigerant, s'introdueixen sota atmosfera de nitrogen 4 g (13.6 mmol) de 12,14-dioxa-1-bromopentadecà, **1**, 17 mL de toluè, 2.6 g (27 mmol) de N-òxid de piridina i 2.3 g (27 mmol) de NaHCO₃. La mescla groguenca de reacció s'escalfa a reflux durant 4h. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 8:2). Un cop finalitzada la reacció, la mescla es refreda a 25°C, s'hi addicionen 68 mL d'H₂O i s'extreu el producte amb hexà (4 x 50 mL). La fase orgànica es renta amb 25 mL de NaCl, s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 2.2 g (9.6 mmol, 71% de rendiment) d'un oli fosc que s'identifica com 12,14-dioxapentadecanal, **2**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ : 9.73 (t, 1H, $J=1.8$ Hz, CHO), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, $J=6.4$ Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 2.39 (dt, $J_1=7.5$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, 2H, CH₂(α) (C=O)), 1.56 (sc, 4H, CH₂(β) (C=O) i CH₂(β) (OMOM)), 1.26 (sa, 12H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 202.9 (C=O), 96.3 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 43.8 (CH₂(α) (C=O)), 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.1 (CH₂), 26.2 (C₉), 22.0 (CH₂(β) (C=O))

IR (film)/v: 2927, 2856, 1726, 1465, 1457, 1147, 1110, 1045, 919, cm⁻¹

5.1.2.3 15,17-Dioxa-4-octadecanol, 3

En un matràs de 25 mL proveït d'agitació magnètica i atmosfera d'argó es dissol 1 g (4.3 mmol) de 12,14-dioxapentadecanal, **2**, en 4 mL de THF anhidre. Seguidament s'hi addicionen gota a gota, a 0°C, 2.6 mL (5.2 mmol) de clorur de propil magnesi. La mescla s'agita durant 1 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 8:2). Es finalitza la reacció afegint 5 mL d'H₂O i s'extreu el producte amb hexà (4 x 20 mL). La fase orgànica es renta amb 50 mL de NaCl, s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i el dissolvent s'evapora a sequedat. S'obté 1 g (3.6 mmol, 85% de rendiment) d'un oli fosc que s'identifica com a 15,17-dioxa-4-octadecanol, **3**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ : 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.61 (sc, 1H, CH-OH), 3.48 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 1.55 (sc, 4H, CH₂(β) (OH) i CH₂(β) (OMOM)), 1.37 (sc, 4H, CH₂(α) (OH)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.89 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ : 96.4 (O-CH₂-O), 71.7 (CH-OH), 67.9 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 39.7, 37.5 (CH₂(α) (OH)), 29.7, 29.7, 29.5, 29.5, 29.4 (CH₂), 26.2 (CH₂(γ) (OMOM)), 25.6, 18.8 (CH₂(β) (OH)), 14.1 (CH₃)

IR (film)/v: 3416, 2927, 2854, 1465, 1147, 1110, 1043, 919, 728, 647 cm⁻¹

5.1.2.4 15,17-Dioxa-4-octadecanona, 4

En un matràs de 250 mL, proveït d'agitació magnètica, es disposen 700 mg (2.6 mmol) de 15,17-dioxa-4-octadecanol, **3**, sobre els quals s'addicionen, a 0°C, 89 mL (17.9 mmol) d'una dissolució 0.2M de PDC en DMF. La mescla de reacció s'agita durant 6 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 8:2). La reacció s'atura refredant amb un bany de gel i diluint amb 250 mL d'H₂O. El producte s'extreu amb Et₂O (5 x 50 mL). La fase orgànica es renta amb H₂O (7 x 50 mL), i després amb NaCl (4 x 50 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 700 mg (2.6 mmol) de cru de reacció, que es purifica per cromatografia en columna flash, utilitzant un gradient d'hexà/AcOEt. S'obtenen 660.8 mg (2.4 mmol, 95% de rendiment) que s'identifiquen com 15,17-dioxa-4-octadecanona, **4**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 4.57 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.46 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 2.35 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂ (α) (OH)), 2.34 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂ (α) (OH)), 1.55 (sc, 6H, CH₂ (β) (OH) i CH₂ (β) (OMOM)), 1.24 (sa, 12H, CH₂), 0.88 (t, *J*=7.5 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 211.6 (C=O), 96.4 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 44.7, 42.8 (CH₂ (α) (OH)), 29.7, 29.5, 29.4, 29.22 (CH₂), 26.2 (CH₂ (γ) (OMOM)), 23.8 (CH₂ (β) (OH)), 17.3 (CH₂ (β) (OH)), 13.8 (CH₃)

IR (film)/ν: 2927, 2854, 1714, 1463, 1456, 1411, 1371, 1147, 1110, 1047, 919, 728 cm⁻¹

5.1.2.5 15,17-Dioxa-4-metil-4-octadecanol, 5

En un matràs de 10 mL, proveït d'agitació magnètica i atmosfera d'argó, es dissolen 274 mg (1 mmol) de 15,17-dioxa-4-octadecanona, **4**, en 3 mL de THF anhidre. A -78°C s'hi addicionen, gota a gota, 2.2 mL (2.8 mmol) de MeLi 1.24 M. Es deixa en agitació durant 1h a -78°C. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 8:2). S'atura la reacció addicionant gota a gota, amb un bany de gel, 4 mL de NH₄Cl. S'evapora el THF i s'extreu el producte amb hexà (3 x 15 mL). La fase orgànica es renta amb 25 mL de NaHCO₃, amb NaCl (25 mL) fins a pH neutre, s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat.

S'obtenen 242 mg (0.8 mmol, 83% de rendiment) que s'identifiquen com 15,17-Dioxa-4-metil-4-octadecanol, **5**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.56 (sc, 2H, CH₂(_α) (OMOM)), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 96.3 (O-CH₂-O), 72.7 (OH-C-CH₃), 67.8 (CH₂(_α) (OMOM)), 55.0 (O-CH₃), 44.2, 41.9 (CH₂(_α) (OH)), 30.2, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4 (CH₂), 26.9 (CH₃ (Me)), 26.2 (CH₂(_γ) (OMOM)), 23.9 (CH₂(_β) (OH)), 17.1 (CH₃), 14.7 (CH₂(_β) (OH))

IR (film)/ν: 3470, 2929, 2854, 1465, 1456, 1373, 1149, 1112, 1043, 919, 728 cm⁻¹

5.1.2.6 Reaccions de deshidratació de l'alcohol **5**

5.1.2.6.1 Reacció amb SiO₂ activada amb FeCl₃·6H₂O

En un matràs de 50 mL, proveït d'agitació magnètica, es disposen 25 g (41.7 mmol) de SiO₂ amb un 10% de FeCl₃·6H₂O, que es dissolen en la mínima quantitat possible d'Et₂O anhidre. S'obté una suspensió ataronjada que s'asseca a pressió reduïda. La sílica s'activa durant 3 h a 40-50 °C/10⁻¹ mmHg. S'addicionen, gota a gota, 25 mg (0.09 mmol) de 15,17-dioxa-4-metil-4-octadecanol, **5**, dissolts en 10 mL d'Et₂O anhidre, s'agita durant 2 min, s'evapora el dissolvent a pressió reduïda i s'asseca a 10⁻¹ mmHg durant 10 min. S'extreu el producte amb AcOEt (5 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaHCO₃, (2 x 20 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 16 mg d'un oli que s'identifiquen com una mescla de **6** i **9** en una proporció de 2:1.

diol **6**

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 3.62 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.55 (sc, 2H, CH₂(_α) (OH)), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

IR (film)/ν: 3394, 2958, 2925, 2854, 1737, 1731, 1592, 1463, 1456, 1376 cm⁻¹

diol 9

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 3.39 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, O-CH₂), 1.55 (sc, 2H, CH₂(β) (O)), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

IR (film)/ν: 3394, 2958, 2925, 2854, 1737, 1731, 1592, 1463, 1456, 1376 cm⁻¹

5.1.2.6.2 Reacció amb MeOH/HCl*5.1.2.6.2.1 MeOH/HCl 20%*

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica, es disposen de 157 mg (0.5 mmol) de 15,17-dioxa-4-metil-4-octadecanol, **5**, sobre els quals s'addicionen, gota a gota, 8 mL d'una dissolució d'HCl-MeOH del 20%. La mescla de reacció s'agita durant 16 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (Hexà:AcOEt, 8:2). Un cop acabada la reacció, s'elimina el MeOH i s'hi addiciona H₂O (10 mL). El producte s'extreu amb hexà (4 x 5 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 10 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. S'obtenen 148.5 mg d'una mescla complexa de productes, on s'identifiquen **7a**, **7b**, **6** i **8** en una proporció aproximada 1:2.5:3.

alcohol 7a i 7b

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 5.08 (sc, 1H, =CH), 3.62 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.94 (sc, 4H, CH₂(β) (Me) i CH₂(β) (=)), 1.64 (s, 3H, CH₃ (Me)), 1.55 (sc, 5H, CH₂ i CH₃ (Me)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.89 (sc, 3H, CH₃)

IR (film)/ν: 3350, 2927, 2854, 1716, 1465, 1377, 1149, 1072, 1036, 919 cm⁻¹

diol 6

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 3.62 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.55 (sc, 2H, CH₂(α) (OH)), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

IR (film)/ν: 3350, 2927, 2854, 1716, 1465, 1377, 1149, 1072, 1036, 919 cm⁻¹

alcohol 8

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 3.62 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, CH₃), 3.11 (s, 3H, O-CH₃), 1.55 (sc, 2H, CH₂), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.05 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (sc, 2H, CH₂-OH)

IR (film)/ν: 3350, 2927, 2854, 1716, 1465, 1377, 1149, 1072, 1036, 919 cm⁻¹

5.1.2.6.2.2 *MeOH/HCl concentrat*

En un matràs de 10 mL, proveït d'agitació magnètica, es disposen 148 mg (0.5 mmol) de 15,17-dioxa-4-metil-4-octadecanol, **5**. En un matràs de 10 mL, proveït d'agitació magnètica, es prepara la dissolució HCl en MeOH de la següent manera: 1.65 mL de MeOH es refreden a 0 °C. S'hi addicionen, gota a gota, 248 µL de clorur d'acetil i s'agita durant 10 min a 0 °C. 0.95 mL d'aquesta dissolució preparada s'addicionen sobre l'alcohol **5**. La mescla de reacció s'escalfa a reflux durant 3 h. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (CH₂Cl₂:MeOH, 10%). La reacció s'atura per addició de 5 mL d'H₂O. S'evapora el MeOH i s'extreu el producte amb hexà (3 x 3 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 10 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 105 mg (0.4 mmol, 84 % de rendiment) d'11-metil-1,11-tetradecandiol, **6**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 3.62 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.55 (sc, 2H, CH₂(_ω) (OH)), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

5.1.2.6.2.3 *MeOH/HCl concentrat i tamisos*

Se segueix el procediment anterior, i s'hi afegixen tamisos moleculars de 4 Å de diàmetre. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 51 mg (0.2 mmol) de **5** i 500 µL de dissolució HCl/MeOH. S'obtenen 22.5 mg d'una mescla complexa de productes, on s'identifiquen **7a**, **7b** i **8** en una proporció de 2:1.

alcohol 7a i 7b

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ : 5.08 (sc, 1H, =CH), 3.62 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, CH₂-OH), 1.94 (sc, 4H, CH₂(β) (Me) i CH₂(β) (=)), 1.64 (s, 3H, CH₃ (Me)), 1.55 (sc, 5H, CH₂ i CH₃ (Me)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.89 (sc, 3H, CH₃)

alcohol 8

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ : 3.62 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, CH₃), 3.11 (s, 3H, O-CH₃), 1.55 (sc, 2H, CH₂), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 1.05 (s, 3H, CH₃ (Me)), 0.89 (sc, 2H, CH₂-OH)

5.1.2.6.3 I₂/toluè

En un matràs de 5 mL, proveït d'agitació magnètica, es dissolen 20 mg (0.06 mmol) de 15,17-dioxa-4-metil-4-octadecanol, **5**, en 2 mL de toluè. S'introdueix un cristall de I₂ i s'escalfa a reflux durant 16 h. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (CH₂Cl₂:MeOH, 10%). S'atura la reacció rentant amb NaHSO₃ 1 N (3 x 20 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 15 mg d'una mescla complexa de productes on només s'observa que el grup protector ha estat substituït per un àtom de iode.

5.1.2.6.4 SOCl₂/piridina

En un matràs de 5 mL, proveït d'agitació magnètica, es dissolen 116 mg (0,4 mmol) de 15-hidroxi-15-metil-2,4-dioxaoctadecà, **5**, en 1 mL de piridina anhidra. A 0 °C s'addicionen, gota a gota, 37 μ L (0.5 mmol) de SOCl₂. S'escalfa a reflux durant 1 h. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 7:3). Es refreda la mescla de reacció i es dissol en 15 mL d'hexà. Es renta amb HCl 1N (4 x 10 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 242 mg (0.8 mmol, 47% de rendiment) d'una mescla de **7d**, **7e** i **7f**, en una proporció de 1.5:1.

alcohol 7d i 7e

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ : 5.08 (sc, 1H, =CH), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.93 (sc, 4H, CH₂ (β) (Me)), 1.64 (s, 3H, CH₃ (Me)), 1.55 (sc, 3H, CH₂ (β) (OMOM) i CH₃ (Me)), 1.25 (sa, 18H, CH₂), 0.89 (sc, 3H, CH₃)

IR (film) ν : 2927, 2854, 1465, 1379, 1259, 1215, 1147, 1112, 1045, 919 cm⁻¹

alcohol 7f

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ : 4.66 (s, 2H, =CH₂), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.93 (sc, 4H, CH₂ (α) (=)), 1.55 (sc, 2H, CH₂ (β) (OMOM)), 1.25 (sa, 16H, CH₂), 0.89 (sc, 3H, CH₃)

IR (film)/ ν : 2927, 2854, 1465, 1379, 1259, 1215, 1147, 1112, 1045, 919 cm⁻¹

5.1.2.7 Intents d'hidrogenació**5.1.2.7.1 Hidrogenació amb Pd/C 10%/MeOH**

En un matràs de 10 mL, proveït d'agitació magnètica i acoplat a un sistema d'hidrogenació, es disposen 245 mg (0.9 mmol) de la mescla d'olefines **7**, dissolts en 4 mL de EtOH. S'hi addicionen 25 mg de Pd/C al 10% i es deixa sota atmosfera d'H₂, amb agitació vigorosa, durant 5 h. Passat aquest temps, es filtra el catalitzador a través de *Celite*[®]. El filtrat s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 186 mg de producte de partida inalterat.

5.1.2.7.2 Hidrogenació amb PtO₂/AcOH

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica i acoplat a un sistema d'hidrogenació, es disposen 14 mg (0.06 mmol) de PtO₂, dissolts en 0.8 mL de AcOH. S'hi addicionen 140 mg (0.5 mmol) de l'olefina **7** dissolts en 2 mL de AcOH i es deixa sota atmosfera d'H₂, amb agitació vigorosa, durant 16 h. El transcurs de la reacció es controla per cromatografia de gasos. Passat aquest temps, es filtra el catalitzador a través d'un filtre de plecs, que es manté humit amb AcOH. Es neutralitza l'acètic amb NaOH. S'extreu el producte amb hexà (4 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl

(2 x 20 mL), s'asseca amb MgSO₄, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 50 mg de producte de partida inalterat.

5.1.2.8 13,15-Dioxa-2-propil-1-hexadecè, 7f

En un matràs de tres boques de 100 mL, proveït d'agitació magnètica, atmosfera d'argó i refrigerant, s'introdueixen 4.4 g (12.2 mmol) de bromur de metil trifenilfosfoni, que s'assequen a 90°C/10⁻¹ mmHg durant 16h. Sota atmosfera d'argó, la sal es refreda a 25°C i es dissol en 29.6 mL de THF anhidre. A -20 °C s'addicionen, gota a gota, 8.5 mL (12.7 mmol) de *n*-BuLi 1.48 M en hexà. En adiciona'ls, s'observa que la suspensió blanquinosa va prenent una coloració groguenca fins a ser totalment vermella, passant pel taronja. Es deixa en agitació durant 1.5 h a temperatura ambient, es refreda a -40°C i s'hi addicionen 833 mg (3.1 mmol) de 15,17-dioxa-4-octadecanona, **4**, dissolts en 2 mL de THF anhidre. La mescla de reacció es deixa agitar durant 1h fins que el bany arriba a temperatura ambient. Finalment, s'escalfa a reflux durant dues hores. S'observa com la dissolució es va enfosquint a mesura que avança la reacció. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (Hexà:AcOEt, 8:2), la fosfina es revela amb la làmpada d'UV i el producte de reacció amb àcid fosfomolibdic. Es deixa refredar a 25°C i s'atura la reacció per addició, gota a gota, de 8.5 mL d'H₂O a 0 °C. S'evapora el THF i s'extreu el producte amb hexà (3 x 5 mL). La fase orgànica es renta amb H₂O fins a pH neutre de la fase aquosa, seguidament es renta amb HCl 1 N (2 x 10 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i es concentra a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 857.9 mg de cru que es purifica per cromatografia flash, eluïnt primer amb 19 volums de retenció d'hexà i després amb barreges d'hexà/AcOEt de polaritat creixent (0.5% d'AcOEt cada 9 volums de retenció) fins la elució del producte. S'obtenen 468.3 mg (1.7 mmol, 56% de rendiment) d'un oli que s'identifica com 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, **7f**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 4.66 (s, 2H, =CH₂), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.93 (sc, 4H, CH₂(α) (=)), 1.55 (sc, 2H, CH₂(β) (OMOM)), 1.25 (sa, 16H, CH₂), 0.89 (sc, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 150.1 (=C), 108.5 (=CH₂), 96.4 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 38.2, 36.0 (CH₂(α) (=)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4 (CH₂), 27.8 (CH₂(β) (=)), 26.2 (CH₂(γ) (OMOM)), 20.9 (CH₂(β) (=)), 13.9 (CH₃)

IR (film)/ ν : 2927, 2856, 1645, 1465, 1458, 1440, 1382, 1218, 1149, 1112, 1045, 919, 887 cm^{-1}

5.1.2.9 2,4-Dioxa-15-metiloctadecà, **10**

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica i acoplat a un sistema d'hidrogenació, es disposen 488.5 mg (1.8 mmol) de 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, **7c**, dissolts en 6 mL de MeOH. S'hi addicionen 50 mg de Pd/C al 10% i es deixa sota atmosfera d' H_2 , amb agitació vigorosa, durant 5 h. El transcurs de la reacció es controla per cromatografia de gasos (t_{R} producte de reacció = 13.27 min., t_{R} producte de partida = 13.72 min., 140°C fins a 170°C a 2°C/min i fins a 300°C a 10°C/min). Passat aquest temps, es filtra el catalitzador a través de *Celite*[®]. El filtrat s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 355.7 mg (1.3 mmol, 72% de rendiment) de 2,4-dioxa-15-metiloctadecà, **10**.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ : 4.59 (s, 2H, O- CH_2 -O), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.34 (s, 3H, O- CH_3), 1.56 (sc, 2H, CH_2 (β) (OMOM)), 1.0 a 1.4 (sc, 21H, CH_2), 0.85 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3), 0.81 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3 (Me))

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 96.3 (O- CH_2 -O), 67.8 (O- CH_2), 54.9 (O- CH_3), 39.3, 37.0 (CH_2 (α) (Me)), 32.4 (CH-Me), 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 (CH_2), 26.9 (CH_2 (β) (Me)), 26.1 (CH_2 (γ) (OMOM)), 20.1, 19.6 (CH_2 (β) (Me) i CH_3 (Me)), 14.3 (CH_3)

IR (film)/ ν : 2925, 2854, 1465, 1378, 1218, 1151, 1112, 1047, 919 cm^{-1}

5.1.2.10 11-Metil-1-tetradecanol, **11**

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica i embut d'addició de pressió compensada, es disposen de 355,7 mg (1.3 mmol) de 2,4-dioxa-15-metiloctadecà, **10**, sobre els quals s'addicionen gota a gota 18.2 mL d'una dissolució d'HCl-MeOH del 10%. La mescla de reacció s'agita durant 16 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (Hexà:AcOEt, 8:2). Un cop acabada la reacció, es dilueix amb 70 mL d' Et_2O . La fase orgànica es renta amb HCl 1 N (4 x 25 mL), s'asseca amb MgSO_4 anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda, s'obtenen 285 mg (1.25 mmol, 96% de rendiment) de 11-metil-1-tetradecanol, **11**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 3.62 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, CH₂-OH), 1.54 (sc, 2H, CH₂(β) (OH)), 1.0 a 1.4 (sc, 21H, CH₂), 0.85 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₃), 0.81 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃ (Me))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 63.1 (CH₂-OH), 39.4 (CH₂(α) (Me)), 37.1 (CH₂(α) (Me)), 32.8 (CH₂(β) (OH)), 32.5 (CH-OH), 29.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4 (CH₂), 27.1 (CH₂(β) (Me)), 25.7 (CH₂(γ) (OH)), 20.1, 19.6 (CH₂(β) (Me) i CH₃ (Me)), 14.4 (CH₃)

IR (film)/ ν : 3339, 2925, 2854, 1465, 1459, 1377, 1056 cm⁻¹

5.1.2.11 Àcid 11-metiltetradecanoic, **12**

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica, es disposen 200 mg (0.9 mmol) de 11-metil-1-tetradecanol, **11**, dissolts en 4.8 mL d'acetona. En un matràs de 10 mL es prepara el reactiu de Jones de la següent manera: una dissolució de 90 mg (0.9 mmol) de CrO₃ en 626 μ L d'aigua es refreda a 0°C i s'hi addicionen 78 μ L (1.5 mmol) de H₂SO₄ 98%. Aquest reactiu s'addiciona sobre l'alcohol **11** gota a gota a 0°C. La mescla de reacció s'agita durant 4 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (CH₂Cl₂: MeOH, 9:1). La reacció s'atura per addició de 20 mL d'H₂O i s'extreu el producte amb Et₂O (4 x 15 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 25 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 211 mg (0.9 mmol) de cru de reacció, que es purifica per cromatografia en columna flash, utilitzant un gradient de CH₂Cl₂/MeOH. S'obtenen 186 mg (0.8 mmol, 88% de rendiment) de l'àcid 11-metiltetradecanoic, **12**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂(α) (C=O)), 1.61 (sc, 2H, CH₂(β) (C=O)), 1.0 a 1.4 (sc, 19H, CH₂), 0.86 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃), 0.82 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, Me)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 179.9 (C=O), 37.1, 37.0 (CH₂(α) (Me)), 32.7, 32.3 (CH₂(α) (C=O) i CH-Me), 29.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1 (CH₂), 27.1, 26.7 (CH₂(β) (C=O) i CH₂(β) (Me)), 22.7 (CH₂(β) (Me)), 19.7 (Me), 14.1 (CH₃)

IR (film)/ ν : 3300-2900, 2925, 2854, 1710, 1463, 1411, 1376, 1288, 1242, 938, 728 cm⁻¹

CG-EM m/z de l'ester metílic (%): 256 (M⁺, 27) 227 (20), 225 (15), 213 (95), 185 (92), 143 (95), 101 (82), 87 (100), 74 (97), 71 (75), 59 (84)

5.1.2.12 17,19-Dioxa-6-eicosanol, 13

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de 15,17-dioxa-4-octadecanol, **3**, utilitzant les següents quantitats de reactius: 2.2 g (9.6 mmol) de 12,14-dioxapentadecanal, **2**, 9 mL de THF anhidre i 5.7 mL (11.4 mmol) de bromur de pentilmagnesi. S'obtenen 2.6 g (8.6 mmol, 90% de rendiment) d'un oli groguenc que s'identifica com a 17,19-dioxa-6-eicosanol, **13**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 4.61 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.68 (sc, 1H, CH-OH), 3.51 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.35 (s, 3H, O-CH₃), 1.56 (sc, 4H, CH₂(β) (OH) i C CH₂(β) (OMOM)), 1.42 (sc, 4H, CH₂(α) (OH)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.88 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 96.3 (O-CH₂-O), 71.9 (CH-OH), 67.9 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 37.4 (CH₂(α) (OH)), 31.9 (CH₂(γ) (OH)), 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4 (CH₂), 26.2 (CH₂(γ) (OMOM)), 25.6, 25.3 (CH₂(β) (OH)), 22.6 (CH₂-CH₃), 14.0 (CH₃)

IR (film)/ν: 3438, 2927, 2856, 1465, 1147, 1112, 1045, 919, 728, 647 cm⁻¹

5.1.2.13 17,19-Dioxa-6-eicosanona, 14

Se segueix el procediment general descrit per l'obtenció de la 15,17-dioxa-4-octadecanona, **4**, es fan servir les següents quantitats de reactius: 2 g (6.6 mmol) de 17,19-dioxa-6-eicosanol, **13** i 232 mL (46.4 mmol) d'una dissolució 0.2M de PDC en DMF. S'obtenen 1.9 g (6.3 mmol, 95% de rendiment) d'un oli fosc que s'identifiquen com a 17,19-dioxa-6-eicosanona, **14**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 4.57 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.47 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.31 (s, 3H, O-CH₃), 2.34 (t, *J*=7.5 Hz, 4H, CH₂(α) (OH)), 1.52 (sc, 6H, CH₂(β) (C=O) i CH₂(β) (OMOM)), 1.23 (sa, 16H, CH₂), 0.85 (t, *J*=7.5 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 211.6 (C=O), 96.2 (O-CH₂-O), 67.7 (O-CH₂), 54.9 (O-CH₃), 42.7, 42.6 (CH₂(α) (C=O)), 31.3 (CH₂(γ) (C=O)), 29.6, 29.4, 29.3, 29.1 (CH₂), 26.1 (CH₂(γ) (OMOM)), 23.7, 23.4 (CH₂(β) (C=O)), 22.3 (CH₂-CH₃), 13.8 (CH₃)

IR (film)/ν: 2927, 2856, 1714, 1463, 1456, 1411, 1376, 1218, 1147, 1110, 1045, 921, 728 cm⁻¹

5.1.2.14 13,15-Dioxa-2-pentil-1-hexadecè, 15

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, **7c**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 1.2 g (3.8 mmol) de 17,19-dioxa-6-eicosanona, **14**, 5.4 g (15.3 mmol) de bromur de metil trifenilfosfoni, 37 mL de THF i 10.7 mL (14.6 mmol) de *n*-BuLi (1.48 M). S'obtenen 1.4 g de cru, que es purifica per cromatografia flash, en les mateixes condicions que per a la purificació de **7c**. S'obtenen 627 mg (2 mmol, 55% de rendiment) de 13,15-dioxa-2-pentil-1-hexadecè, **15**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 4.65 (s, 2H, =CH₂), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.96 (t, *J*=7.0 Hz, 4H, CH₂ (α) (=)), 1.56 (sc, 2H, CH₂ (β) (OMOM)), 1.38 (sc, 4H, CH₂ (β) (=)), 1.25 (sa, 19H, CH₂), 0.87 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ: 150.4 (C=CH₂), 108.3 (C=CH₂), 96.3 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 36.0, 35.9 (CH₂ (α) (=)), 31.6 (CH₂ (γ) (=)), 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4 (CH₂), 27.8, 27.5 (CH₂ (β) (=)), 26.2 (CH₂ (γ) (OMOM)), 22.6 (CH₂-CH₃), 14.1 (CH₃)

IR (film)/ν: 2927, 2856, 1645, 1463, 1456, 1440, 1382, 1218, 1149, 1112, 1045, 919, 887 cm⁻¹

5.1.2.15 2,4-Dioxa-15-metileicosà, 16

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de 2,4-dioxa-15-metiloctadecà, **10**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 500 mg (1.7 mmol) de 13,15-dioxa-2-pentil-1-hexadecè, **15**, 3 mL (46.4 mmol) de MeOH i 50 mg de Pd/C al 10%. S'obtenen 442.9 mg (1.5 mmol, 88% de rendiment) d'un oli groguenc que s'identifica com a 2,4-dioxa-15-metileicosà, **16**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.56 (sc, 2H, CH₂ (β) (OMOM)), 1.0 a 1.4 (sc, 25H, CH₂), 0.85 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃), 0.80 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, Me)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 96.4 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 37.1, 37.0 (CH₂ (α) (Me)), 32.7, 32.2 (CH-Me i CH₂ (γ) (Me)), 30.0, 29.7, 29.68, 29.6,

29.4 (CH₂), 27.1, 26.7 (CH₂ (β) (Me)), 26.2 (CH₂ (γ) (OMOM)), 22.7 (CH₂-CH₃), 19.7 (Me), 14.1 (CH₃)

IR (film)/ν: 2925, 2854, 1465, 1378, 1218, 1151, 1112, 1047, 919, 728 cm⁻¹

5.1.2.16 11-Metil-1-hexadecanol, 17

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de 11-metil-1-tetradecanol, **11**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 400 mg (1.3 mmol) de 2,4-dioxa-15-metileicosà, **16** i 18.7 mL d'una dissolució d'HCl-MeOH del 10%. S'obtenen 322 mg (1.3 mmol, 96% de rendiment) d'un oli groguenc que s'identifiquen com a 11-metil-1-hexadecanol, **17**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 3.62 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.55 (sc, 2H, CH₂ (β) (OH)), 1.0 a 1.4 (sc, 24H, CH₂), 0.85 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃), 0.80 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, Me)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 63.1 (CH₂-OH), 37.1, 37.0 (CH₂ (α) (Me)), 32.8, 32.7, 32.2 (CH₂ (β) (OH), CH₂ (β) (Me) i CH₂ (γ) (Me)), 30.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4 (CH₂), 27.1, 26.74 (CH₂ (β) (Me) i CH₂ (γ) (Me)), 25.7 (CH₂ (γ) (OH)), 22.7 (CH₂-CH₃), 19.7 (Me), 14.1 (CH₃)

IR (film)/ν: 3339, 2925, 2854, 1465, 1459, 1377, 1056 cm⁻¹

5.1.2.17 Àcid 11-metilhexadecanoic, 18

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de l'àcid 11-metiltetradecanoic, **12**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 200 mg (0.78 mmol) de 11-metil-1-hexadecanol, **17** i 0.58 mmol reactiu de Jones. S'obtenen 187.7 mg (0.69 mmol, 89% de rendiment) d'un oli groguenc de l'àcid 11-metilhexadecanoic, **18**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 2.33 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.61 (sc, 2H, CH₂ (β) (C=O)), 1.0 a 1.4 (sc, 22H, CH₂), 0.85 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃), 0.80 (d, *J*=6.5 Hz, 3H, Me)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 180 (C=O), 37.1, 37.0 (CH_2 (α) (Me)), 34.2 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$), 32.7, 32.3 (CH-Me i CH_2 (γ) (Me)), 29.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1 (CH_2), 27.1, 26.7 (CH_2 (β) (Me)), 24,7 (CH_2 (β) (C=O)), 22.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 19.7 (Me), 14.1 (CH_3)

IR (film)/ ν : 3300-2900, 2925, 2854, 1710, 1465, 1459, 1417, 1377, 1056, 932 cm^{-1}

CG-EM m/z de l'èster metílic (%): 284 (M^+ ,31) 241 (55), 227 (12), 213 (49), 185 (51), 143 (85), 87 (88), 74 (100), 57 (65)

5.1.3 Preparació de l'àcid 11-ciclopropilundecanoic, 25

5.1.3.1 12-Bromo-1-dodecanol, 19

En un matràs de tres boques de 250 mL, proveït d'agitació magnètica, refrigerant i embut d'addició, es dissolen 10 g (49.5 mmol) de 1,12-dodecandiol en 115 mL de toluè. Seguidament s'addicionen, gota a gota, a 0°C (bany de gel), 45 mL (396 mmol) d'àcid bromhídric del 48%. La mescla s'escalfa a reflux ($125\text{-}130^\circ\text{C}$) durant 2,5 h. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:AcOEt, 1:1). La reacció s'atura per addició del cru de reacció sobre 30 mL de NaOH 10 N i el producte s'extreu amb hexà (4 x 15 mL). La fase orgànica obtinguda es renta amb NaHCO_3 (2 x 40 mL) i amb NaCl (40 mL), s'asseca sobre MgSO_4 anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 14.16 g de cru que es purifica per cromatografia flash en columna de gel de sílice, eluint amb un gradient d'hexà-AcOEt. S'obtenen 9.7 g (36.6 mmol, 75% de rendiment) que s'identifiquen com a 12-bromo-1-dodecanol, **19**.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 3.55 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 3.34 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.76 (tt, $J_1=J_2=7.0$ Hz, 2H, CH_2 (β) (OH)), 1.49 (tt, $J_1=J_2=6.5$, 2H, CH_2 (β) (Br)), 1.2 a 1.4 (sc, 16H, CH_2)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 62.7 ($\text{CH}_2\text{-Br}$), 33.9 (CH_2 (β) (OH)), 32,7, 32,6 ($\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH_2 (β) (Br)), 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 28.6, 28.0 (CH_2), 25.6 (CH_2 (γ) (Br))

IR (film)/ ν : 3350, 2925, 2854, 1465, 1440, 1370, 1353, 1248, 1056 cm^{-1}

5.1.3.2 13,15-Dioxa-1-bromohexadecà, **20**

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció del 12,14-dioxa-1-bromopentadecà, **1**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 3.7 mg (13.96 mmol) de 12-bromo-1-dodecanol, **19**, 242.3 mg (2.79 mmol) de LiBr, 238.9 mg (1.26 mmol) de p-toluensulfònic i 28.1 mL (0.318 mol) de dimetoximetà. S'obtenen 4.1 g (13.27 mmol, 95% de rendiment) d'un oli groguenc que s'identifica com a 13,15-dioxa-1-bromohexadecà, **20**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.38 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂-Br), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.83 (tt, *J*₁=*J*₂=7.0 Hz, 2H, CH₂(β) (Br)), 1.56 (tt, *J*₁=*J*₂=6.5 Hz, 2H, CH₂(β) (OMOM)), 1.25 (sa, 16H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 96.4 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 34.1 (CH₂(β) (Br)), 32.8 (CH₂-Br), 29.7, 29.5, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 28.7, 28.2, 26.2 (CH₂)

IR (film)/ν: 2927, 2854, 1465, 1440, 1388, 1253, 1214, 1149, 1110, 1045, 919, 728, 647 cm⁻¹

5.1.3.3 13,15-Dioxaheptadecanal, **21**

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de 12,14-dioxapentadecanal, **2**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 4 g (12.94 mmol) de 13,15-dioxa-1-bromohexadecà, **20**, 2.5 g (26.32 mmol) de N-òxid de piridina, 2.2 g (26.19 mmol) de NaHCO₃ i 16 mL de toluè. S'obtenen 2.8 g (11.48 mmol, 88% de rendiment) d'un oli fosc que s'identifica com a 13,15-dioxaheptadecanal, **21**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 9.73 (t, *J*=2.0 Hz, 1H, CHO), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.48 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 2.39 (td, *J*₁=7.0 Hz, *J*₂=2.0 Hz, 2H, CH₂-CHO), 1.56 (sc, 4H, CH₂(β) (CHO) i CH₂(β) (OMOM)), 1.24 (sa, 14H, CH₂)

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ: 202.9 (CHO), 96.3 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 43.9 (CH₂-CHO), 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.1 (CH₂), 26.2 (CH₂(γ) (OMOM)), 22.0 (CH₂(β) (CHO))

IR (film)/ ν : 2927, 2854, 1726, 1465, 1388, 1218, 1147, 1110, 1045, 918, 732 cm^{-1}

5.1.3.4 14,16-Dioxa-1-heptadecè, 22

S'utilitza el procediment general descrit per a l'obtenció de 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, **7c**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 1.5 g (6.1 mmol) de 13,15-dioxahexadecanal, **21**, 8.8 g (24.6 mmol) de bromur de metiltrifenilfosfoni, 59 mL de THF i 17.2 mL (25.5 mmol) de *n*-BuLi (1.48 M). S'obtenen 1.74 g de cru que es purifica per cromatografia flash, eluïnt primer amb 3 volums de retenció d'hexà i després amb 3 volums de retenció d'hexà-AcOEt 99:1. S'obtenen 0.9 mg (3.7 mmol, 60% de rendiment) de 14,16-dioxa-1-heptadecè, **22**.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 5.79 (tdd, $J_1=17.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, $J_3=6.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.96 (dtd, $J_1=17.0$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, $J_3=2.0$ Hz, 1H, CH_2-CH), 4.90 (dtd, $J_1=10.0$ Hz, $J_2=1.0$ Hz, $J_3=2.0$ Hz, 1H, CH_2-CH), 4.59 (s, 2H, O- CH_2 -O), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.33 (s, 3H, O- CH_3), 2.01 (sc, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 1.56 (sc, 2H, CH_2 (β) (OMOM)), 1.24 (sa, 16H, CH_2)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 139.2 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 114.1 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 96.4 (O- CH_2 -O), 67.9 (O- CH_2), 55.0 (O- CH_3), 33.8 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.1, 28.9 (CH_2), 26.2 (CH_2 (γ) (OMOM))

IR (film)/ ν : 2925, 2854, 1641, 1463, 1456, 1440, 1382, 1213, 1149, 1112, 1045, 919, 910, 722 cm^{-1}

5.1.3.5 11-Ciclopropil-1-undecanol, 24

En un matràs de 100 mL proveït d'agitació magnètica i atmosfera d'argó, es dissolen 500 mg (2.19 mmol) de 14,16-dioxa-1-heptadecè, **22**, en 30 mL de CH_2Cl_2 . S'addicionen gota a gota, a -20°C , 6.6 mL (6.58 mmol) de Et_2Zn (Aldrich). Seguidament, a la mateixa temperatura, s'addicionen, gota a gota, 795 μL (9.87 mmol) de CH_2I_2 . L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de gasos (**20**, $t_{\text{R}} = 20.71$ min; **18**, $t_{\text{R}} = 17.83$ min, 80°C (2 min) fins a 280°C a $5^\circ\text{C}/\text{min}$). Quan s'observa que la reacció no evoluciona s'hi addiciona 1 equivalent més de Et_2Zn i CH_2I_2 , fins a un total de 3 equivalents. Un cop s'ha exhaurit tot el producte de partida (cromatografia de

gasos), la reacció s'atura per addició, gota a gota, de 15 mL de NaOH 3M. S'evapora el CH_2Cl_2 per evitar emulsions i s'extreu el producte amb hexà (4 x 20 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 20 mL), s'asseca amb MgSO_4 anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 543mg d'un oli transparent que s'hidrolitza directament amb 32 mL d'una dissolució d'HCl-MeOH 10%, seguint el procediment general descrit per l'obtenció de l'11-metil-1-tetradecanol, **11**. S'obtenen 465.6 mg d'un oli groguenc que es purifica per cromatografia flash en columna de gel de sílice, utilitzant un gradient d'Hexà-AcOEt. S'obtenen 309.6 mg (1.56 mmol, 71% de rendiment) d'11-ciclopropil-1-undecanol, **24**.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3), δ : 3.62 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.54 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\beta)$ (OH)), 1.25 (sa, 16H, CH_2), 1.16 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\alpha)$ (Δ)), 0.62 (sc, 1H, $\text{CH}(1)$), 0.36 (dd, $J_1=J_2=8$ Hz, $J_3=2.0$ Hz, 2H, $1\text{CH}_2(2)$ i $1\text{CH}_2(3)$), -0.04 (dd, $J_1=J_2=5.0$ Hz, $J_3=1.5$ Hz, 2H, $1\text{CH}_2(2)$ i $1\text{CH}_2(3)$)

$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3), δ : 63.1 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 34.8 ($\text{CH}_2(\alpha)$ (Δ)), 32.8 ($\text{CH}_2(\beta)$ (OH)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 25.7 (CH_2), 10.9 ($\text{CH}(1)$), 4.3 ($\text{CH}_2(2$ i $3)$)

IR (film)/ ν : 3339, 3077, 3011, 2923, 2852, 1479, 1463, 1454, 1444, 1434, 1427, 1056, 1012, 819, 721 cm^{-1}

5.1.3.6 Àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció del 15,17-dioxa-4-octadecanona, **7**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 250 mg (1.26 mmol) d'11-ciclopropil-1-undecanol, **24**, i 44 mL (8.84 mmol) d'una dissolució 0.2M de PDC en DMF. S'obtenen 245.2 mg d'un oli groguenc que es purifica per cromatografia flash amb gel de sílice desactivada amb un 10% d' H_2O , utilitzant un gradient de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$. S'obtenen 200 mg (0.94 mmol, 75% de rendiment) d'àcid 11-ciclopropilundecanoic, **25**.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3), δ : 10.79 (sa, 1H, COOH), 2.32 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 1.61 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\beta)$ (COOH)), 1.25 (sa, 14H, CH_2), 1.16 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\alpha)$ (Δ)), 0.62 (sc, 1H, $\text{CH}(1)$), 0.35 (dd, $J_1=J_2=8.0$ Hz, $J_3=2.0$ Hz, 2H, $1\text{CH}_2(2)$ i $1\text{CH}_2(3)$), -0.04 (dd, $J_1=J_2=5.0$ Hz, $J_3=1.5$ Hz, 2H, $1\text{CH}_2(2)$ i $1\text{CH}_2(3)$)

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ : 180.3 (COOH), 34.8, 34.09 (CH₂-COOH i CH₂ (α) (Δ)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.0 (CH₂), 24.7 (CH₂ (β) (COOH)), 10.9 (CH (γ)), 4.3 (CH₂ (δ i ϵ))

IR (film)/v: 2400-3500, 2918, 2850, 1702, 1463, 1428, 1409, 1294, 1242, 1213, 1149, 1108, 1043, 939, 908, 822, 734, 688, 653 cm⁻¹

CG-EM m/z de l'èster metílic (%): 209 (M⁺-31, 5), 166 (10), 87 (66), 74 (100), 69 (52), 55 (97)

5.1.4 Preparació de l'11-ciclopropilidenundecanoat de metil, 28:Me

5.1.4.1 15-Ciclopropiliden-2,4-dioxaundecà, 26

S'utilitza el procediment general descrit per a l'obtenció de 13,15-dioxa-2-propil-1-hexadecè, **7c**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 100 mg (0.4 mmol) de 12,14-dioxapentadecanal, **2**, 684.4 mg (1.8 mmol) de bromur de ciclopropiltrifenilfosfoni (Aldrich), 4.3 mL de THF i 1.3 mL (1.8 mmol) de *n*-BuLi 1.48 M en hexà. S'obtenen 150 mg de cru que es purifica per cromatografia flash, eluint primer amb 3 volums de retenció d'hexà i després amb un gradient d'hexà-AcOEt. S'obtenen 90 mg (0.4 mmol, 79% de rendiment) de 15-ciclopropiliden-2,4-dioxapentadecà, **26**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.73 (ddt, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=J_3=2.0$ Hz, 1H, CH=C), 4.59 (s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 2.14 (sc, 2H, CH₂ (α) (=)), 1.56 (sc, 2H, CH₂ (β) (OMOM)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.99 (dd, $J_1=J_2=3$ Hz, $J_3=J_4=2$ Hz, 4H, CH₂ (δ i ϵ))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 120.8 (C (γ)), 118.4 (CH=C), 96.4 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 31.8 (CH₂ (β) (OMOM)), 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4 (CH₂), 26.2 (CH₂ (α) (=) i CH₂ (γ) (OMOM)), 2.1, 1.8 (CH₂ (δ i ϵ))

IR (film)/v: 3055, 2925, 2854, 1465, 1436, 1201, 1147, 1116, 1068, 1045, 919, 744, 721, 694, 541, 512 cm⁻¹

5.1.4.2 11-Ciclopropiliden-1-undecanol, 27

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de 11-metil-1-tetradecanol, **11**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 27 mg (0.11 mmol) de 2,4-dioxa-15-ciclopropilidenpentadecà, **26** i 1.5 mL d'una dissolució d'HCl-MeOH del 10%. S'obtenen 30 mg d'un oli groguenc que es purifica per cromatografia flash, utilitzant un gradient de hexà-AcOEt. S'obtenen 21 mg (0.1 mmol, 94% de rendiment) d'un oli transparent que s'identifica com a 11-ciclopropiliden-1-undecanol, **27**.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.73 (ddt, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=J_3=2.0$ Hz, 1H, CH=C), 3.61 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, CH₂-OH), 2.14 (sc, 2H, CH₂(α)(=)), 1.54 (sc, 2H, CH₂(β)(OH)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.99 (dd, $J_1=J_2=3$ Hz, $J_3=J_4=2$ Hz, 4H, CH₂(2 i 3))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 120.8 (C₍₁₎), 118.4 (CH=C), 63.1 (CH₂-OH), 32.8, 31.8 (CH₂(β)(OH) i CH₂(α)(=)), 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3 (CH₂), 25.7 (CH₂(γ)(OH)), 2.1, 1.8 (CH₂(2 i 3))

IR (film)/ν: 3339, 3055, 2925, 2854, 1732, 1465, 1459, 1376, 1265, 1056, 1000, 960, 931, 722 cm⁻¹

5.1.4.3 Àcid 11-ciclopropilidenundecanoic, 28

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció del 15,17-dioxa-4-octadecanona, **4**. Es fan servir les següents quantitats de reactius: 21 mg (0.1 mmol) del 11-ciclopropiliden-1-undecanol, **27**, i 4 mL (0.8 mmol) d'una dissolució 0.2M de PDC en DMF. S'obtenen 17.9 mg (0.08 mmol, 79% de rendiment) d'àcid 11-ciclopropilidenundecanoic, **28**.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃), δ: 5.73 (ddt, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=J_3=2.0$ Hz, 1H, CH=C), 2.32 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, CH₂-COOH), 2.14 (sc, 2H, CH₂(α)(=)), 1.60 (sc, 2H, CH₂(β)(COOH)), 1.25 (sa, 12H, CH₂), 0.99 (dd, $J_1=J_2=3$ Hz, $J_3=J_4=2$ Hz, 4H, CH₂(2 i 3))

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃), δ: 179.8 (COOH), 120.8 (C₍₁₎), 118.4 (CH=C), 34.0 (CH₂-COOH), 31.8 (CH₂(α)(=)), 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 29.0 (CH₂), 24.7 (CH₂(β)(COOH)), 2.1, 1.8 (CH₂(2 i 3))

IR (film)/ ν : 3300-2900, 3051, 2925, 2854, 1710, 1459, 1417, 1288, 1119, 1073, 1043, 962, 932, 804, 728 cm^{-1}

Anàlisi elemental: Calculat per $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_2$ Calculat: C 74.95%, H 10.78%

Trobat: C 74.94%, H 10.77%

5.1.4.4 11-Ciclopropilidenundecanoat de metil, 28:Me

Sobre una mostra analítica de l'àcid 11-ciclopropilidenundecanoic, **28**, s'addicionen 25 μL de diazometà en Et_2O . Al cap d'un minut s'evapora el dissolvent sota corrent de N_2 i es redissol en hexà.

CG-EM m/z de l'ester metílic (%): 95 (M^+ -143, 68), 81 (100), 67 (55), 55 (61)

5.1.5 Preparació dels acetilens 30, 31 i 32

5.1.5.1 2,4-Dioxa-16-heptadecí, 29

En un matràs de tres boques de 500 mL, proveït d'agitació magnètica, d'un condensador i d'una entrada d'acetilè, es condensen, aproximadament, 233 mL de NH_3 a -78°C . Seguidament, es bombolleja acetilè, previament rentat i sec, durant 1 h a -78°C . A continuació s'addicionen 254 mg (37 mmol) de Li. Un cop ha reaccionat el Li es canvia el condensador per un refrigerant, s'afegeixen 25.7 mL de DMSO i s'evapora el NH_3 . Un cop evaporat el NH_3 , s'introdueixen 6 g (20 mmol) de **1** dissolts en 3 mL de DMSO. La mescla s'agita durant 1 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de gasos (t_{R} producte de reacció = 10.21 min., t_{R} producte de partida = 11.94 min., 120°C fins a 280°C a $10^\circ\text{C}/\text{min}$). Un cop finalitzada la reacció, s'hi addicionen 68 mL d' H_2O i s'extreu el producte amb hexà (4 x 20 mL). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO_4 anhidre i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 4.7 g (19.6 mmol, 96% de rendiment) d'un oli que s'identifica com 2,4-Dioxa-16-heptadecí, **29**.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3), δ : 4.59 (s, 2H, O- CH_2 -O), 3.48 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.33 (s, 3H, CH_3), 2.15 (dt, $J_1=7$ Hz, $J_2=3$ Hz, 2H, CH_2 (\equiv)), 1.91 (t, $J=3$ Hz, 1H, CH), 1.56 (sc, 2H, CH_2 (β) (OMOM)), 1.49 (sc, 2H, CH_2 (β) (\equiv)), 1.24 (sa, 14H, CH_2)

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 96.3 (O- CH_2 -O), 84.8 ($\text{C}\equiv$), 68.0, 67.8 (O- CH_2 i $\text{CH}\equiv$), 55.0 (CH_3), 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.1, 28.7, 28.5, 26.2 (CH_2) 18.4 (CH_2 (α) (\equiv))

IR (film)/ ν : 3312, 2928, 1466, 1387, 1221, 1147, 1112, 1044, 919, 722 cm^{-1}

5.1.5.2 Formació dels acetilens 30, 31 i 32

Per a la formació dels acetilens, es segueix el procediment experimental emprat en la formació de **30**: En un matràs de 100 mL proveït d'agitació magnètica i atmosfera d'argó s'addicionen gota a gota, a 0°C, 8 mL *n*-BuLi (12 mmol, 1.4 M) sobre 2.3g de 2,4-dioxa-16-heptadecí, **29**, (10 mmol) dissolt en 11 mL de THF anhidre. Al cap de 5' s'hi afegeixen gota a gota, a 0 °C, 700 μL de iodur de metil (12 mmol) diluït en 11 mL de HMPA. La mescla s'agita durant 16 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de gasos (t_{R} producte de reacció = 11.90 min., t_{R} producte de partida = 10.21 min., 120 °C fins a 280 °C a 10 °C/min). Es finalitza la reacció afegint 5 mL de NH_4Cl a 0 °C. S'evapora el THF a sequetat amb el rotavapor. S'extreu el producte amb hexà (4 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2x20 mL), s'asseca amb MgSO_4 anhidre, es filtra i el dissolvent s'evapora a sequetat. El cru de reacció es purifica per cromatografia flash de AgNO_3 , emprant un gradient d'hexà/ AcOEt , tot obtenint 1.5 g (6 mmol, 63% de rendiment) d'un oli que s'identifica com a 2,4-Dioxa-16-octadecí, **30**.

Seguint aquest procés, 2 g (8 mmol) de **29**, 7.7 mL (10 mmol) de *n*-BuLi (1.34 M), 9 mL THF anhidre, 9 mL de HMPA i 0.8 mL (10 mmol) de iodur d'etil forniren 2.17 g (8 mmol, 97% de rendiment) de 2,4-Dioxa-16-nonadecí, **31**.

Anàlogament, 2 g (8 mmol) de **29**, 7.7 mL (10 mmol) de *n*-BuLi (1.34 M), 9 mL THF anhidre, 9 mL de HMPA i 0.98 mL (10 mmol) de iodur de propil forniren 1.4 g (5 mmols, 60% de rendiment) de 2,4-Dioxa-16-eicosí, **32**.

2,4-Dioxa-16-octadecí, **30**

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3), δ : 4.59 (s, 2H, CH_2 (\equiv)), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.33 (s, 3H, O- CH_3), 2.08 (qt, $J_1=2.5$ Hz, $J_2=2$ Hz, 2H, CH_2 (α) (\equiv)), 1.75 (t, $J=2.5$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\equiv$), 1.56 (sc, 2H, CH_2 (β) (OMOM)), 1.44 (sc, 2H, CH_2 (β) (\equiv)), 1.24 (sa, 14H, CH_2)

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3), δ : 96.3 (O- CH_2 -O), 79.4, 75.3 (C (\equiv)), 67.8 (O- CH_2), 55.1 (O- CH_3), 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 28.9 (CH_2), 26.2 (CH_2 (γ) (OMOM)), 18.7 (CH_2 (α) (\equiv)), 3.5 (Me)

IR (film)/ ν : 2927, 2855, 2768, 1465, 1386, 1214, 1148, 1112, 1046, 920 cm^{-1}

2,4-Dioxa-16-nonadeci, **31**

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ : 4.61 (s, 2H, O- CH_2 -O), 3.51 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.35 (s, 3H, O- CH_3), 2.13 (sc, 4H, $\text{CH}_2\equiv\text{CH}_2$), 1.56 (sc, 2H, CH_2 (β) (OMOM)), 1.46 (sc, 2H, CH_2 (β) (\equiv)), 1.27 (sa, 14H, CH_2), 1.11 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3)

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 96.3 (O- CH_2 -O), 81.5, 79.5 (C (\equiv)), 67.8 (O- CH_2), 55.0 (O- CH_3), 29.7, 29.5, 29.5, 29.5, 29.4, 29.1, 29.1, 28.8 (CH_2), 26.2 (CH_2 (γ) (OMOM)), 18.7 ($\equiv\text{CH}_2$), 14.4 (CH_3), 12.4 ($\text{CH}_2\equiv$)

IR (film)/ ν : 2928, 2855, 1465, 1385, 1320, 1216, 1148, 1112, 1046, 920 cm^{-1}

2,4-Dioxa-16-eicosi, **32**

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3), δ : 4.59 (s, 2H, O- CH_2 -O), 3.49 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.33 (s, 3H, O- CH_3), 2.10 (sc, 4H, $\text{CH}_2\equiv\text{CH}_2$), 1.56 (sc, 2H, CH_2 (β) (OMOM)), 1.45 (sc, 2H, CH_2 (β) (\equiv)), 1.25 (sa, 16H, CH_2), 0.94 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3)

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3), δ : 96.4 (O- CH_2 -O), 80.4, 80.0 (C (\equiv)), 67.9 (O- CH_2), 55.1 (O- CH_3), 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 28.8 (CH_2), 26.2 (CH_2 (γ) (OMOM)), 22.5 (CH_2 (β) (\equiv)), 20.8 ($\text{CH}_2\equiv$), 18.7 ($\equiv\text{CH}_2$), 13.4 (CH_3)

IR (film)/ ν : 2928, 2855, 1465, 1382, 1338, 1216, 1149, 1112, 1046, 920 cm^{-1}

5.1.6 Preparació dels àcids **45a**, **46a** i **47a**

5.1.6.1 Formació de les olefines de configuració *Z*

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica i acoplat a un sistema d'hidrogenació, es disposen 30 mg de Lindlar, dissolts en 5 mL d'hexà. S'hi addicionen 507 mg (2 mmol) de **30** dissolts en 2 mL d'hexà i es deixa sota atmosfera d' H_2 , amb agitació vigorosa, durant 1 h. El transcurs de la reacció es controla per cromatografia de gasos (t_{R} producte de reacció = 10.99 min., t_{R} producte de partida = 11.90 min., 120 °C fins a 280 °C a 10 °C/min). Passat aquest temps, es filtra el catalitzador a través de *Celite*[®]. El filtrat

s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 497 mg de producte que s'identifica com a 2,4-Dioxa- (Z)-16-octadecè, **33a**.

Seguint aquest procés, 778 mg (3 mmol) de **31**, 46 mg de Lindlar i 10 mL d'hexà forniren 770 mg (3 mmol, 98% de rendiment) de 2,4-Dioxa-(Z)-16-nonadecè, **34a**.

Anàlogament, 526.6 mg (2 mmol) de **32**, 31 mg de Lindlar i 6.4 mL d'hexà forniren 525.6 mg (2 mmol, 99% de rendiment) de 2,4-dioxa-(Z)-16-eicosè, **35a**.

2,4-Dioxa- (Z)-16-octadecè, 33a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.38 (sc, 2H, CH=CH), 4.59(s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, J=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 1.96 (sc, 2H, CH₂(α) (=)), 1.58 (sc, 5H, CH₂(β) (OMOM) i CH₂(ω) (=)), 1.24 (sa, 18H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 130.9 (CH=), 123.6 (CH=), 96.3 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 32.6 (CH₂(β) (OMOM)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3 (CH₂), 26.8 (CH₂(α) (=)), 26.2 (CH₂(γ) (OMOM)), 12.7 (CH₃)

IR (film) υ: 3026, 2925, 2854, 2768, 1463, 1385, 1301, 1215, 1150, 1112, 1046, 966, 920 cm⁻¹

2,4-Dioxa-(Z)-16-nonadecè, 34a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.31 (sc, 2H, CH=CH), 4.59(s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, J=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 2.01 (sc, 4H, CH₂(α) (=)), 1.56 (sc, 2H, CH₂(β) (OMOM)), 1.24 (sa, 16H, CH₂), 0.93 (t, J=7.5 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 131.5 (CH=), 129.3 (CH=), 96.4 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 29.8, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (CH₂), 27.1 (CH₂(γ) (OMOM)), 26.2 (CH₂(α) (=)), 20.5 (CH₂(α) (=)), 14.4 (CH₃)

IR (film)υ: 3026, 2925, 2854, 2768, 1463, 1385, 1301, 1215, 1150, 1112, 1046, 966, 920 cm⁻¹

2,4-dioxa-(Z)-16-eicosè, 35a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.33 (sc, 2H, CH=CH), 4.59(s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, J=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.34 (s, 3H, O-CH₃), 1.99 (sc, 4H, CH₂(α) (=)), 1.56 (sc, 2H, CH₂(β) (OMOM)), 1.24 (sa, 18H, CH₂), 0.88 (t, J=7 Hz, 3H, CH₃)

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 130.1, 129.6 (CH=), 96.4 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.1 (O-CH₃), 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3 (CH₂), 27.2 (CH₂ (α) (=)), 26.2 (CH₂ (γ) (OMOM)), 22.9 (CH₂-CH₃), 13.8 (CH₃)

IR (film)/ ν : 2926, 2855, 2768, 1465, 1386, 1215, 1149, 1112, 1046, 920 cm^{-1}

5.1.6.2 Formació dels àcids 36a, 37a i 38a

En un matràs de 25 mL, proveït d'agitació magnètica i embut d'addició de pressió compensada, es disposen de 167.5 mg (0.7 mmol) de **33a**, sobre els quals s'addicionen gota a gota 9.3 mL d'una dissolució d'HCl-MeOH del 10%. La mescla de reacció s'agita durant 16 h a temperatura ambient. Un cop acabada la reacció, es dilueix amb 30 mL d'Et₂O. La fase orgànica es renta amb HCl 1 N (4 x 20 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda, s'obtenen 138 mg d'un cru que és utilitzat sense cap tipus de purificació a la següent reacció. Per tant, una solució del reactiu de Jones recient preparada (es prepara per addició de 63 μL (1.2 mmol) de H₂SO₄ 98% a 0°C sobre una dissolució de 66.5 mg (0.65 mmol) de CrO₃ en 504 μL d'aigua es refreda) s'addiciona lentament, a 0°C, sobre aquest cru dissolt en 4 mL d'acetona. La mescla de reacció s'agita durant 4 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (CH₂Cl₂:MeOH, 9:1). La reacció s'atura per addició de 15 mL d'H₂O i s'extreu el producte amb Et₂O (4 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 20 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 140.6 mg (0.6 mmol, 96% de rendiment) de l'àcid (Z)-12-tetradecenoic, **36a**.

Seguint aquest procés, 657.6 mg (2.4 mmol) de **34a** i 34.6 mL d'HCl-MeOH del 10% forniren 415.7 mg d'un cru que es tractà amb una solució del reactiu de Jones recient preparada (188 mg (1.8 mmol) de CrO₃, 1.3 mL d'H₂O, 163 μL d'H₂SO₄ concentrat, 10.3 mL d'acetona), tot obtenint 411 mg (1.7 mmol, 93% de rendiment) de l'àcid (Z)-12-pentadecenoic, **37a**.

Anàlogament, 184.4 mg (0.6 mmol) de **35a** i 9.2 mL d'HCl-MeOH del 10% forniren 145.4 mg d'un cru que es tractà amb una solució del reactiu de Jones recient preparada (62 mg (0.6 mmol) de CrO₃, 428 μL d'H₂O, 54 μL d'H₂SO₄ concentrat, 3.4 mL d'acetona), tot obtenint 139 mg (0.5 mmol, 90% de rendiment) de l'àcid (Z)-12-hexadecenoic, **38a**.

Acid (Z)-12-tetradecenoic, 36a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.39 (sc, 2H, CH=CH), 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.99 (sc, 2H, CH₂ (α) (=)), 1.61 (sc, 5H, CH₂ (β) (COOH) i CH₂ (α) (=)), 1.24 (sa, 14H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 179.8 (COOH), 131.7 (CH=CH), 123.6 (CH=CH), 33.9 (CH₂-COOH), 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0 (CH₂), 26.8 (CH₂ (α) (=)), 24.6 (CH₂ (β) (COOH)), 17.9 (CH₃)

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3014, 2925, 2854, 1708, 1465, 1411, 1284, 1226, 1185, 965, 721 cm⁻¹

Acid (Z)-12-pentadecenoic, 37a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.31 (sc, 2H, CH=CH), 2.31 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.99 (sc, 4H, CH₂ (α) (=)), 1.59 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOH)), 1.24 (sa, 14H, CH₂), 0.92 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 180.4 (COOH), 131.4 (CH=CH), 129.2 (CH=CH), 34.1 (CH₂-COOH), 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.2, 29.0 (CH₂), 27.0 (CH₂ (α) (=)), 24.6 (CH₂ (β) (COOH)), 20.4 (CH₂ (α) (=)), 14.3 (CH₃)

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3005, 2927, 2855, 1711, 1464, 1413, 1283, 1234, 1116, 1068, 938, 722 cm⁻¹

Acid (Z)-12-hexadecenoic, 38a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.33 (sc, 2H, CH=CH), 2.31 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.98 (sc, 4H, CH₂ (α) (=)), 1.60 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOH)), 1.24 (sa, 16H, CH₂), 0.87 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 180.4 (COOH), 130.0, 129.6 (CH=CH), 34.1 (CH₂-COOH), 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.2, 29.0 (CH₂), 27.2 (CH₂ (α) (=)), 24.6 (CH₂ (β) (COOH)), 22.9 (CH₂ (α) (=)), 13.8 (CH₃)

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3007, 2927, 2856, 1711, 1464, 1414, 1286, 1232, 1115, 936, 722 cm⁻¹

5.1.6.3 Esterificació dels àcids 36a, 37a i 38a

En un matràs de 10 mL, proveït d'agitació magnètica, es disposen 140.6 mg (0.6 mmol) de l'àcid (*Z*)-12-tetradecenoic, **36a**, dissolts en 2 mL de MeOH. S'hi addicionen 158 μ L de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1.2 mmol) i s'agita durant 1 h a temperatura ambient. El transcurs de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (hexà:Et₂O, 1:1). La reacció s'atura per addició de 5 mL d'H₂O i s'evapora el dissolvent. S'extreu el producte amb hexà (4 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 20 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. El cru de la reacció es purifica per cromatografia en columna flash, utilitzant un gradient de hexà/Et₂O. S'obtenen 72.9 mg (0.3 mmol, 49% de rendiment) de (*Z*)-12-tetradecenoat de metil, **39a**.

Seguint aquest procés, 411 mg (1.7 mmol) de l'àcid (*Z*)-12-pentadecanoic, **37a**, 434 μ L (3.4 mmol) de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ i 1.4 mL de MeOH forniren 166.7 mg (0.7 mmol, 38% de rendiment) de (*Z*)-12-pentadecenoat de metil, **40a**.

Anàlogament, 139 mg (1.5 mmol) de **38a**, 139 μ L (1.1 mmol) de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ i 443 μ L de MeOH forniren 54.5 mg (0.2 mmol, 37% de rendiment) de (*Z*)-12-hexadecenoat de metil, **41a**.

(*Z*)-12-tetradecenoat de metil, **39a**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.38 (sc, 2H, CH=CH), 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOMe), 1.99 (sc, 2H, CH₂ (α) (=)), 1.60 (sc, 5H, CH₂ (β) (COOMe) i CH₂ (ω) (=)), 1.23 (sa, 14H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 174.3 (COOMe), 130.9 (CH=CH), 123.6 (CH=CH), 51.4 (Me), 34.1 (CH₂-COOMe), 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1 (CH₂), 26.8 (CH₂ (ω) (=)), 24.9 (CH₂ (β) (COOMe)), 12.7 (CH₃)

IR (film)/ ν : 3014, 2926, 2855, 1743, 1436, 1364, 1248, 1196, 1171, 1116, 1015, 966, 722 cm⁻¹

(*Z*)-12-pentadecenoat de metil, **40a**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.31 (sc, 2H, CH=CH), 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOMe), 2.0 (sc, 4H, CH₂ (ω) (=)), 1.61 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOMe)), 1.24 (sa, 14H, CH₂), 0.93 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 174.3 (COOMe), 131.5 (CH=CH), 129.3 (CH=CH), 51.4 (Me), 34.1 (CH₂-COOMe), 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.2, 29.1 (CH₂), 27.1 (CH₂ (α) (=)), 24.9 (CH₂ (β) (COOMe)), 20.5 (CH₂ (α) (=)), 14.4 (CH₃)

IR (film)/v: 3005, 2927, 2855, 1744, 1463, 1436, 1362, 1249, 1196, 1171, 1117, 1015, 722 cm⁻¹

(Z)-12-hexadecenoat de metil, **41a**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 5.33 (sc, 2H, CH=CH), 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOMe), 1.98 (sc, 4H, CH₂ (α) (=)), 1.59 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOMe)), 1.24 (sa, 16H, CH₂), 0.88 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 174.3 (COOMe), 130.1 (CH=CH), 129.6 (CH=CH), 51.4 (Me), 34.1 (CH₂-COOMe), 29.7, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1 (CH₂), 27.2 (CH₂ (α) (=)), 24.9 (CH₂ (β) (COOMe)), 22.9 (CH₂ (α) (=)), 13.8 (CH₃)

IR (film)/v: 3004, 2926, 2855, 1744, 1458, 1436, 1376, 1250, 1196, 1171, 1115, 986, 722 cm⁻¹

5.1.6.4 Formació dels ciclopropans 42a, 43a i 44a

En un matràs de 25 mL proveït d'agitació magnètica i atmosfera d'argó, es dissolen 72.9 mg (0.3 mmol) de **39a**, en 4 mL de CH₂Cl₂. S'addicionen gota a gota, a -20°C, 911 μ L (0.9 mmol) de Et₂Zn. Seguidament, a la mateixa temperatura, s'addicionen, gota a gota, 110 μ L (1.4 mmol) de CH₂I₂. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de gasos (**42a**, $t_R = 10.84$ min; **39a**, $t_R = 9.72$ min, 120 °C (1 min) fins a 280°C a 10 °C/min). Un cop s'ha exhaurit tot el producte de partida (cromatografia de gasos), la reacció s'atura per addició, gota a gota, de 3 mL de NaOH 3M. S'evapora el CH₂Cl₂ per evitar emulsions i s'extreu el producte amb hexà (4 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 15 mL), s'asseca amb MgSO₄ anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 76 mg (0.29 mmol, 98 % de rendiment) d'un oli transparent que s'identifica com al 11-(*cis*-2-metilciclopropil)undecanoat de metil, **42a**.

Seguint aquest procés, 166.7 mg (0.7 mmol) de **40a**, 2 mL (2 mmol) de Et₂Zn, 238 μ L (3 mmol) de CH₂I₂ i 7.9 mL de CH₂Cl₂ forniren 141.6 mg (0.5 mmol, 81% de rendiment) de 11-(*cis*-2-etilciclopropil)undecanoat de metil, **43a**.

Anàlogament, 54.5 mg (0.2 mmol) de **41a**, 610 μL (0.6 mmol) de Et_2Zn , 74 μL (0.9 mmol) de CH_2I_2 i 2.4 mL de CH_2Cl_2 forniren 55.8 mg (0.2 mmol, 97% de rendiment) de 11-(*cis*-2-propilciclopropil)undecanoat de metil, **44a**.

11-(cis-2-metilciclopropil)undecanoat de metil, 42a

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3), δ : 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOMe}$), 1.58 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOMe)), 1.23 (sa, 14H, CH_2), 0.98 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, CH_3), 0.51-0.81 (sc, 3H, CH (1), CH (3) i CH_2 *cis* (2)), -0.37 (sc, 1H, CH_2 *trans* (2))

$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3), δ : 174.3 (COOMe), 51.4 (Me), 34.2, 34.1 ($\text{CH}_2\text{-COOMe}$ i CH_2 (α) (Δ)), 29.6, 29.6, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1 (CH_2), 24.9 (CH_2 (β) (COOMe)), 22.7 (CH_3), 15.7 (CH (1)), 13.2 (CH_2 (2)), 9.3 (CH (3))

IR (film)/ ν : 3061, 2993, 2925, 2854, 1743, 1463, 1435, 1361, 1248, 1197, 1170, 1116, 1018, 722 cm^{-1}

11-(cis-2-etilciclopropil)undecanoat de metil, 43a

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOMe}$), 1.59 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOMe)), 1.24 (sa, 18H, CH_2), 0.95 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3), 0.49-0.65 (sc, 3H, CH (1), CH (3) i CH_2 *cis* (2)), -0.35 (sc, 1H, CH_2 *trans* (2))

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 174.3 (COOMe), 51.4 (Me), 34.1 (CH_2 (α) (Δ)), 30.2, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1, 28.6 (CH_2), 24.9 (CH_2 (α) (Δ)), 21.9 (CH_2 (β) (COOMe)), 17.7 (CH (3)), 15.9 (CH (1)), 14.5 (CH_3), 10.7 (CH_2 (2))

IR (film)/ ν : 3060, 2990, 2925, 2854, 1744, 1463, 1436, 1362, 1306, 1251, 1196, 1171, 1116, 1019, 851, 722 cm^{-1}

11-(cis-2-propilciclopropil)undecanoat de metil, 44a

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOMe}$), 1.58 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOMe)), 1.25 (sa, 20H, CH_2), 0.89 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3), 0.50-0.69 (sc, 3H, CH (1), CH (3) i CH_2 *cis* (2)), -0.34 (sc, 1H, CH_2 *trans* (2))

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 174.3 (COOMe), 51.4 (Me), 34.1 (CH_2 (α) (Δ)), 30.9, 30.2, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7 (CH_2), 24.9 (CH_2 (β) (COOMe)), 23.3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 15.7, 15.5 (CH (1) i CH (3)), 14.1 (CH_3), 10.9 (CH_2 (2))

IR (film)/ ν : 3059, 2990, 2925, 2854, 1744, 1457, 1436, 1362, 1306, 1251, 1196, 1170, 1112, 1018, 721 cm^{-1}

5.1.6.5 Formació dels àcids 45a, 46a, 47a

En un matràs de 5 mL proveït d'agitació magnètica, es dissolen 63.7 mg (0.3 mmol) de **42a**, en 517 μ L de KOH/MeOH 2.5 N. Seguidament, s'adicionen 3 gotes d' H_2O i s'agita la mescla durant 16 h a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es controla per cromatografia de capa fina (CH_2Cl_2 :MeOH, 9:1). La reacció s'atura per addició de 10 mL de HCl 1N. S'evapora el dissolvent i s'extreu el producte amb CH_2Cl_2 (4 x 5 mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO_4 anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 59.8 mg (0.3 mmol) d'un oli groc que es purifica per cromatografia en columna flash, utilitzant un gradient de CH_2Cl_2 /MeOH, fornint 48.4 mg (0.2 mmol, 80 % de rendiment) de l'àcid 11-(*cis*-2-metilciclopropil)undecanoic, **45a**.

Seguint aquest procés, 141.6 mg (0.5 mmol) de **43a** i 1.1 mL de KOH/MeOH 2.5N forniren 124.9 mg (0.5 mmol, 93% de rendiment) de l'àcid 11-(*cis*-2-etilciclopropil)undecanoic, **46a**.

Anàlogament, 55.8 mg (0.2 mmol) de **44a** i 408 μ L de KOH/MeOH 2.5N forniren 48.1 mg (0.2 mmol, 91% de rendiment) de l'àcid 11-(*cis*-2-propilciclopropil)undecanoic, **47a**.

Àcid 11-(*cis*-2-metilciclopropil)undecanoic, **45a**

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ : 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2 -COOH), 1.61 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOH)), 1.23 (sa, 14H, CH_2), 0.98 (d, $J=6$ Hz, 3H, CH_3), 0.51-0.78 (sc, 3H, CH (1), CH (3) i CH_2 *cis* (2)), -0.37 (sc, 1H, CH_2 *trans* (2))

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 179.9 (COOH), 34.2, 34.0 (CH_2 -COOH i CH_2 (α) (Δ)), 29.6, 29.6, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1 (CH_2), 28.4 (CH_2 (β) (Δ)), 24.7 (CH_2 (β) (COOH)), 22.7 (CH_2 (α) (Δ)), 15.7 (CH (1)), 13.2 (CH_2 (2)), 9.3 (CH (3))

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3061, 2990, 2925, 2854, 1708, 1463, 1361, 1248, 1197, 1170, 1116, 1018, 722 cm^{-1}

Àcid 11-(*cis*-2-etilciclopropil)undecanoic, **46a**

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ : 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2 -COOH), 1.61 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOH)), 1.25 (sa, 18H, CH_2), 0.96 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3), 0.50-0.69 (sc, 3H, CH (1), CH (3) i CH_2 *cis* (2)), -0.35 (sc, 1H, CH_2 *trans* (2))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 179.9 (COOH), 34.0 (CH₂-COOH i CH₂(α) (Δ)), 30.2, 29.7, 29.6, 29.4, 29.2, 29.0, 228.6 (CH₂), 24.7 (CH₂(β) (Δ)), 21.9 (CH₂(β) (COOH)), 17.7 (CH (3)), 15.9 (CH (1)), 14.5 (CH₃), 10.7 (CH₂ (2))

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3060, 2990, 2925, 2854, 1708, 1463, 1436, 1362, 1306, 1251, 1196, 1171, 1116, 1019, 722 cm⁻¹

Àcid 11-(cis-2-propilciclopropil)undecanoic, 47a

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ : 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.58 (sc, 2H, CH₂(β) (COOH)), 1.25 (sa, 20H, CH₂), 0.89 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃), 0.50-0.69 (sc, 3H, CH (1), CH (3) i CH₂ cis (2)), 0.34 (sc, 1H, CH₂ trans (2))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ : 179.5 (COOH), 36.5 (CH₂(α) (Δ)), 34.3 (CH₂(α) (Δ)), 33.9 (CH₂-COOH), 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7 (CH₂), 24.9 (CH₂(β) (COOH)), 23.3 (CH₂-CH₃), 15.7, 15.5 (CH (1) i CH (3)), 14.1 (CH₃), 10.9 (CH₂ (2))

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3059, 2990, 2925, 2854, 1704, 1457, 1436, 1362, 1306, 1251, 1196, 1170, 1112, 1018, 721 cm⁻¹

5.1.7 Preparació dels àcids 45b, 46b i 47b

5.1.7.1 Formació de les olefines de configuració E

En un matràs de tres boques de 100 mL, proveït d'agitació magnètica i d'un condensador, es condensen, aproximadament, 60 mL de NH₃ a -78 °C. Seguidament, s'addicionen, a la mateixa temperatura, 500 mg (2 mmol) del 2,4-dioxa-16-octadecí, **30**, dissolt en 21 mL de THF anhidre. A continuació s'addicionen 226.4 mg (10 mmol) de Na. Un cop ha reaccionat el Na es deixa 8 h a reflux (- 33 °C). Un cop acabada la reacció, s'evapora el NH₃ i s'addicionen 30 mL de MeOH. Finalment, s'evaporen els dissolvents. El producte es renta amb 50 mL d'una solució saturada de NH₄Cl, aquest s'extreu amb Et₂O (3 x 10 mL). La fase orgànica es renta amb NaCl (2 x 20 mL), s'asseca sobre MgSO₄ anhidre i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda fins a sequedat. S'obtenen 400.8 mg (1.6 mmol, 81 % de rendiment) d'un oli que s'identifica com 2,4-Dioxa-(E)-16-octadecè, **33b**.

Seguint aquest procés, 500 mg (1.9 mmol) de **31**, 56 mL de NH₃, 214.6 mg (9mmol) de Na i 19.6 mL de THF anhidre forniren 400.8 mg (1.5 mmol, 81% de rendiment) de 2,4-dioxa-(E)-16-nonadecè, **34b**.

Anàlogament, 500 mg (2 mmol) de **32**, 59 mL de NH₃, 226.4 mg (10mmol) de Na i 21 mL de THF anhidre forniren 473.9 mg (1.9 mmol, 95% de rendiment) de 2,4-dioxa-(*E*)-16-eicocè, **35b**.

2,4-Dioxa- (E)-16-octadecè, 33b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.39 (sc, 2H, CH=CH), 4.59(s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 1.94 (sc, 2H, CH₂(α) (=)), 1.56 (sc, 4H, CH₂(β) (OMOM) i CH₂(α) (=)), 1.24 (sa, 16H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 131.8 (CH=), 129.4 (CH=), 96.4 (O-CH₂-O), 67.8 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 32.6 (CH₂(β) (OMOM)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2 (CH₂), 26.2, 25.6 (CH₂(α) (=) i CH₂(γ) (OMOM)), 13.9 (CH₃)

IR (film) ν: 2925, 2854, 2768, 1463, 1385, 1301, 1215, 1150, 1112, 1046, 966, 920, 722 cm⁻¹

2,4-Dioxa-(E)-16-nonadecè, 34b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.39 (sc, 2H, CH=CH), 4.59(s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 1.94 (sc, 4H, CH₂(α) (=)), 1.56 (sc, 2H, CH₂(β) (OMOM)), 1.24 (sa, 16H, CH₂), 0.93 (t, *J*=7.5 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 131.8 (CH=), 129.4 (CH=), 96.4 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 32.6 (CH₂(α) (=)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2 (CH₂), 26.2, 25.6 (CH₂(γ) (OMOM) i CH₂(α) (=)), 13.9 (CH₃)

IR (film)/ν: 2925, 2854, 2768, 1463, 1385, 1301, 1215, 1150, 1112, 1046, 966, 920, 722 cm⁻¹

2,4-dioxa-(E)-16-eicosè, 35b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.36 (sc, 2H, CH=CH), 4.59(s, 2H, O-CH₂-O), 3.49 (t, *J*=6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 1.94 (sc, 4H, CH₂(α) (=)), 1.56 (sc, 2H, CH₂(β) (OMOM)), 1.23 (sa, 18H, CH₂), 0.85 (t, *J*=7 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 130.6, 130.1 (CH=), 96.3 (O-CH₂-O), 67.9 (O-CH₂), 55.0 (O-CH₃), 34.7 (CH₂(α) (=)), 32.6 (CH₂(α) (=)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.1 (CH₂), 26.2 (CH₂(γ) (OMOM)), 22.7 (CH₂-CH₃), 13.6 (CH₃)

IR (film)/ν: 2926, 2855, 2768, 1465, 1386, 1215, 1149, 1112, 1046, 967, 920 cm⁻¹

5.1.7.2 Formació dels àcids 36b, 37b i 38b

Seguint el mateix procediment emprat per a l'obtenció de **36a**, el tractament de 300 mg (1.2 mmol) de **33b**, amb 17.5 mL d'HCl-MeOH al 10%, forniren 237.7 mg d'un cru que és dissol en 6 mL d'acetona i es tractat amb el reactiu de Jones (15 mg (0.2 mmol) de CrO₃, 0.8 mL d'H₂O, 100 µL d'H₂SO₄ concentrat). S'obtenen 260 mg (1.2 mmol, 99% de rendiment) de l'àcid (*Z*)-12-tetradecenoic, **36b**.

Seguint aquest procés, 300 mg (1.1 mmol) de **34b**, 16.5 mL d'HCl-MeOH al 10% forniren 232.3 mg d'un cru que es tractà amb una solució del reactiu de Jones recient preparada (104 mg (1 mmol) de CrO₃, 729 µL d'H₂O, 91 µL d'H₂SO₄ concentrat, 6 mL d'acetona), tot obtenint 228.1 mg (0.9 mmol, 93% de rendiment) de (*E*)-12-pentadecenoic, **37b**.

Anàlogament, 300 mg (1 mmol) de **35b**, 15.5 mL d'HCl-MeOH al 10% forniren 245.3 mg d'un cru que es tractà amb una solució del reactiu de Jones recient preparada (102.5 mg (1 mmol) de CrO₃, 713 µL d'H₂O, 89 µL d'H₂SO₄ concentrat, 6 mL d'acetona), tot obtenint 243.2 mg (1 mmol, 94% de rendiment) de (*E*)-12-hexadecenoic, **38b**.

Àcid (*E*)-12-tetradecenoic, **36b**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.39 (sc, 2H, CH=CH), 2.32 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.94 (sc, 2H, CH₂ (α) (=)), 1.61 (sc, 5H, CH₂ (β) (COOH) i CH₃), 1.24 (sa, 14H, CH₂)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 179.1 (COOH), 131.6 (CH=), 124.5 (CH=), 33.9 (CH₂-COOH), 32.6 (CH₂ (α) (=)), 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0 (CH₂), 24.7 (CH₂ (β) (COOH)), 17.9 (CH₃)

IR (film)/ν: 2400-3500, 3026, 2924, 2855, 1702, 1466, 1437, 1376, 1115, 1057, 965, 722 cm⁻¹

Àcid (*E*)-12-pentadecenoic, **37b**

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 5.39 (sc, 2H, CH=CH), 2.33 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.96 (sc, 4H, CH₂ (α) (=)), 1.61 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOH)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 0.94 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 179.2 (COOH), 131.9 (CH=), 129.4 (CH=), 33.9 (CH₂-COOH), 32.5 (CH₂ (α) (=)), 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0 (CH₂), 25.6, 24.7 (CH₂ (β) (COOH) i CH₂ (α) (=)), 13.9 (CH₃)

IR (film)/ ν : 2400-3500, 3026, 2925, 2854, 1704, 1463, 1374, 1057, 965, 721 cm^{-1}

Àcid (E)-12-pentadecenoic, 38b

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 5.37 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 1.94 (sc, 4H, CH_2 (α) (=)), 1.61 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOH)), 1.25 (sa, 16H, CH_2), 0.86 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 177.5 (COOH), 130.5, 130.1 ($\text{CH}=\text{}$), 34.7, 33.8 (CH_2 (α) (=)), 32.6 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$), 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0 (CH_2), 24.7 (CH_2 (β) (COOH)), 22.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 13.6 (CH_3)

IR (film)/ ν : 2400-3500, 2926, 2854, 1704, 1465, 1377, 1057, 967, 721 cm^{-1}

5.1.7.3 Esterificació dels àcids 36b, 37b i 38b

Se segueix el procediment descrit per a l'obtenció de **39a**, es tracten 259.7 mg (1.1 mmol) de l'àcid **36b**, amb 296.5 μL (2.3 mmol) de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ i 948 μL de MeOH, tot obtenint 146.5 mg (0.6 mmol, 53% de rendiment) de (*E*)-12-tetradecenoat de metil, **39b**.

Seguint aquest procés, 228.1mg (1mmol) de l'àcid (*E*)-12-pentadecenoic, **37b**, 245 μL (2 mmol) de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ i 782 μL de MeOH forniren 149.7 mg (0.6 mmol, 62% de rendiment) de (*E*)-12-pentadecenoat de metil, **40b**.

Anàlogament, 243.2 mg (1 mmol) de **38b**, 257 μL (2 mmol) de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ i 819 μL de MeOH forniren 161.9 mg (0.6 mmol, 63% de rendiment) de (*E*)-12-hexadecenoat de metil, **41b**.

(E)-12-tetradecenoat de metil, 39b

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 5.39 (sc, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.64 (s, 3H, Me), 2.27 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOMe}$), 1.93 (sc, 2H, CH_2 (α) (=)) 1.60 (sc, 5H, CH_2 (β) (COOMe) i CH_3), 1.23 (sa, 14H, CH_2)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 174.3 (COOMe), 131.6 ($\text{CH}=\text{}$), 124.5 ($\text{CH}=\text{}$), 51.4 (Me), 34.1 (CH_2 (α) (=)), 32.6 (CH_2 (α) (COOMe)), 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.2, 29.1 (CH_2), 24.9 (CH_2 (β) (COOMe)), 17.9 (CH_3)

IR (film)/ ν : 3020, 2926, 2853, 1743, 1461, 1437, 1362, 1246, 1196, 1171, 1115, 1015, 966, 723 cm^{-1}

(E)-12-pentadecenoat de metil, **40b**

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 5.39 (sc, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOMe}$), 1.94 (sc, 2H, CH_2 (α) (=)), 1.59 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOMe)), 1.23 (sa, 14H, CH_2), 0.93 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 174.3 (COOMe), 131.8 ($\text{CH}=\text{}$), 129.3 ($\text{CH}=\text{}$), 51.4 (Me), 34.1 (CH_2 (α) (=)), 32.5 (CH_2 (α) (COOMe)), 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 29.1 (CH_2), 25.6, 24.9 (CH_2 (β) (COOMe)), 13.9 (CH_3)

IR (film)/ ν : 3020, 2929, 2855, 1743, 1461, 1436, 1366, 1248, 1197, 1170, 1115, 1014, 965, 720 cm^{-1}

(E)-12-hexadecenoat de metil, **41b**

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 5.36 (sc, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOMe}$), 1.93 (sc, 4H, CH_2 (α) (=)), 1.59 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOMe)), 1.23 (sa, 16H, CH_2), 0.86 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ : 174.3 (COOMe), 130.5, 130.1 ($\text{CH}=\text{}$), 51.4 (Me), 34.7, 34.1 (CH_2 (α) (=)), 32.6 (CH_2 (α) (COOMe)), 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (CH_2), 24.9 (CH_2 (β) (COOMe)) 22.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 16.6 (CH_3)

IR (film)/ ν : 3020, 2926, 2854, 1745, 1465, 1439, 1380, 1363, 1251, 1197, 1170, 1119, 1099, 1012, 967, 722 cm^{-1}

5.1.7.4 Formació dels ciclopropans **42b**, **43b** i **44b**

Se segueix el procediment descrit per a l'obtenció de **42a**, es tracten 125 mg (0.5 mmol) de *(E)*-12-tetradecanoat de metil, **39b**, en 1.6 mL (1.6 mmol) de Et_2Zn , 189 μL (2.3 mmol) de CH_2I_2 i 6.3 mL de CH_2Cl_2 , tot fornint 111.7 mg (0.4 mmol, 94% de rendiment) de 11-(*trans*-2-metilciclopropil)undecanoat de metil, **42b**.

Seguint aquest procés, 143.8 mg (0.6 mmol) de **40b**, 1.7 mL (1.7 mmol) de Et_2Zn (1 M), 205 μL (2.5 mmol) de CH_2I_2 i 6.8 mL de CH_2Cl_2 forniren 137.2 mg (0.5 mmol, 90% de rendiment) de 11-(*trans*-2-etilciclopropil)undecanoat de metil, **43b**.

Anàlogament, 152.2 mg (0.6 mmol) de **41b**, 1.8 mL (1.7 mmol) de Et₂Zn (1 M), 206 µL (2.6 mmol) de CH₂I₂ i 6.8 mL de CH₂Cl₂ forniren 145.1 mg (0.5 mmol, 91% de rendiment) de 11-(*trans*-2-propilciclopropil)undecanoat de metil, **44b**.

11-(trans-2-metilciclopropil)undecanoat de metil, 42b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOMe), 1.59 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOMe)), 1.24 (sa, 14H, CH₂), 1.15 (sc, 2H, CH₂ (α) (Δ)), 0.97 (d, *J*=6 Hz, 3H, CH₃), 0.36 (dd, *J*₁=*J*₂=8 Hz, *J*₃ = 2.0 Hz, 2H, CH (3) i 1 CH₂ *cis* (2)), -0.04 (dd, *J*₁=*J*₂=5.0 Hz, *J*₃=1.5 Hz, 2H, CH (1) i 1 CH₂ *trans* (2))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 174.4 (COOMe), 51.4 (Me), 34.2, 34.1 (CH₂-COOMe i CH₂ (α) (Δ)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (CH₂), 24.9 (CH₂ (β) (COOMe)), 19.9, 19.1 (CH₂ (2) i CH (3)), 12.8, 12.6 (CH (1) i CH₃)

IR (film)/ν: 3061, 2925, 2854, 1744, 1462, 1437, 1376, 1363, 1197, 1170, 1016 cm⁻¹

11-(trans-2-etilciclopropil)undecanoat de metil, 43b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOMe), 1.59 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOMe)), 1.23 (sa, 14H, CH₂), 1.11 (sc, 4H, CH₂ (α) (Δ)), 0.91 (t, *J*=7 Hz, 3H, CH₃), 0.32 (sc, 2H, CH (3) i 1 CH₂ *cis* (2)), 0.11 (sc, 2H, CH (1) i 1 CH₂ *trans* (2))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 174.4 (COOMe), 51.4 (Me), 34.3, 34.1 (CH₂-COOMe i CH₂ (α) (Δ)), 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (CH₂), 27.3 (CH₂ (β) (Δ)), 24.9 (CH₂ (β) (COOMe)), 20.6 (CH (3)), 18.6 (CH (1)), 13.8 (CH₃), 11.5 (CH₂ (2))

IR (film)/ν: 3060, 2991, 2924, 2853, 1745, 1464, 1438, 1375, 1255, 1199, 1171, 1112, 1021, 882, 805, 723 cm⁻¹

11-(trans-2-propilciclopropil)undecanoat de metil, 44b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 3.64 (s, 3H, Me), 2.28 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOMe), 1.61 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOMe)), 1.24 (sa, 20H, CH₂), 0.88 (t, *J*=7 Hz, 3H, CH₃), 0.35 (sc, 2H, CH (3) i 1 CH₂ *cis* (2)), 0.12 (sc, 2H, CH (1) i 1 CH₂ *trans* (2))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 174.4 (COOMe), 51.4 (Me), 36.5 (CH₂ (α) (Δ)), 34.3 (CH₂ (α) (Δ)), 33.9 (CH₂-COOMe), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (CH₂), 24.7

(CH₂ (β) (COOMe)), 22.8 (CH₂-CH₃), 19.7, 18.5 (CH (1) i CH (3)), 14.0 (CH₃), 11.7 (CH₂ (2))

IR (film)/ν: 3060, 2990, 2925, 2854, 1745, 1457, 1436, 1362, 1251, 1196, 1170, 1112, 1018, 721 cm⁻¹

5.1.7.5 Formació dels àcids 45b, 46b, 47b

Se segueix el procediment general descrit per a l'obtenció de **45a**, es tracten 111 mg (0.4 mmol) de 11-(trans-2-metilciclopropil)undecanoat de metil, **42b**, amb 0.9 mL de KOH/MeOH 2.5N i s'obtenen 97 mg (0.4 mmol, 93% de rendiment) de l'àcid 11-(trans-2-metilciclopropil)undecanoic, **45b**.

Seguint aquest procés, 137.2 mg (0.5 mmol) de **43b**, 1 mL de KOH/MeOH 2.5N forniren 92.9 mg (0.4 mmol, 72% de rendiment) de l'àcid 11-(trans-2-etilciclopropil)undecanoic, **46b**.

Anàlogament, 145.1 mg (0.5 mmol) de **44b** i 1.1 mL de KOH/MeOH 2.5N forniren 97.2 mg (0.4 mmol, 70% de rendiment) de l'àcid 11-(trans-2-propilciclopropil)undecanoic, **47b**.

Àcid 11-(trans-2-metilciclopropil)undecanoic, 45b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 2.33 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.61 (sc, 2H, CH₂ (β) (COOH)), 1.24 (sa, 14H, CH₂), 0.98 (d, *J*=6 Hz, 3H, CH₃), 0.26-0.47 (sc, 2H, CH (3) i 1 CH₂_{trans} (2)), 0.05-0.15 (sc, 2H, CH (1) i 1 CH₂_{trans} (2))

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ: 179.9 (COOH), 34.2, 34.0 (CH₂-COOH i CH₂(α) (Δ)), 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.0 (CH₂), 24.7 (CH₂(β) (Δ)), 19.9 (CH₃), 19.1 (CH (1)), 12.9, 12.6 (CH (3) i CH₂ (2))

IR (film)/ν: 2400-3500, 3061, 2990, 2925, 2854, 1708, 1463, 1361, 1248, 1197, 1170, 1116, 1018, 722 cm⁻¹

Àcid 11-(trans-2-etilciclopropil)undecanoic, 46b

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 2.33 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH₂-COOH), 1.61 (sc, 2H, CH₂(β) (COOH)), 1.25 (sa, 14H, CH₂), 1.12 (sc, 4H, CH₂(α) (Δ)), 0.91 (t, *J*=7 Hz, 3H, CH₃), 0.32 (sc, 2H, CH (3) i 1 CH₂_{trans} (2)), 0.11 (sc, 2H, CH (1) i 1 CH₂_{trans} (2))

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 180.0 (COOH), 34.3, 34.0 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$ i CH_2 (α) (Δ)), 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.0 (CH_2), 27.3 (CH_2 (β) (Δ)), 24.7 (CH_2 (β) (COOH)), 20.6 (CH (3)), 18.6 (CH (1)), 13.8 (CH_3), 11.5 (CH_2 (2))

IR (film)/v: 2400-3500, 3060, 2991, 2853, 1705, 1464, 1438, 1375, 1255, 1199, 1171, 1112, 1021, 882, 723 cm^{-1}

Àcid 11-(trans-2-propilciclopropil)undecanoic, 47b

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ : 2.33 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 1.61 (sc, 2H, CH_2 (β) (COOH)), 1.24 (sa, 20H, CH_2), 0.88 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3), 0.35 (sc, 2H, CH (3) i 1 CH_2 *trans* (2)), 0.12 (sc, 2H, CH (1) i 1 CH_2 *trans* (2))

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 179.6 (COOH), 36.5 (CH_2 (α) (Δ)), 34.3 (CH_2 (α) (Δ)), 33.9 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (CH_2), 24.7 (CH_2 (β) (COOH)), 22.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 19.7, 18.5 (CH (1) i CH (3)), 14.0 (CH_3), 11.7 (CH_2 (2))

IR (film)/v: 2400-3500, 3060, 2990, 2925, 2854, 1708, 1457, 1436, 1362, 1251, 1196, 1170, 1112, 1018, 721 cm^{-1}

5.1.8 Síntesi d'anàlegs d'esfingolípid

5.1.8.1 Síntesi de l'èster metílic de la L-Serina, 52

En un matràs de tres boques de 250 mL, proveït d'agitació magnètica, refrigerant Dimroth i embut d'addició de pressió compensada, es disposen 130 mL de MeOH. Es refreda el matràs a 0 °C i s'afegeixen 20.3 mL (285.7 mmol) de CH_3COCl gota a gota, durant 15 min. La dissolució es deixa en agitació durant 5 min a temperatura ambient, després dels quals s'addicionen d'un cop 10 g (95.2 mmol) de L-Serina i s'escalfa el sistema a reflux durant 2 h. Transcorregut aquest temps es refreda el sistema i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda obtenint un sòlid blanc que s'utilitza en el pas següent de la síntesi sense cap purificació. En aquestes condicions s'obtenen 14 g (90.0 mmol) de l'èster de L-Serina, **52**, amb un 95 % de rendiment.

RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ : 3.85 (s, 3H, OMe); 3.94 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.02 (dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.15 (t, $J=4.0$ Hz, 1H, CH-NH₂) ppm

5.1.8.2 Síntesi del (S)-2-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-3-hidroxiopropionat de metil, 53

En un matràs de 250 mL, proveït d'agitació magnètica es disposen 5 g (32.1 mmol) de **52**, que es dissolen en 31 mL d'H₂O. S'addicionen, a 0 °C, 9.7 g (70.2 mmol) de K₂CO₃ dissolts en 15.4 mL d'H₂O i 62 mL de dioxà. Seguidament, s'afegeixen, a poc a poc, 7.6 g de Fmoc-Cl (29.2 mmol). Un cop finalitzada l'addició s'agita durant 4 h a 0 °C. Passat aquest temps, s'afegeixen 200 mL d'H₂O. La dissolució resultant es renta amb Et₂O, s'acidifica amb HCl 1 N a pH 2-3, i s'extreu amb AcOEt. La fase orgànica es renta amb H₂O, s'asseca sobre MgSO₄ anh. i s'evapora a pressió reduïda. Un cop evaporat el dissolvent, el cru es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb un gradient d'hexà/AcOEt. En aquestes condicions s'obtenen 9.5 g (27.9 mmol) de NH-Fmoc de l'amina de l'èster metílic de la L-Serina, **52**, amb un 87 % de rendiment.

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD), δ : 3.74 (s, 3H, OMe); 3.81 (dd, $J_1=11.0$ Hz, $J_2=4.0$ Hz, 1H, CH₂-OH); 3.88 (dd, $J_1=11.0$ Hz, $J_2=5.0$ Hz, 1H, CH₂-OH); 4.21 (t, $J=7.0$ Hz, 1H, CH(Fmoc)); 4.32 (sc, 3H, CH₂(Fmoc) i CH-NH); 7.28 – 7.41 (sc, 4H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.67 (dd, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=4.0$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.79 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD), δ : 172.7 (C=O-OMe); 158.6 (C=O(Fmoc)); 145.2 (C₈); 142.6 (C₁₃), 128.8; 128.2; 126.3; 120.9 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂); 68.2 (CH₂(Fmoc)); 62.9 (CH₂-OH); 57.9 (CH-NH); 52.8 (OMe); 48.3 (C₇) ppm

IR (film)/ ν : 3409, 3054, 2948, 1717, 1525, 1448, 1219, 1074, 747 cm⁻¹

5.1.8.3 Síntesi del (S)-N-metoxi-N-metil-2-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-3-hidroxiopropionamida, 54

En un matràs de tres boques de 500 mL, proveït d'agitació magnètica, atmosfera d'argó i refrigerant Dimroth, es disposen 9.2 g (93.8 mmol) del clorhidrat de la N,O-dimetilhidroxilamina dissolts en 120 mL de CH₂Cl₂. Seguidament, s'addicionen, a 0 °C, 43.4 mL de Me₃Al 2 M (86.8 mmol) i es deixa reaccionar durant 30 min. a temperatura ambient. A continuació, s'afegeixen, gota a gota i a 0 °C, 8 g (23.5 mmol) de **52** dissolts en 80 mL de CH₂Cl₂. Un cop finalitzada l'addició, s'escalfa a reflux durant 16 h. Es finalitza la reacció addicionant el cru de reacció sobre 240 mL de HCl 1

N a 0 °C i s'extreu el producte amb CH₂Cl₂. La fase orgànica es renta amb amb H₂O, s'asseca sobre MgSO₄ anh. i s'evapora a pressió reduïda. Un cop evaporat el dissolvent, el cru es purifica cristal·litzant amb MeOH. En aquestes condicions s'obtenen 9.5 g (25.7 mmol) de N-metoxi-N-metil-2-(9-fluorenilmetoxicarbonilamino)-3-hidroxiopropionamida, **54**, amb un 78 % de rendiment.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), **δ**: 3.21 (s, 3H, N-Me); 3.75 (s, 3H, N-OMe); 3.85 (t, *J*=5.0 Hz, 2H, CH₂-OH); 4.19 (t, *J*=7.0 Hz, 1H, CH(Fmoc)); 4.36 (d, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂(Fmoc)); 4.86 (sa, 1H, CH-NH); 6.05 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, NH); 7.28 (tt, *J*₁=7.0 Hz, *J*₂=2.0 Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.37 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.58 (dd, *J*₁=7.0 Hz, *J*₂=3.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.73 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃), **δ**: 170.5 (C=O(amida)); 156.4 (C=O(Fmoc)); 143.7 (C₈); 141.2 (C₁₃), 127.6; 127.0; 125.1; 119.9 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂); 67.1 (CH₂(Fmoc)); 63.3 (CH₂-OH); 61.6 (CH-NH); 52.8 (N-OMe); 47.0 (C₇); 32.1 (N-Me) ppm

IR (film)/ν: 3415, 3321, 3065, 2943, 2893, 1715, 1654, 1526, 1450, 1250, 1057, 739 cm⁻¹

[α]²⁰_D = -5.1 (c=1, MeOH)

5.1.8.4 Síntesis del benzoat de *p*-nitrofenil, **59**

En un matràs de 50 mL, proveït d'agitació magnètica i atmosfera d'argó, es disposa el *p*-nitrofenol (5.5 g, 39 mmol) dissolt en Et₂O anh (18 mL). Seguidament, s'addiciona, a 0 °C, la piridina (6 mL) i es deixa reaccionar durant 10 min. a temperatura ambient. A continuació, s'afegeix, a 0 °C, el clorur de benzoil (4 mL, 35.7 mmol) dissolt en Et₂O anh (4.7 mL). Un cop finalitzada l'addició, s'agita durant 2 h a temperatura ambient. Passat aquest temps, es filtra el precipitat blanc i les aigües mares s'evaporen a pressió reduïda. S'ajunten les dues fraccions sòlides i es cristal·litzen en EtOH_{abs}, fornint 7.5 g (30.9 mmol) de benzoat de *p*-nitrofenil, **59**, amb un 86 % de rendiment.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), **δ**: 7.41 (dt, *J*₁=9.0 Hz, *J*₂=3.0 Hz, 2H, CH_{ar} (*m*-C=O)); 7.53 (t, *J*=8.0 Hz, 2H, CH_{ar} (*m*-NO₂)); 7.67 (sc, 1H, CH_{ar} (*p*-C=O)); 8.19 (sc, 2H, CH_{ar} (*o*-C=O)); 8.31 (dt, *J*₁=9.0 Hz *J*₂=3.0 Hz, 2H, CH_{ar} (*o*-NO₂)) ppm

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ : 164.2 (C=O); 155.7 (C-O); 145.1 (C- NO_2); 134.3 (C (*p*-C=O)); 130.3 (C (*o*-C=O)), 128.8 (C (*m*-C=O) i C (C=O)); 125.3 (C (*o*- NO_2)); 122.6 (C (*m*- NO_2)) ppm

IR (film)/ ν : 3119, 3090, 2959, 2927, 2853, 1745, 1615, 1516, 1347, 1265, 1208, 1068, 850, 720 cm^{-1}

5.1.8.5 Síntesi de la resina d'Ellman, e

En un tub *pyrex*[®] de 100 mL, proveït de tap de rosca, es disposen 5 g (Aldrich, 1.1 mmol/g) de resina Merrifield i es fan reaccionar durant 16 h, a temperatura ambient, amb 89 mL (17.5 mmol) d'una dissolució 0.2 M de la sal sòdica del 2-hidroximetil-3,4-dihidropirà en DMA (preparada per addició de 2 mL (17.5 mmol) de 2-hidroximetil-3,4-dihidropirà dissolts en 5 mL de THF anh. sobre una suspensió de 462 mg (19.3 mmol) de NaH en 25 mL de THF anh.; es deixa reaccionar durant 2 h a temperatura ambient i s'evapora el dissolvent a pressió reduïda). Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb CH_2Cl_2 (3 x 6 mL), DMF/ H_2O (1:1) (3 x 6 mL), DMF (3 x 6 mL), THF (3 x 6 mL) i CH_2Cl_2 (3 x 6 mL) i s'asseca, obtenint 5.0 g (0.94 mmol/g) de la resina d'Ellman, e.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ : 162,4 (C); 147,6 (C=O(Fmoc)); 143,7 (C_1); 127,9 ($\text{C}_{\text{poliestirè}}$); 100,4 (C_2); 73,9 (C_6); 73,2(C); 73,2 (C); 72,3 (C); 67,8 (C_7); 53,3 (C); 45,8; 43,6 ($\text{C}_{\text{poliestirè}}$); 40,3 (C_4); 25,5 (C); 24,5 (C_3); 19,3 (C) ppm

IR (KBr)/ ν : 3415, 3321, 3065, 2943, 2893, 1715, 1654, 1526, 1450, 1250, 1057, 739 cm^{-1}

5.1.8.6 Ancoratge i desanclatge de l'amida de Weinreb 54 a la resina d'Ellman, e

5.1.8.6.1 Ancoratge

En un matràs de 100 mL, proveït d'agitació mecànica i atmosfera d'argó, es disposen 2 g de resina d'Ellman, e, 4.2 g (11.3 mmol) d'amida de Weinreb, **54**, i 1 g (5.6 mmol) de PPTS. Seguidament, s'addicionen 25 mL de DCE i es deixa reaccionar durant 16 h a 80 °C. Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb

CH₂Cl₂ (3 x 6 mL), DMF/H₂O (1:1) (3 x 6 mL), DMF (3 x 6 mL), THF (3 x 6 mL) i CH₂Cl₂ (3 x 6 mL) i s'asseca, obtenint 2.5 g de la resina amida de Weinreb, **e54**.

Càrrega: 0.65 mmol/g

RMN de ¹H-HRMAS (500 MHz) δ : 3.33 (s, N-Me); 3.86 (s, N-OMe); 4.10 (s, CH₂-OH); 4.37 (s, CH(Fmoc)); 4.52 (s, CH₂(Fmoc)); 5.07 (s, CH-NH); 7.19 (sa, CH_{ar}(Fmoc) i poliestirè); 7.42 (sa, CH_{ar}(Fmoc)); 7.75 (s, CH_{ar}(Fmoc)); 7.86 (s, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃, fase gel), δ : 170.2 (C=O(amida); 155.9 (C=O(Fmoc)); 143.6 (C₈); 141.1 (C₁₃); 127.5; 125.1; 119.8 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C_{poliestirè}); 101.9, 97.8, 97.0, 73.9, 73.1, 68.2 (C_{resina}); 67.8 (CH₂(Fmoc)); 66.9 (CH₂-OH); 61.3 (CH-NH); 53.3 (N-OMe); 51.3 (C_{resina}); 46.9 (CH(Fmoc)); 43.6 (C_{poliestirè}); 40.2, 36.3 (C_{resina}); 32.1 (N-Me); 29.3, 27.3, 25.5, 17.5 (C_{resina}) ppm

IR (KBr)/ ν : 3655, 3433, 3320, 3083, 3016, 2923, 2851, 1944, 1877, 1805, 1712, 1681, 1604, 1485, 1449, 1250, 903, 764 cm⁻¹

5.1.8.6.2 Desancoratge

Es disposen 100 mg de la resina **e54** en 3.2 mL de CH₂Cl₂/EtOH (2:1.2 mL). Seguidament, s'addicionen 2 mL de TFA i es deixa reaccionar durant 1h a temperatura ambient. Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb CH₂Cl₂ (3 x 6 mL), EtOH (3 x 6 mL), i CH₂Cl₂ (3 x 6 mL). La dissolució s'evapora a sequetat obtenint 24.1 mg de **54**.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 3.24 (s, 3H, N-Me); 3.77 (s, 3H, N-OMe); 3.89 (t, *J*=5.0 Hz, 2H, CH₂-OH); 4.21 (t, *J*=7.0 Hz, 1H, CH(Fmoc)); 4.38 (d, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂(Fmoc)); 4.89 (sa, 1H, CH-NH); 6.08 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, NH); 7.30 (tt, *J*₁=7.0 Hz, *J*₂=2.0 Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.39 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.60 (dd, *J*₁=7.0 Hz, *J*₂=3.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.75 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

5.1.8.7 Síntesi de les resines metilcetona, e55, hexilcetona, e60, octilcetona, e61, dodecilcetona, e62, i fenilcetona, e63

Per la síntesi de les diferents resines amb la funcionalitat cetona, es segueix el següent procediment experimental: En un tub *pyrex*[®] de 16 mL, proveït de tap de rosca i atmosfera d'argó, es disposa la resina de l'amida de Weinreb, e54, (1 g) en THF anh (8 mL). A continuació, s'addiciona l'organomagnesià corresponent (4.4 mmol) i es deixa reaccionar durant 16 h, a temperatura ambient. Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb CH₂Cl₂ (3 x 6 mL), DMF/H₂O (1:1) (3 x 6 mL), DMF (3 x 6 mL), THF (3 x 6 mL) i CH₂Cl₂ (3 x 6 mL) i s'asseca.

Seguint aquest procés 1.5 mL (4.4 mmol) de MeMgBr 3 M forniren 734.6 mg de resina metilcetona, e55.

Càrrega: 0.51 mmol/g

RMN de ¹H-HRMAS (500 MHz) δ : 2.44 (s, Me); 4.23 (s, CH₂-OH); 4.46 (s, CH(Fmoc)); 4.71 (s, CH₂(Fmoc)); 5.08 (s, CH-NH); 7.32 (sa, CH_{ar}(Fmoc) i poliestirè); 7.49 (sa, CH_{ar}(Fmoc)); 7.84 (s, CH_{ar}(Fmoc)); 7.95 (s, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃, fase gel), δ : 208.2 (C=O(cetona)); 170.2 (C=O(amida)); 154.4 (C=O(Fmoc)); 143.7 (C₈); 141.3 (C₁₃); 127.7; 127.1, 125.1; 119.9 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C_{poliestirè}); 101.9, 97.8, 97.7, 73.2, 68.7 (C_{resina}); 67.9 (CH₂(Fmoc)); 66.9 (CH₂-OH); 60.7 (CH-NH); 53.4 (C_{resina}); 47.2 (CH(Fmoc)); 43.6 (C_{poliestirè}); 40.4, 29.4 (C_{resina}); 27.3 (Me); 25.6, 21.5, 17.7 (C_{resina}) ppm

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2, es desancoren 100 mg de resina obtenint 16.6 mg de (S)-N-(1-hidroximetil-2-oxopropil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, 55.

RMN de ¹H (500 MHz, MeOD), δ : 2.17 (s, 3H, Me); 3.86 (ddd, $J_1=45.0$ Hz, $J_2=11.0$ Hz, $J_3=4.5$ Hz, 2H, CH₂-OH); 4.22 (dd, $J_1=13.0$ Hz, $J_2=4.5$ Hz, 1H, CH(Fmoc)); 4.23 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, CH-NH); 4.38 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.30 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.38 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.66 (dd, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.78 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

IR (film)/ ν : 3389, 2943, 2863, 1694, 1466, 1208, 1167, 810 cm⁻¹

Anàlogament, 1.1 mL (2.2 mmol) de hexilMgBr 2 M forniren 768 mg de resina hexilcetona, **e60**.

Càrrega: 0.53 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 20.9 mg de (S)-N-(1-hidroximetil-2-oxooctil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **60**.

RMN de ¹H (500 MHz, MeOD), δ : 0.88 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃); 1.28 (sa, 6H, CH₂); 1.56 (sc, 2H, CH₂ (β)); 2.53 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, CH₂ (α)); 3.83 (ddd, $J_1=33.5$ Hz, $J_2=11.5$ Hz, $J_3=5.0$ Hz, 2H, CH₂-OH); 4.23 (sc, 2H, CH(Fmoc) i CH-NH); 4.39 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.31 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.39 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.67 (dd, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.79 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc))
ppm

IR (film)/ ν : 3392, 2930, 2858, 1683, 1452, 1206, 1144, 802 cm⁻¹

Anàlogament, 1.1 mL (2.2 mmol) de octilMgBr 2 M forniren 746 mg de resina octilcetona, **e61**.

Càrrega: 0.54 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 22.8 mg de (S)-N-(1-hidroximetil-2-oxodecil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **61**.

RMN de ¹H (500 MHz, MeOD), δ : 0.87 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH₃); 1.27 (sa, 10H, CH₂); 1.55 (sc, 2H, CH₂ (β)); 2.53 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, CH₂ (α)); 3.83 (ddd, $J_1=33.0$ Hz, $J_2=11.0$ Hz, $J_3=5.0$ Hz, 2H, CH₂-OH); 4.23 (sc, 2H, CH(Fmoc) i CH-NH); 4.38 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.31 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.38 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.67 (dd, $J_1=7.0$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.79 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc))
ppm

IR (film)/ ν : 3393, 2926, 2855, 1682, 1204, 1142, 802 cm⁻¹

Anàlogament, 2.2 mL (2.2 mmol) de dodecilMgBr 1 M forniren 705 mg de resina dodecilcetona, **e62**.

Càrrega: 0.58 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 27.8 mg de (S)-N-(1-hidroximetil-2-oxotetradecil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **62**.

RMN de ¹H (500 MHz, MeOD), **δ**: 0.88 (t, *J*=6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.24 (sa, 18 H, CH₂), 1.54 (sc, 2H, CH₂ (β) (C=O)), 2.53 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, CH₂ (ω) (C=O)), 3.83 (ddd, *J*₁=33.0 Hz, *J*₂=11.5 Hz, *J*₃=5.0 Hz, 2H, CH₂(OH)), 4.23 (sc, 2H, CH(Fmoc) i CH(NH)); 4.37 (ddd, *J*₁=57.5 Hz, *J*₂=10.5 Hz, *J*₃=7.0 Hz, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.30 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.38 (t, *J*=8 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.66 (sc, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.78 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

IR (film)/ν: 3391, 2919, 2850, 1679, 1449, 1203, 1142, 801, 724cm⁻¹

Anàlogament, 666 μL (1.3 mmol) de fenilMgBr 2 M forniren 779 mg de resina fenilcetona, **e63**.

Càrrega: 0.52 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 20.1 mg de (S)-N-(1-hidroximetil-2-oxo-2-feniletil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **63**.

RMN de ¹H (500 MHz, MeOD), **δ**: 3.89 (ddd, *J*₁=60.5 Hz, *J*₂=11.5 Hz, *J*₃=5.0 Hz, 2H, CH₂(OH)), 4.20 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, CH(Fmoc)); 4.36 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 5.32 (t, *J*=4.5 Hz, 1H, CH(NH)); 7.28 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.36 (t, *J*=8 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.49 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(*m*-C=O)); 7.62 (sc, 3H, CH_{ar}(Fmoc) i CH_{ar}(*p*-C=O)); 7.75 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 8.00 (d, *J*=8.0 Hz, 2H, CH_{ar}(*o*-C=O)) ppm

IR (film)/ ν : 3392, 1681, 1449, 1204, 1142, 802, 723 cm^{-1}

5.1.8.8 Síntesi de les resines metilalcohol, e56, hexilalcohol, e65, octilalcohol, e66, dodecilalcohol, e67, i fenilalcohol, e68

Per la síntesi de les diferents resines amb la funcionalitat alcohol, es segueix el següent procediment experimental: En un tub *pyrex*[®] de 20 mL, proveït de tap de rosca i atmosfera d'argó, es disposa la corresponent cetona resina en THF anh (3 mL). A continuació, s'addiciona el $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ 0.4 M (10 mL, 4 mmol) i es deixa reaccionar durant 16 h, a temperatura ambient. Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb CH_2Cl_2 (3 x 6 mL), DMF/ H_2O (1:1) (3 x 6 mL), DMF (3 x 6 mL), THF (3 x 6 mL) i CH_2Cl_2 (3 x 6 mL) i s'asseca.

Seguint aquest procés, 800 mg de metilcetona resina, **e55**, forniren 732 mg de metilalcohol resina, **e56**.

Càrrega: 0.47 mmol/g

RMN de ^1H -HRMAS (500 MHz) δ : 1.42 (s, Me); 4.12 (s, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.40 (s, $\text{CH}(\text{Fmoc})$); 4.70 (s, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$); 5.04 (s, CH-NH); 7.25 (sa, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$ i poliestirè); 7.45 (sa, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$); 7.78 (s, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$); 7.90 (s, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$) ppm

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , fase gel), δ : 157.7 ($\text{C=O}(\text{Fmoc})$); 143.7, 141.2 (C_{ar}); 128.3 (C_{ar} i $\text{C}_{\text{poliestirè}}$); 97.8 (C_{resina}); 73.2 ($\text{CH}_2(\text{Fmoc})$); 68.7, 66.5 (CH_2 i CH-OH); 55.4 (CH-NH i C_{resina}); 47.3 (C_{resina}); 40.4 ($\text{CH}(\text{Fmoc})$ i C_{resina}); 29.6, 27.5, 20.2 (C_{resina}); 17.8 (Me) ppm

Amb TFA/ CH_2Cl_2 / EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 15.4 mg de (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **56**.

RMN de ^1H (500 MHz, MeOD), δ : 1.30 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, Me); 3.71 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.78 (sc, 1H, CH-OH); 4.21 (sc, 1H, $\text{CH}(\text{Fmoc})$); 4.37 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\text{Fmoc})$); 7.29 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$); 7.37 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$); 7.65 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$); 7.78 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{Fmoc})$) ppm

IR (film)/ ν : 3399, 2497, 1680, 1450, 1250, 1157, 800, 739 cm^{-1}

Anàlogament, 800 mg de **e60** forniren 716 mg de hexilalcohol resina, **e65**.

Càrrega: 0.47 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 18.8mg de (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetiloctil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **65**.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), **δ**: 0.89 (t, *J*=6.5 Hz, 3H, Me); 1.29 (sa, 8H, CH₂); 1.53 (sc, 2H CH₂ (*α*)); 3.56 (sc, 3H, CH₂-OH i CH-NH); 3.78 (sc, 1H, CH-OH); 4.22 (sc, 1H, CH(Fmoc)); 4.38 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.30 (t, *J*=7.0 Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.38 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.67 (d, *J*=6.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.79 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

IR (film)/ν: 3392, 2493, 1678, 1453, 1209, 1151, 802, 728 cm⁻¹

Anàlogament, 800 mg de **e61** forniren 716 mg de octilalcohol resina, **e66**.

Càrrega: 0.48 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 20.4 mg de (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **66**.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), **δ**: 0.88 (t, *J*=7.5 Hz, 3H, Me); 1.29 (sa, 12H, CH₂); 1.53 (sc, 2H CH₂ (*α*)); 3.55 (sc, 3H, CH₂-OH i CH-NH); 3.78 (sc, 1H, CH-OH); 4.22 (sc, 1H, CH(Fmoc)); 4.38 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.30 (t, *J*=7.0 Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.38 (t, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.67 (d, *J*=7.0 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.79 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

IR (film)/ν: 3401, 2504, 1674, 1451, 1209, 1149, 802, 727 cm⁻¹

Anàlogament, 800 mg de **e62** forniren 758 mg de dodecilalcohol resina, **e67**.

Càrrega: 0.55 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 26.5 mg de (S)-N-(2-hidroximetiltetradecil)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **67**.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ : 0.88 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, Me); 1.28 (sa, 20H, CH₂); 1.54 (sc, 2H CH₂ (α)); 3.55 (sc, 3H, CH₂-OH i CH-NH); 3.78 (sc, 1H, CH-OH); 4.22 (sc, 1H, CH(Fmoc)); 4.38 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 7.30 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.38 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.66 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.79 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)) ppm

IR (film)/v: 3368, 2916, 1670, 1150, 1205, 1147, 800, 727 cm⁻¹

Anàlegament, 800 mg de **e63** forniren 674 mg de fenilalcohol resina, **e68**.

Càrrega: 0.44 mmol/g

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2 es desancoren 100 mg de resina obtenint 17.1 mg de (S)-N-(2-hidroximetil-2-feniletíl)carbamat de 9H-fluoren-9-ilmetil, **68**.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ : 3.89 (sc, 2H, CH₂(OH)), 4.20 (sc, 2H, CH(Fmoc)); 4.36 (sc, 2H, CH₂(Fmoc)); 5.15 (sc, 1H, CH-OH); 5.31 (t, $J=4.5$ Hz, 1H, CH(NH)); 7.28 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.36 (t, $J=8$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 7.49 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(*m*-C=O)); 7.62 (sc, 3H, CH_{ar}(Fmoc) i CH_{ar}(*p*-C=O)); 7.76 (d, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_{ar}(Fmoc)); 8.01 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, CH_{ar}(*o*-C=O)) ppm

IR (film)/v: 3392, 2505, 1672, 1450, 1205, 1147, 973, 802, 726 cm⁻¹

5.1.8.9 Síntesi de les resines metilaminoalcohol, e57, hexilaminoalcohol, e69, octilaminoalcohol, e70, dodecilaminoalcohol, e71 i fenilaminoalcohol, e72 per desprotecció de les corresponents resines Fmoc

Per la síntesi de les diferents resines amb la funcionalitat aminoalcohol, es segueix el següent procediment experimental: En un tub pyrex[®] de 8 mL, proveït de tap de rosca, es disposa la metilalcohol resina corresponent. A continuació, s'addiciona

la piperidina 20% en DMF o CH₂Cl₂ (10 mL) i es deixa reaccionar durant 1 h, a temperatura ambient (es realitzen 2 cicles amb cada dissolvent). Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb DMF/CH₂Cl₂ (3 x 6 mL) i s'asseca.

Seguint aquest procés, 600 mg de **e56** forniren 514 mg de la resina metilaminoalcohol, **e57**.

Anàlogament, 600 mg de **e65** forniren 505 mg de la resina hexilaminoalcohol, **e69**.

Anàlogament, 600 mg de **e66** forniren 532 mg de la resina octilaminoalcohol, **e70**.

Anàlogament, 600 mg de **e67** forniren 514 mg de la resina dodecilaminoalcoholcetona, **e71**.

Anàlogament, 600 mg de **e68** forniren 551 mg de la resina fenilaminoalcohol, **e72**.

Aquestes resines són utilitzades directament, sense cap més tractament, en la següent reacció.

5.1.8.10 Acilacions de les amines de les resines e57, e69 - e72 i desancoratge amb TFA

Per les acilacions de les diferents aminoalcohol resines, es segueix el següent procediment experimental: En un tub *pyrex*[®] de 8 mL, proveït de tap de rosca, es disposa la resina aminoalcohol corresponent en THF anh (2 mL). A continuació, s'addiciona l'AcONa 50% (2.4 mL) i es deixa en agitació durant 10 min, a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'afegeix l'agent acilant corresponent (1.0 mmol) dissolt en THF anh (2 mL) i es deixa reaccionar durant 16 h a temperatura ambient. Un cop finalitzada la reacció, la resina es filtra, es renta amb NaOH 10% (6 x 3 mL) DMF (10 x 3 mL), EtOH (4 x 6 mL), THF (6 x 6 mL) i CH₂Cl₂ (6 x 6 mL) i s'asseca.

Amb TFA/CH₂Cl₂/EtOH (2:2:1.2 mL), d'acord amb el mètode general descrit en l'apartat 5.1.8.6.2, es desancora el producte de la resina.

5.1.8.10.1 Clorur de benzoil com agent acilant

Seguint el procés descrit anteriorment, 190 mg de resina metilaminoalcohol, **e57** i 120 μL (1.0 mmol) de clorur de benzoil forniren 31 mg de (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)benzamida, **58**.

Resina e57:

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , fase gel), δ : 167.7 (C_{amida}); 128.29 (C_{ar} i $C_{\text{poliestirè}}$); 97.7, 72.9 (C_{resina}); 68.5, 68.3 (CH_2 i CH-OH); 53.3 (CH-NH i C_{resina}); 40.3, 29.2, 27.0, 20.2 (C_{resina}); 17.5 (Me) ppm

Benzamida 58:

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 1.33 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, Me); 3.71 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.78 (sc, 1H, CH-OH); 7.53 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.95 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 353 (M^+ , 1), 338 (M-15, 28), 250 (A, 43), 309 (46), 236 (B, 55), 219 (67), 187 (85), 146 (94), 195 (82), 73 (100)

Anàlogament, 190 mg de resina hexilaminoalcohol, **e69**, i 120 μL (1.0 mmol) de clorur de benzoil forniren 41 mg de (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetiloctil)benzamida, **73**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.88 (t, $J=6.0$ Hz, 3H, CH_3); 1.30 (sa, 6H, CH_2); 1.51 (sc, 2H, CH_2 (α)); 3.83 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 4.12 (sc, 1H, CH-OH); 7.46 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.54 (sc, 1H, CH_{ar}); 7.81 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 423 (M^+ , 1), 408 (M-15, 30), 320 (A, 46), 309 (48), 236 (B, 54), 219 (66), 187 (78), 146 (94), 105 (84), 73 (100)

Anàlogament, 200 mg de resina octilaminoalcohol, **e70**, i 127 μL (1.0 mmol) de clorur de benzoil forniren 53 mg de (*S*)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)benzamida, **74**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.87 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, Me); 1.29 (sa, 12H, CH_2); 1.50 (sc, 2H CH_2 (α)); 3.76 (sc, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3.85 (sc, 1H, CH-NH); 4.12 (sc, 1H, CH-OH); 7.46 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.53 (sc, 1H, CH_{ar}); 7.81 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 451 (M^+ , 1), 436 (M-15, 22), 348 (A, 30), 309 (38), 236 (B, 56), 219 (80), 178 (82), 147 (100), 105 (96), 73 (98)

Anàlogament, 160 mg de resina dodecilaminoalcohol, **e71**, i 101 μ L (1.0 mmol) de clorur de benzoil forniren 35 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiltetradecil)benzamida, **75**.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.89 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, Me); 1.29 (sa, 12H, CH_2); 1.50 (sc, 2H CH_2 (α)); 3.75 (sc, 2H, CH_2 -OH); 3.84 (sc, 1H, CH -NH); 4.12 (sc, 1H, CH -OH); 7.46 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.53 (sc, 1H, CH_{ar}); 7.81 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 507 (M^+ , 1), 492 (M-15, 18), 404 (A, 27), 309 (43), 271 (67), 236 (B, 47), 219 (80), 178 (77), 147 (100), 105 (91), 73 (99)

Anàlogament, 160 mg de resina fenilaminoalcohol, **e72**, i 101 μ L (1.0 mmol) de clorur de benzoil forniren 30 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetil-2-feniletíl)benzamida, **76**.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 3.86 (sc, 2H, CH_2 -OH); 4.37 (sc, 1H, CH -NH); 4.90 (sc, 1H, CH -OH); 7.25 (sc, 5H, CH_{ar}); 7.45 (sc, 4H, CH_{ar}); 7.55 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.82 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 415 (M^+ , 1), 400 (M-15, 11), 312 (A, 10), 309 (38), 236 (B, 86), 219 (45), 179 (72), 105 (100), 73 (78)

5.1.8.10.2 Clorur de 4-heptilbenzoil com agent acilant

Seguint el procés descrit anteriorment, 220 mg de resina metilaminoalcohol, **e57**, i 286.0 μ L (1.0 mmol) del clorur de 4-heptilbenzoil forniren 50 mg de (S)-4-heptil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)benzamida, **77**.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.89 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3); 1.24 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, Me); 1.32 (sc, 8H, CH_2); 1.63 (sc, 2H, CH_2 (β fenil)); 2.66 (sc, 2H, CH_2 (α fenil)); 3.71 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH -NH); 3.78 (sc, 1H, CH -OH); 7.27 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.76 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 451 (M^+ , 1), 436 (M-15, 29), 348 (A, 45), 334 (B, 63), 245 (70), 218 (55), 203 (100), 117 (61), 73 (72)

Anàlogament, 198 mg de resina hexilaminoalcohol, **e69**, i 258 μ L (1.0 mmol) del clorur de 4-heptilbenzoil forniren 56 mg de (S)-4-heptil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiloctil)benzamida, **78**.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.88 (t, $J=6.5$ Hz, 6H, CH_3); 1.31 (sa, 16H, CH_2); 1.53 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.63 (sc, 2H, CH_2 (β fenil)); 2.66 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2 (α fenil)); 3.73 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH -NH); 4.10 (sc, 1H, CH -OH); 7.27 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.76 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 521 (M^+ , 1), 506 (M-15, 15), 418 (A, 26), 334 (B, 50), 245 (90), 218 (64), 203 (100), 187 (78), 73 (96)

Anàlogament, 393 mg de resina octilaminoalcohol, **e70**, i 511 μ L (1.0 mmol) del clorur de 4-heptilbenzoil forniren 109 mg de (S)-4-heptil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)benzamida, **79**.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.88 (t, $J=6.5$ Hz, 6H, CH_3); 1.29 (sa, 20H, CH_2); 1.53 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.63 (sc, 2H, CH_2 (β fenil)); 2.65 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, CH_2 (α fenil)); 3.78 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH -NH); 4.11 (sc, 1H, CH -OH); 7.27 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.76 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 549 (M^+ , 1), 534 (M-15, 10), 446 (A, 16), 334 (B, 38), 245 (92), 218 (50), 203 (100), 73 (95)

Anàlogament, 313 mg de resina dodecilaminoalcohol, **e71**, i 407 μ L (1.0 mmol) del clorur de 4-heptilbenzoil forniren 86 mg de (S)-4-heptil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiltetradecil)benzamida, **80**.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.88 (t, $J=7.0$ Hz, 6H, CH_3); 1.26 (sa, 28H, CH_2); 1.49 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.63 (sc, 2H, CH_2 (β fenil)); 2.65 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2 (α fenil)); 3.73 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH -NH); 4.11 (sc, 1H, CH -OH); 7.26 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.76 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 605 (M^+ , 1), 590 (M-15, 10), 502 (A, 17), 334 (B, 44), 245 (99), 218 (100), 203 (100), 73 (83)

Anàlogament, 220 mg de resina fenilaminoalcohol, **e72**, i 286 μ L (1.0 mmol) del clorur de 4-heptilbenzoil forniren 83 mg de (S)-4-heptil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetil-2-fenetil)benzamida, **81**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.88 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3); 1.31 (sa, 8H, CH_2); 1.59 (sc, 2H CH_2 (β fenil)); 2.62 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2 (α fenil)); 3.86 (sc, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.37 (sc, 1H, CH-NH); 4.90 (sc, 1H, CH-OH); 7.25 (sc, 5H, CH_{ar}); 7.45 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.57 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 513 (M^+ , 1), 498 (M-15, 10), 410 (A, 6), 334 (B, 88), 203 (100), 179 (72), 91 (56), 73 (72)

5.1.8.10.3 Clorur d'isovaleril com agent acilant

Seguint el procés descrit anteriorment, 190 mg de la resina metilaminoalcohol, **e57**, i 127 μ L (1.0 mmol) de clorur d'isovaleril forniren 34 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)-3-metilbutiramida, **82**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.96 (sc, 6H, CH_3 (isopropil)); 1.16 (sc, 3H, Me); 2.10 (sc, 3H, CH_2 (isopropil) i CH (isopropil)); 3.62 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.80 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 333 (M^+ , 1), 318 (M-15, 32), 289 (20), 230 (A, 56), 216 (B, 72), 184 (38), 157 (60), 127 (83), 117 (88), 73 (100)

Anàlogament, 190 mg de la resina hexilaminoalcohol, **e69**, i 127 μ L (1.0 mmol) de clorur d'isovaleril forniren 39 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiloctil)-3-metilbutiramida, **83**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3); 0.96 (sc, 6H, CH_3 (isopropil)); 1.31 (sa, 8H, CH_2); 1.54 (sc, 2H, CH_2 (α)); 2.10 (sc, 3H, CH_2 (isopropil) i CH (isopropil)); 3.64 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.82 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 403 (M^+ , 1), 388 (M-15, 34), 300 (A, 48), 289 (54), 216 (B, 54), 187 (90), 157 (66), 127 (69), 103 (58), 73 (100)

Anàlogament, 200 mg de la resina octilaminoalcohol, **e70**, i 133 μ L (1.0 mmol) de clorur d'isovaleril forniren 52 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)-3-metilbutiramida, **84**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, CH_3); 0.95 (sc, 3H, CH_3 (isopropil)); 1.30 (sa, 10H, CH_2); 1.44 (sc, 2H CH_2 (α)); 2.10 (sc, 3H, CH_2 (isopropil) i CH (isopropil)); 3.64 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.81 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 431 (M^+ , 1), 416 (M-15, 31), 328 (A, 40), 289 (60), 216 (B, 58), 215 (87), 184 (58), 157 (70), 127 (79), 103 (59), 73 (100)

Anàlogament, 160 mg de la resina dodecilaminoalcohol, **e71**, i 106 μ L (1.0 mmol) de clorur d'isovaleril forniren 37 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiltetradecil)-3-metilbutiramida, **85**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.88 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, CH_3); 0.94 (sc, 3H, CH_3 (isopropil)); 1.29 (sa, 10H, CH_2); 1.44 (sc, 2H CH_2 (α)); 2.10 (sc, 3H, CH_2 (isopropil) i CH (isopropil)); 3.66 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.81 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 487 (M^+ , 1), 472 (M-15, 24), 384 (A, 34), 289 (70), 271 (82), 216 (B, 45), 199 (62), 157 (75), 127 (86), 103 (57), 73 (100)

Anàlogament, sobre 160 mg de la resina fenilaminoalcohol, **e72**, i 106 μ L (1.1 mmol) de clorur d'isovaleril forniren 25 mg de (S)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetil-2-fenetil)-3-metilbutiramida, **86**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.96 (sc, 3H, CH_3 (isopropil)); 2.12 (sc, 3H, CH_2 (isopropil) i CH (isopropil)); 3.86 (sc, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.37 (sc, 1H, CH-NH); 4.90 (sc, 1H, CH-OH); 7.46 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.53 (sc, 1H, CH_{ar}); 7.81 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 395 (M^+ , 1), 380 (M-15, 18), 292 (A, 46), 289 (50), 216 (B, 92), 179 (95), 131 (100), 73 (98)

5.1.8.10.4 Clorur de 3-ciclopentilpropionil com agent acilant

Seguint el procés descrit anteriorment, 190 mg de la resina metilaminoalcohol, **e57** i 160 μL (1.0 mmol) de clorur de 3-ciclopentilpropionil forniren 25.5 mg de (*S*)-3-ciclopentil-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)propionamida, **87**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 1.12 (sc, 2H, CH_2 (β amida)); 1.21 (d, $J=6$ Hz, 3H, Me); 1.63 (sc, 5H, 2 CH_2 (cicle) i CH (α -cicle)); 1.79 (sc, 4H, 2 CH_2 (cicle)); 2.25 (sc, 2H, $\text{CH}_{2(\alpha)}$ (amida)); 3.63 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.79 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 373 (M^+ , 1), 358 (M-15, 24), 270 (A, 50), 256 (B, 80), 217 (68), 167 (86), 157 (80), 132 (92), 117 (98), 73 (100)

Anàlogament, 190 mg de la resina hexilaminoalcohol, **e69**, i 160 μL (1.0 mmol) de clorur de 3-ciclopentilpropionil forniren 38 mg de (*S*)-3-ciclopentil-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetiloctil)propionamida, **88**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.90 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3); 1.12 (sc, 2H, CH_2 (β amida)); 1.32 (sa, 8H, CH_2); 1.43 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.63 (sc, 5H, 2 CH_2 (cicle) i CH (α -cicle)); 1.79 (sc, 4H, 2 CH_2 (cicle)); 2.25 (sc, 2H, $\text{CH}_{2(\alpha)}$ (amida)); 3.64 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.81 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 443 (M^+ , 1), 428 (M-15, 23), 340 (A, 29), 256 (B, 32), 247 (57), 217 (52), 187 (92), 157 (88), 132 (40), 116 (50), 73 (100)

Anàlogament, 200 mg de la resina octilaminoalcohol, **e70**, i 168 μL (1.0 mmol) de clorur de 3-ciclopentilpropionil forniren 42 mg de (*S*)-3-ciclopentil-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)propionamida, **89**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3); 1.12 (sc, 2H, CH_2 (β amida)); 1.29 (sa, 12H, CH_2); 1.54 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.63 (sc, 5H, 2 CH_2 (cicle) i CH (α -cicle)); 1.79 (sc, 4H, 2 CH_2 (cicle)); 2.25 (sc, 2H, $\text{CH}_{2(\alpha)}$ (amida)); 3.66 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.81 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 471 (M^+ , 1), 456 (M-15, 18), 368 (A, 24), 256 (B, 34), 247 (60), 215 (84), 157 (91), 132 (41), 116 (49), 73 (100)

Anàlogament, 160 mg de la resina dodecilaminoalcohol, **e71**, i 135 μ L (1.0 mmol) de clorur de 3-ciclopentilpropionil forniren 30 mg de (S)-3-ciclopentil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiltetradecil)propionamida, **90**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.90 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3); 1.13 (sc, 2H, CH_2 (β amida)); 1.29 (sa, 20H, CH_2); 1.54 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.64 (sc, 5H, 2 CH_2 (cicle) i CH (α -cicle)); 1.79 (sc, 4H, 2 CH_2 (cicle)); 2.30 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\alpha)$ (amida)); 3.65 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.80 (sc, 1H, CH-OH) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 527 (M^+ , 1), 512 (M-15, 14), 424 (A, 19), 271 (71), 256 (B, 28), 247 (59), 217 (46), 157 (97), 116 (42), 73 (100)

Anàlogament, 160 mg de la resina fenilaminoalcohol, **e72**, i 135 μ L (1.0 mmol) de clorur de 3-ciclopentilpropionil forniren 25 g de (S)-3-ciclopentil-N-(2-hidroxi-1-hidroximetil-2-fenetil)propionamida, **91**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 1.01 (sc, 2H, CH_2 (β amida)); 1.57 (sc, 2H CH_2 (α)); 1.67 (sc, 5H, 2 CH_2 (cicle) i CH (α -cicle)); 1.79 (sc, 4H, 2 CH_2 (cicle)); 2.07 (sc, 2H, $\text{CH}_2(\alpha)$ (amida)); 3.69 (sc, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.17 (sc, 1H, CH-NH); 5.02 (sc, 1H, CH-OH); 7.24 (sc, 5H, CH_{ar}); 7.31 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.40 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 435 (M^+ , 1), 420 (M-15, 16), 332 (A, 6), 256 (B, 98), 179 (99), 157 (58), 132 (90), 116 (66), 73 (100)

5.1.8.10.5 Clorur de 1-naftoil com agent acilant

Seguint el procés descrit anteriorment, 190 mg de la resina metilaminoalcohol, **e57**, i 156 μ L (1.0 mmol) de clorur d'1-naftoil forniren 35 mg de (S)-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)naftamida, **92**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 1.21 (d, $J=6$ Hz, 3H, Me); 3.65 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.82 (sc, 1H, CH-OH); 7.52 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.95 (sc, 3H, CH_{ar}); 8.20 (sc, 1H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 403 (M^+ , 1), 388 (M-15, 20), 300 (A, 19), 286 (B, 46), 217 (50), 197 (54), 155 (100), 127 (66), 117 (56), 73 (70)

Anàlogament, 190 mg de la resina hexilaminoalcohol, **e69**, i 156 μ L (1.0 mmol) de clorur d'1-naftoil forniren 38 mg de (*S*)-(2-hidroxi-1-hidroximetilooctil)naftamida, **93**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.91 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3); 1.34 (sa, 8H, CH_2); 1.62 (sc, 2H, CH_2 (α)); 3.75 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.92 (sc, 1H, CH-OH); 7.53 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.95 (sc, 3H, CH_{ar}); 8.21 (sc, 1H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 473 (M^+ , 1), 458 (M-15, 10), 370 (A, 11), 286 (B, 26), 256 (45), 217 (49), 197 (69), 155 (100), 127 (66), 73 (76)

Anàlogament, 200 mg de la resina octilaminoalcohol, **e70**, i 165 μ L (1.0 mmol) de clorur d'1-naftoil forniren 53 mg de (*S*)-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)naftamida, **94**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3); 1.29 (sa, 12H, CH_2); 1.61 (sc, 2H, CH_2 (α)); 3.79 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 4.23 (sc, 1H, CH-OH); 7.54 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.94 (sc, 3H, CH_{ar}); 8.21 (sc, 1H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 501 (M^+ , 1), 486 (M-15, 7), 398 (A, 5), 286 (B, 14), 197 (80), 155 (100), 127 (65), 73 (87)

Anàlogament, 160 mg de la resina dodecilaminoalcohol, **e71**, i 132 μ L (1.0 mmol) de clorur d'1-naftoil forniren 31 mg de (*S*)-(2-hidroxi-1-hidroximetiltetradecil)naftamida, **95**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3); 1.28 (sa, 20H, CH_2); 1.61 (sc, 2H, CH_2 (α)); 3.78 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.92 (sc, 1H, CH-OH); 7.55 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.94 (sc, 3H, CH_{ar}); 8.20 (sc, 1H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 557 (M^+ , 1), 542 (M-15, 6), 454 (A, 4), 286 (B, 14), 217 (26), 197 (96), 155 (100), 127 (52), 73 (84)

Anàlogament, 160 mg de la resina fenilaminoalcohol, **e72**, i 132 μ L (1.0 mmol) de clorur d'1-naftoil forniren 25 mg de (*S*)-(2-hidroxi-1-hidroximetil-2-fenetil)naftamida, **96**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 3.69 (sc, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4.17 (sc, 1H, CH-NH); 5.02 (sc, 1H, CH-OH); 7.24 (sc, 5H, CH_{ar}); 7.31 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.40 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.56 (sc, 3H, CH_{ar}); 7.93 (sc, 3H, CH_{ar}); 8.22 (sc, 1H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 465 (M^+ , 1), 450 (M-15, 8), 362 (A, 2), 286 (B, 76), 179 (72), 155 (100), 127 (68), 73 (74)

5.1.8.10.6 Clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil com agent acilant

Seguint el procés anteriorment descrit, 190 mg de la resina metilaminoalcohol, **e57**, i 223 mg (1.0 mmol) de clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil forniren 44 mg de (*S*)-2-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetilpropil)acetamida, **97**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 1.13 (d, $J=6$ Hz, 3H, Me); 3.49 (s, 2H, CH_2 (α) (amida)); 3.67 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.81 (sc, 7H, CH-OH i O-CH_3); 6.88 (sc, 3H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 427 (M^+ , 12), 412 (M-15, 32), 324 (A, 22), 310 (B, 46), 293 (27), 252 (55), 221 (77), 195 (89), 178 (74), 151 (99), 117 (78), 73 (100)

Anàlogament, 190 mg de la resina hexilaminoalcohol, **e69**, i 223 mg (1.0 mmol) de clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil forniren 41 mg de (*S*)-2-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-(2-hidroxi-1-hidroximetiloctil)acetamida, **98**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.88 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3); 1.29 (sa, 8H, CH_2); 1.44 (sc, 2H, CH_2 (α)); 3.48 (s, 2H, CH_2 (α) (amida)); 3.58 (sc, 3H, $\text{CH}_2\text{-OH}$ i CH-NH); 3.81 (sc, 7H, CH-OH i O-CH_3); 6.87 (sc, 3H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 497 (M^+ , 5), 482 (M-15, 19), 394 (A, 16), 310 (B, 23), 293 (62), 252 (80), 221 (85), 195 (80), 187 (84), 178 (46), 151 (96), 103 (54), 73 (100)

Anàlogament, 200 mg de la resina octilaminoalcohol, **e70**, i 234 mg (1.0 mmol) de clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil forniren 47 mg de (S)-2-(3,4-dimetoxifenil)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetildecil)acetamida, **99**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, CH_3); 1.29 (sa, 12H, CH_2); 1.46 (sc, 2H CH_2 (α)); 3.45 (s, 2H, CH_2 (α) (amida)); 3.65 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH-NH); 3.81 (sc, 7H, CH-OH i O-CH_3); 6.88 (sc, 3H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 525 (M^+ , 1), 510 (M-15, 10), 422 (A, 6), 310 (B, 12), 293 (34), 252 (70), 221 (79), 195 (64), 151 (99), 73 (100)

Anàlogament, 160 mg de la resina dodecilaminoalcohol, **e71**, i 188 mg (1.0 mmol) de clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil forniren 34 mg de (S)-2-(3,4-dimetoxifenil)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetiltetradecil)acetamida, **100**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 0.89 (t, $J=6.5$ Hz, 3H, CH_3); 1.28 (sa, 20H, CH_2); 1.56 (sc, 2H, CH_2 (α)); 3.48 (s, 2H, CH_2 (α) (amida)); 3.78 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH-NH); 3.92 (sc, 1H, CH-OH); 3.65 (sc, 3H, CH_2 -OH i CH-NH); 3.81 (sc, 7H, CH-OH i O-CH_3); 6.88 (sc, 3H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 581 (M^+ , 1), 566 (M-15, 4), 478 (A, 8), 310 (B, 7), 293 (24), 252 (50), 221 (66), 195 (42), 151 (82), 73 (100)

Anàlogament, 160 mg de la resina fenilaminoalcohol, **e72**, i 188 mg (1.0 mmol) de clorur de 3,4-dimetoxifenilacetil forniren 33 mg de (S)-2-(3,4-dimetoxifenil)-N-(2-hidroxi-1-hidroximetil-2-fenetil)acetamida, **101**.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ : 3.35 (s, 2H, CH_2 (α) (amida)); 3.68 (sc, 2H, CH_2 -OH); 3.77 (s, 3H, O-CH_3); 3.80 (s, 3H, O-CH_3); 4.16 (sc, 1H, CH-NH); 4.78 (sc, 1H, CH-OH); 6.62 (dd, $J_1=8.5$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, 1H, CH_{ar}); 6.88 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.24 (sc, 5H, CH_{ar}); 7.31 (sc, 2H, CH_{ar}); 7.40 (sc, 2H, CH_{ar}) ppm

CG-EM m/z del derivat sililat (%): 489 (M^+ , 1), 474 (M-15, 12), 386 (A, 5), 310 (B, 98), 293 (36), 252 (40), 192 (84), 179 (94), 151 (99), 132 (84), 116 (52), 73 (100)

5.2 ASSAIGS BIOLÒGICS

5.2.1 Productes

Tots els dissolvents emprats per a les extraccions i anàlisis foren de qualitat analítica i s'adquiriren a Merck. El DMSO i el medi Grace s'adquiriren a Sigma.

5.2.2 Insectes

Els insectes pertanyen a la colònia que es manté en el nostre departament en un fotoperíode invertit. Els animals es mantenen sota un fotoperíode de 16h de llum (fotofase) i 8h de foscor (escotofase), a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ i una humitat relativa del $65 \pm 5\%$. Les larves s'alimenten amb una dieta artificial²²². Les pupes són sexades una setmana abans de l'eclosió i separades segons el sexe. Els adults són alimentats amb una dissolució de sacarosa al 10%. En els assajos s'utilitzen únicament femelles verges l'edat de les quals s'especifica en cada cas.

5.2.3 Dissecció de les glàndules feromonals

En el cas de *S. littoralis* la glàndula feromonal és un sac ventral eversible d'epitel·li glandular, d'1 o 2 mm de diàmetre, localitzada en la membrana intersegmental entre el vuitè i el novè segment abdominal. Només emergeix a l'exterior durant el període d'emissió de feromona, i resta invaginada en períodes d'inactivitat sexual. La dissecció es realitza pressionant lleugerament l'abdomen, per aconseguir l'extrusió de l'ovopositor i l'evaginació de la glàndula feromonal, la qual es dissectiona cuidadosament amb unes tisores entomològiques.

5.2.4 Incubació de les glàndules feromonals in vitro

En aquests assaigs, s'utilitzaren femelles verges de 0 fins a 15 h d'edat i els experiments s'iniciaren 30-60 min abans de l'inici de l'escotofase. Els assaigs s'efectuaren en plaques de poliestirè de 96 pous de fons rodó. En un tub *ependorf* es disposaren 5 μL de la dissolució mare de substrat en DMSO (10 mg/mL), i s'afegiren 95 μL de medi de Grace. La dissolució que en resultà s'agità vigorosament amb un vòrtex. A cada pou s'hi afegiren 10 μL d'aquesta dissolució i, un cop preparada la placa d'incubació, es procedí a la dissecció de les glàndules feromonals, tal com s'ha indicat més enrera, les quals s'incubaren durant 3h amb la dissolució del substrat corresponent.

És important que el teixit quedi completament submergit dins el medi d'incubació. Durant les incubacions, la placa es cobrí amb un full de plàstic adhesiu per tal d'evitar l'evaporació del medi.

5.2.5 Metanòlisi bàsica

Les glàndules, individualitzades o en grups, es submergiren en 100 µL d'una dissolució 0.5 M de KOH en MeOH. Després d'1 h a temperatura ambient, es neutralitzà amb un volum igual de HCl 1 N i la fase aquosa s'extragué amb hexà. La fase orgànica es traspasà a un vial cònic amb una pipeta Pasteur. L'extracte hexànic es guardà a -80 °C fins el moment d'efectuar l'anàlisi.

5.2.6 Anàlisi instrumental per CG-EM

Les anàlisis per CG-EM es realitzaren emprant l'equip especificat a l'apartat 3.1.1 de dades generals. S'utilitzà un únic programa de temperatures de 80 °C (0 min) fins a 200 °C a 5 °C/min i fins a 280 °C (10 min) a 10 °C/min.

Els extractes lipídics de les glàndules incubades amb l'àcid **25** també foren analitzats amb dues columnes polars: la HP-FFAP (Hewlett Packard) de 25m x 0.33µm x 0.20mm d.i., en aquest cas es canviaren les temperatures de l'injector i del transfer per 220 °C i 230 °C, respectivament, i per a la SP-2340 (Supelco) de 30m x 0.20µm x 0.25mm d.i., es fan servir les mateixes condicions que per l'anterior. S'utilitzà un programa de temperatures de 80 °C (5 min) fins a 230 °C (15 min) a 5 °C/min (columna HP-FFAP) i 80 °C (0 min) fins a 230 °C (15 min) a 5 °C/min (columna SP-2340).

6.- CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

CAPÍTOL 2

1. L'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, component majoritari de la feromona sexual de la processionària del roure, *T. processionea*, es biosintetitza a partir de l'àcid palmític per dues dessaturacions consecutives en (Z)-11 (Δ^{11} -dessaturasa) i (Z)-13 (Δ^{13} -dessaturasa), tot obtenint l'àcid (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic, el qual és finalment reduït (reductasa) i acetilat (acetiltransferasa) al producte final.
2. La producció de la feromona sexual de les femelles de *T. processionea* està regulada hormonalment pel PBAN. Possiblement, aquest neuropèptid actua activant la reducció del dienoat intermedi al corresponent alcohol.
3. L'absència de la Δ^{11} acetilenasa en la processionària del roure i l'existència d'una reductasa específica per el (Z)-13-hexadecen-11-inoat en la processionària del pi contribueixen a la variació fenotípica en l'estructura de les feromones sexuals d'ambdues espècies.

CAPÍTOL 3

4. Els àcids ciclopropànics 11-ciclopropilundecanoic, **25**; (*cis*)-11-(2-metilciclopropil)undecanoic, **45a**; (*cis*)-11-(2-etilciclopropil)undecanoic, **46a**; (*cis*)-11-(2-propilciclopropil)undecanoic, **47a**; (*trans*)-11-(2-metilciclopropil)undecanoic, **45b** y (*trans*)-11-(2-etilciclopropil)undecanoic, **46b** són substrats de la Δ^{11} -dessaturasa, però no els àcids 11-metiltetradecanoic, **12**; 11-metilhexadecanoic, **18** i (*trans*)-11-(2-propilciclopropil)undecanoic, **47b**. Aquests resultats poden interpretar-se en atenció a consideracions estèriques. Així, els anàlegs substituïts amb grups metil, **12** i **18**, són massa voluminosos per a emmotllar-se a la zona d'unió enzim-substrat. D'altra banda, aquest resultats suggereixen que la zona d'unió amb el substrat de la Δ^{11} -dessaturasa conté, a la part distal que allotja l'extrem terminal del substrat, dues cavitats diferents: una de gran, on poden encabir-se els substrats *cis*-**45-47**, així com la conformació *eclipsada* dels substrats

naturals, que donen la olefina *Z*, i una de petitat, que acomoda els substrats *trans*, **45b** i **46b**, però no **47b**, així com el conformer *anticlinal* dels substrats naturals, que donen la olefina *E*.

5. La reacció catalitzada per la Δ^{11} -dessaturasa no té lloc a través d'un intermedi radicalari o, cas que es formi un radical ciclopropilcarbinil, la seva constant de reorganització és massa baixa per competir amb la eliminació de C12-H i la formació del doble enllaç 11,12.

CAPÍTOL 4

6. L'addició de diferents organomagnesians sobre una amida de Weinreb ancorada a un suport polimèric derivat de la resina d'Ellman, seguida de reducció estereoselectiva de les aminocetones resultants, *N*-acilació dels aminodiols intermedis amb diversos grups acil i desancoratge final, és un bon procediment per a obtenir col·leccions combinatòries d'esfingolípid en fase sòlida. Els dos punts de diversitat s'introdueixen en la reacció d'addició de l'organometàl·lic i en la reacció de *N*-acilació.
7. En la reducció de les aminocetones ancorades sobre el suport polimèric, el reactiu que dona més bona diastereoselectivitat *eritro* és el DIBAH. No obstant, en les condicions emprades en aquest treball, aquest reductor provoca la descomposició parcial de la resina i condueix a productes molt impurs. En aquests casos, el $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ és el reactiu d'elecció, malgrat la seva més baixa diastereoselectivitat.
8. La reacció de *N*-acilació en DMF de la resina model **e57** amb èsters activats, condueix a productes de *N,O*-diacilació. L'ús de clorurs d'àcid com a agents acilants sota condicions de Schotten-Baumann és un mètode eficaç per tal d'evitar les reaccions de poliquilació i condueix exclusivament als productes de *N*-alquilació desitjats.
9. En la quimioteca model obtinguda, el 80% dels compostos (24 d'un total de 30) mostren un grau de puresa igual o més gran del 70%, el que demostra la validesa del mètode sintètic emprat per la construcció de la quimioteca.

7.- BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Dyatlovitskaya, E. V. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *63*, 55-61.
- (2) Hanahan, D. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 483-509.
- (3) Exton, J. H. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1-4.
- (4) Nishizuka, Y. *Science* **1992**, *258*, 607-614.
- (5) Spiegel, S.; Merrill Jr., A. H. *FASEB J.* **1996**, *10*, 1388-1397.
- (6) Hannun, Y. A. *Science* **1996**, *274*, 1855-1859.
- (7) Shayman, J. A. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1996**, *7*, 171-182.
- (8) Stubbs, C. D.; Smith, A. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *779*, 89-137.
- (9) Pereira, S. L.; Leonard, A. E.; Mukerji, P. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2003**, *68*, 97-106.
- (10) Merril Jr, A. H.; Sandhoff, K. *Sphingolipids: metabolism and cell signaling*; Elsevier: Amsterdam, 2002; Vol. 14.
- (11) Vance, D.; Vance, J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* Amsterdam, 1991.
- (12) Tudichum, J. L. W. *The Chemical Constitution of the Brain*; Tindall & Cox: London, 1884.
- (13) Carter, H. *Annu. Rev. Biochem.* **1965**, *34*, 109-137.
- (14) Yamakawa, T. *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 123-126.
- (15) Merrill, A. H.; Nimkar, S.; Menladino, D.; Hannun, Y. A.; Loomis, C.; Bell, R. M.; Tyagi, S. R.; Lambeth, J. D.; Stevens, V. L.; Hunter, R.; Liotta, D. C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 3138.
- (16) Hannun, Y. A.; Obeid, L. M. *J. Biol. Chem* **2002**, *277*, 25847-25850.
- (17) Spiegel, S.; Milstien, S. *J. Biol. Chem* **2002**, *277*, 25851-25854.
- (18) Hakomori, S.-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 225-32.
- (19) Lampe, M. A.; Burlingame, A. L.; Whitney, J.; Whilliams, M. L.; Brown, B. E.; Roitman, E.; Elias, P. M. *J. Lipid Res.* **1983**, *24*.
- (20) Downing, D. T. *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 301-313.
- (21) Wertz, P. W.; Kremer, M.; Squier, C. A. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *98*, 375-378.
- (22) Gildenast, T.; Lasch, J. *J. Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1346*, 69-74.
- (23) Scheuplein, R. J.; Blank, I. H. *Physiol. Rev.* **1971**, *51*, 702-747.
- (24) Long, S. A.; Wertz, P. W.; Strauss, J. S.; Downing, D. T. *Arch. Dermatol. Res.* **1985**, *277*, 284-287.
- (25) Karlsson, K. A. *Chem. Phys. Lipids* **1970**, *5*, 6-43.
- (26) Corvey, J.; Moesby, L.; Erukulla, R. K.; Keddy, K. C.; Bittman, R.; Wilschut, J. *J. Virol.* **1995**, *69*, 3220-3903.
- (27) Kolesnick, R.; Kronke, M. *Ann. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 643.
- (28) Ruiz-Arguello, M.; Basanez, G.; Goni, F.; Alonso, A. *J. Biol. Chem* **1996**, *271*, 26616.
- (29) Jarvis, W. D.; Johnson, C. R.; Fornari, F. A.; Park, J. S.; Dent, P.; Grant, S. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* **1999**, *290*, 1384.
- (30) Hannun, Y. A.; Luberto, C. *Trends in cell Biology* **2000**, *10*, 73.
- (31) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97.
- (32) Schwarz, A.; Futerman, A. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 247.
- (33) Kolter, T.; Sandhoff, K. *Brain Pathology* **1998**, *8*, 79.
- (34) Paul, P.; Kamisaka, Y.; Marks, D. L.; Pagano, R. E. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2287.

- (35) Jeckel, D.; Karrenbauer, A.; Burger, K. N. J.; van Meer, G.; Wieland, F. *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 259.
- (36) van Meer, G.; Lisman, Q. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25855-25858.
- (37) van Helvoort, A.; van Meer, G. *FEBS Lett.* **1995**, *369*, 18.
- (38) Kopitz, J.; Gabius, S., Ed.; Cahpman& Hall: Weinheim, 1997, p 163.
- (39) Hakomori, S. *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 733.
- (40) Van Brocklyn, J. R.; Lee, M. J.; Menzeleev, R.; Olivera, A.; Edsall, L.; Cuvillier, O.; Thomas, D. M.; Coopman, P. J.; Thangada, S.; Liu, C. H.; Hla, T.; Spiegel, S. *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 229-240.
- (41) Pyne, S. G.; Milstien, S.; Spiegel, S. *FEBS Letters* **2002**, *531*, 54-57.
- (42) Hannun, Y. A.; Luberto, C.; Argraves, K. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 4893-4903.
- (43) Merrill Jr, A. H. *J. Biol. Chem* **2002**, *277*, 25843-25846.
- (44) Pyne, S.; Pyne, N. J. *Leukemia* **2000**, *16*, 1596.
- (45) Spiegel, S.; Milstien, S. *FEBS Letters* **2000**, *476*, 55-57.
- (46) Mandala, S.; Thornton, R.; Tu, Z.; Kurtz, M. B.; Nickels, J.; Broach, J.; Menzeleev, R.; Spiegel, S. *Cell Biology* **1998**, *95*, 150.
- (47) Bose, R.; Verheji, M.; Haimovitz-Friedman, A.; Scottom, K.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. *Cell* **1995**, *82*, 405-414.
- (48) Jaffrezou, J. P.; Levade, T.; Bettaieb, A.; Andrieu, N.; Bezombes, C.; Maestre, S.; Vermeersch, S.; Rouse, A.; Laurent, G. *EMBO J.* **1996**, *15*, 2417-2424.
- (49) Haimovitz-Friedman, A.; Kan, C. C.; Ehleiter, D.; Persaud, R. S.; McLoughlin, M.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 525-535.
- (50) Bieberich, E.; Hu, B.; Silva, J.; MacKinnon, S.; Yu, R. K.; Fillmore, H.; Broadus, W. C.; Ottenbrite, R. M. *Cancer Lett.* **2002**, *181*, 55-64.
- (51) Behrouzian, B.; Buist, P. H. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2003**, *68*, 107-112.
- (52) Bloch, K. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 193-202.
- (53) Heath, R. J.; Rock, C. O. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 1833-1836.
- (54) Shanklin, J.; Cahoon, E. B. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 611-641.
- (55) Lindqvist, Y.; Huang, W.; Schneider, G.; Shanklin, J. *EMBO J.* **1996**, *15*, 4081-4092.
- (56) Fox, B. G.; Shanklin, J.; Ai, J.; Loehr, T. M.; Sanders-Loehr, J. *Biochemistry* **1994**, *33*, 12776-12786.
- (57) Strittmatter, P.; Spatz, L.; D., C.; Rogers, M. J.; Setlow, B.; Redline, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 4565-4569.
- (58) Los, D. A.; Murata, N. *Bioch. Biophys. Acta* **1998**, *1394*, 3-15.
- (59) Bloomfield, D. K.; Bloch, K. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 337-345.
- (60) Sperling, P.; Heinz, E. *Wur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *103*, 158-180.
- (61) Fukuchi-Mizutani, M.; Mizutani, M.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Ohta, D. *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 353-361.
- (62) Nagai, J.; Bloch, K. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4626-4633.
- (63) Rodríguez, F.; Hallahan, D. L.; Pickett, J. A.; Camps, F. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **1992**, *22*, 143-148.
- (64) Shanklin, J.; Somerville, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2510-2514.
- (65) Shanklin, J.; Achim, C.; Schmidt, H.; Fox, B. G.; Münck, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2981-2986.

- (66) Liu, W.; Jiao, H.; Murray, N. C.; O'Connor, M.; Roelofs, W. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 620-624.
- (67) Sperling, P.; Zähringer, U.; Heinz, E. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28590-28596.
- (68) Cahoon, E. B.; Carlson, T. J.; Ripp, K. G.; Schweiger, B. J.; Cook, G. A.; Hall, S. E.; Kinney, A. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12935-12940.
- (69) Lee, M.; Lenman, M.; Banas, A.; Bafor, M.; Singh, S.; Schweizer, M.; Nilsson, R.; Liljenberg, C.; Dahlqvist, A.; Gummesson, P.; Sjö Dahl, S.; Green, A.; Stymne, S. *Science* **1998**, *280*, 915-918.
- (70) Aarts, M. G.; Keijzer, C. J.; Stiekema, W. J.; Pereira, A. *Plant Cell.* **1995**, *7*, 2115-2127.
- (71) Shu, L.; Nesheim, J. C.; Kauffmann, K.; Münck, E.; Lipscomb, J. D.; Que, L. *Science* **1997**, *275*, 515-518.
- (72) Lund, E. G.; Kerr, T. A.; Sakai, J.; Li, W. P.; Russell, D. W. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34316-34327.
- (73) Stuke, J. E.; McDonough, V. M.; Martin, C. E. *J. Biol. Chem.* **1990**, *266*, 20144-20149.
- (74) Shanklin, J.; Whittle, E.; Fox, B. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 12787-12794.
- (75) Liu, K. E.; Lippard, S. J. *Adv. Inorgan. Chem.* **1995**, *42*, 263-289.
- (76) Buist, P. H.; Behrouzian, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6295-6296.
- (77) Linn, C. E.; Campbell, M. G.; Roelofs, W. L. *Science* **1986**, *237*, 650-652.
- (78) Roelofs, W. L. *J. Chem. Ecol.* **1978**, *4*, 685-699.
- (79) Roelofs, W. L.; Bjostad, L. *Bioorg. Chem.* **1984**, *12*, 279.
- (80) Geeraert, L.; Mannaerts, P.; Veldhoven, P. *Biochem. J.* **1997**, *327*, 125.
- (81) Schulze, H.; Michel, C.; van Echten-Deckert, G. *In Methods Enzymol.* **2000**, *311*.
- (82) Michel, C.; van Echten-Deckert, G.; Rother, J.; Sandhoff, K.; Wang, E.; Jr., M. A. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22432.
- (83) Causeret, C.; Geeraert, L.; van der Hoeven, G. V.; Mannaerts, P. *Lipids* **2000**, *35*.
- (84) Ternes, P.; Franke, S.; Zähringer, U.; Sperling, P.; Heinz, E. **2002**, *277*, 25512.
- (85) Mandon, E.; Ehses, I.; Rother, J.; van Echten-Deckert, G.; Sandhoff, K. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11144.
- (86) Hirschberg, K.; Rodger, J.; Futerman, A. H. *Biochem. J.* **1993**, *290*, 751.
- (87) Savile, C.; Fabriàs, G.; Buist, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4382.
- (88) Beckmann, C.; Rattke, J.; Sperling, P.; Heinz, E.; Boland, W. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2448.
- (89) Frérot, B.; Demolin, G. *Boll. Zool. Agr. Bachic. Ser. II* **1993**, *25*, 33-40.
- (90) Guerrero, A.; Camps, F.; Coll, J.; Riba, M.; Einhorn, J.; Descoins, C.; Lallemand, J. Y. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2013-2016.
- (91) Arsequell, G.; Fabriàs, G.; Camps, F. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1990**, *14*, 47-56.
- (92) Fabriàs, G.; Arsequell, G.; Camps, F. *Insect Biochem.* **1989**, *19*, 177-181.
- (93) Barrot, M.; Fabriàs, G.; Camps, F. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9789-9796.
- (94) Quero, C.; Malo, E.; Fabriàs, G.; Camps, F.; Lucas, P.; Renou, M.; Guerrero, A. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 713-726.
- (95) Barrot, M., Universitat de Barcelona, 1995.

- (96) Rodríguez, S., Universitat de Barcelona, 2003.
- (97) Raina, A. K. *Annu. Rev. Entomol.* **1993**, *38*, 329-349.
- (98) Fabriàs, G.; Barrot, M.; Camps, F. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **1995**, *25*, 655-660.
- (99) Jurenka, R. A.; Roelofs, W. L. *Insect Biochem.* **1989**, *19*, 639-644.
- (100) Tang, J. D.; Charlton, R. E.; Jurenka, R. A.; Wolf, W. A.; Phelan, P. L.; Sreng, L.; Roelofs, W. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1806-1810.
- (101) Martínez, T.; Fabriàs, G.; Camps, F. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1381-1387.
- (102) Mas, E.; Lloria, J.; Quero, C.; Camps, F.; Fabriàs, G. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **2000**, *30*, 455-459.
- (103) Fang, N. B.; Teal, P.; Tumlinson, J. H. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1995**, *29*, 35-44.
- (104) Ozawa, R. A.; Ando, T.; Nagasawa, H.; Kataoka, H.; Suzuki, A. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 2144-2147.
- (105) Teal, P. E. A.; Tumlinson, J. H. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1987**, *4*, 261-269.
- (106) Bestmann, H. J.; Herrig, M.; Attygalle, A. B. *Experientia* **1987**, *43*, 1033-1034.
- (107) Zhao, C. H.; Bengtsson, M.; Lofsted, C. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 1495-1510.
- (108) Sperling, P.; Lee, M.; Girke, T.; Zähringer, U.; Stymne, S.; Heinz, E. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3801-3811.
- (109) Roelofs, W. L.; Liu, W.; Hao, G.; Jiao, H.; Rooney, A. P.; Linn, C. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13621-13626.
- (110) Villorbina, G.; Rodríguez, S.; Camps, F.; Fabriàs, G. *Ins. Biochem. Molec. Biol.* **2003**, *33*, 155-161.
- (111) Dunkelblum, E.; Kehat, M.; Gothilf, S.; Greenberg, S.; Sklarsz, B. *Phytoparasitica* **1982**, *10*, 21.
- (112) Navarro, I.; Fabriàs, G.; Camps, F. *Lipids* **1997**, *32*, 407-412.
- (113) Fritsche, K.; Hornung, E.; Peitzsch, N.; Renz, A.; Feussner, I. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 249-253.
- (114) Rodríguez, S.; Hao, G.; Liu, W.; Piña, B.; Rooney, A. P.; Camps, F.; Roelofs, W.; Fabriàs, G. *Ins. Biochem. Molec. Biol.*, en premsa.
- (115) Pinilla, A.; Camps, F.; Fabriàs, G. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15272-15277.
- (116) Quintana, J., Universitat de Barcelona, 1999.
- (117) McKillop, A.; Taylor, R. J. K.; Watson, R. J.; Lewis, N. *Synthesis* **1994**, 31-33.
- (118) Cornforth, J. W.; Cornforth, R. H.; Mathew, K. K. *J. Chem. Soc.* **1959**, 112.
- (119) Keinan, E.; Mazur, Y. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1020-1022.
- (120) Gras, J. L.; Chang, Y. Y. K. W.; Guerin, A. *Synthesis* **1985**, 74.
- (121) Stowell, J. C. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 244-245.
- (122) Corey, E. J.; Schmidt, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *5*, 399-402.
- (123) Phillips, T. W.; Phillips, J. K.; Webster, F. X.; Tang, R.; Burkholder, W. *E. J. Chem. Ecol.* **1996**, *22*, 2233.
- (124) Kass; Burr *J. Amer. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 3293.
- (125) Goerger, M. M.; Bruce, S. H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3148-3153.
- (126) Camps, F.; Casamor, J. M.; Coll, J.; Guerrero, A.; Riba, M. *Org. Prep. Proced. Int.* **1983**, *15*, 63-67.

- (127) Imai, N.; Sakamoto, K.; Takahashi, H.; Kobayashi, S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *38*, 7045-7048.
- (128) Krief, A.; Ronvaux, A.; Tuch, A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6903-6908.
- (129) Beckmann, W.; Doerjter, G.; Logemann, E.; Merkel, G.; Schill, G.; Zürcher, C. *Synthesis* **1975**, 423-425.
- (130) Brandsma, L.; Verkruisje, H. D. *Synthesis of acetylenes, allenes and cumulenes*; Elsevier: New York, 1981.
- (131) Schwartz, M.; Waters, R. M. *Synthesis* **1972**, 567-568.
- (132) Navarro, I.; Font, I.; Fabriàs, G.; Camps, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11335-11336.
- (133) Buist, P. H.; Behrouzian, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 871-876.
- (134) Navarro, I.; Fabriàs, G.; Camps, F. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 439-443.
- (135) Kolattukudy, P. E.; Walton, T. J. *Biochemistry* **1972**, *11*, 1897-1907.
- (136) Griller, D.; Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 317-323.
- (137) Jin, Y.; Lipscomb, J. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1543.
- (138) Curfman, C.; Liotta, D. C. *Methods Enzymol.* **2000**, *311*, 391-440.
- (139) Nimkar, S.; Menaldino, D. S.; Merrill Jr, A. H.; Liotta, D. C. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3037-3040.
- (140) Shapiro, D.; Segal, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5894.
- (141) Shapiro, D.; Segal, H.; Flowers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1194.
- (142) Koskinen, P. M.; Koskinen, A. M. P. *Synthesis* **1998**, *august*, 1075.
- (143) Trost, B. M.; Lee, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6818-6819.
- (144) Chung, S.-K.; Lee, J.-M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1441-1444.
- (145) Hertweck, C.; Boland, W. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4426-4430.
- (146) Khair, N.; Singh, K.; Garcia, M.; MartinLomas, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5779-5782.
- (147) Nakamura, T.; Shiozaki, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 9063-9064.
- (148) Takikawa, H.; Nozawa, D.; Kayo, A.; Muto, S.; Mori, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1999**, 2467-2477.
- (149) Corey, E. J.; Choi, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2765-2768.
- (150) Fernandes, R. A.; Kumar, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3447-3449.
- (151) Martin, C.; Prunch, W.; Bortolussi, M.; Bloch, R. *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 1585-1592.
- (152) Chun, J.; Li, G.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 375-377.
- (153) Kobayashi, S.; Matsubara, R.; Kitagawa, H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 143-145.
- (154) Nakamura, Y.; Matsubara, R.; Kitagawa, H.; Kobayashi, S.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Hanada, K. *J. Med. Chem.* **2003**.
- (155) Gigg, R.; Conant, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1977**, 2006.
- (156) Kiso, M.; Nakamura, A.; Tomita, Y.; Hasegawa, A. *Carbohydr. Res.* **1986**, *158*, 101.
- (157) Schmidt, R. R.; Zimmerman, P. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 481.
- (158) Zimmerman, P.; Schmidt, R. R. *Liebigs. Ann. Chem.* **1988**, 663.
- (159) Ohashi, K.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; Kates, M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1185.
- (160) Murakami, T.; Hato, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1996**, *8*, 823.
- (161) Milne, J. E.; Jarowicki, K.; Kocienski, P. J.; Alonso, J. *Chem. Commun.* **2002**, 426-427.

- (162) Luo, S.-Y.; Thopate, S. R.; Hsu, C.-Y.; Hung, S.-C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4889-4892.
- (163) Newman, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4096.
- (164) Boutin, R. H.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5320.
- (165) Mori, K.; Funaki, Y. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 2379.
- (166) Dondoni, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A. *J. Chem. Soc.; Chem. Comm.* **1988**, 10.
- (167) Dondoni, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1748.
- (168) Garner, P.; Min Park, J.; Malecki, E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4395.
- (169) Herold, P. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 354.
- (170) Koskinen, A. M. P. *Synlett* **1990**, 665.
- (171) Dondoni, A.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Pedrini, P. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1439.
- (172) Soai, K.; Takahashi, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1994**, 1257.
- (173) Shikata, K.; Azuma, H.; Tachibana, T.; Ogino, K. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5803-5809.
- (174) Lee, J.-M.; Lim, H.-S.; Chung, S.-K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 343-347.
- (175) Hoffman, R. V.; Maslouh, N.; Cervantes-Lee, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1045-1056.
- (176) Chun, J.; Li, G.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2600-2605.
- (177) Villard, R.; Hammache, D.; Delapierre, G.; Fotiadu, F.; Buono, G.; Fantini, J. *Chem. Biochem* **2002**, *3*, 517-25.
- (178) Lu, X.; Cseh, S.; Byun, H.-S.; Tigyi, G.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7046-7050.
- (179) Chun, J.; Byun, H.-S.; Arthur, G.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 355-359.
- (180) Dagan, A.; Wang, C.; Fibach, E.; Gatt, S. *Biochem. Biophys. Acta* **2003**, *1633*, 161-169.
- (181) Clemens, J. J.; Davis, M. D.; Lynch, K. R.; Macdonald, T. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3401-3404.
- (182) Shikata, K.; Niuro, H.; Azuma, H.; Tachibana, T.; Ogino, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 613-616.
- (183) Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Holas, T.; Zbytovská, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2351-2353.
- (184) Schick, A.; Kolter, T.; Giannis, A.; Sandhoff, K. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2945-2956.
- (185) Chang, Y.-T.; Choi, J.; Ding, S.; Prieschl, E. E.; Baumruker, T.; Lee, J.-M.; Chung, S.-K.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1856-1857.
- (186) Chang, Y.-T.; Schultz, P. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2479-2482.
- (187) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2153.
- (188) Bayer, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113-129.
- (189) Früchtel, J. S.; Jung, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17-42.
- (190) Vaino, A.; Janda, K. D. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 579-596.
- (191) Yan, B. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 621.
- (192) Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Ziliox, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650.

- (193) Hany, R.; Rentsch, D.; Dhanapal, B.; Obrecht, D. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 85-89.
- (194) Lorgé, F.; Wagner, A.; Mioskowski, C. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 25-27.
- (195) Egner, B. J.; Langley, J. L.; Bradley, M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2652.
- (196) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- (197) Madder, A.; Farcy, N.; Hosten, N. G. C.; De Muynck, H.; De Clercq, P. J.; Barry, J.; Davis, A. P. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2787-2791.
- (198) Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70-77.
- (199) Gordon, K.; Bolger, M.; Khan, N.; Balasubramanian, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8621-8625.
- (200) Wills, A. J.; Krishnan-Ghosh, Y.; Balasubramanian, S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6646-6652.
- (201) O'Donnell, M. J.; Drew, M. D.; Pottorf, R. S.; Scott, W. L. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 171-181.
- (202) Meester, W. J. N.; van Dijk, R.; van Maaseveen, J. H.; Rutjes, F. P. J. T.; Hermkens, P. H. H.; Hiemstra, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, 2909-2911.
- (203) Thompson, L. A.; Ellman, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9333-9336.
- (204) Rosowsky, A.; Wright, J. E. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5551-5558.
- (205) Jacobi, P. A.; Armacost, L. M.; Brielmann, H. L.; Cann, R. O.; Kravitz, J. I.; Martinelli, M. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5292-5304.
- (206) De Jonghe, S.; Lamote, I.; Venkataraman, K.; Boldin, S. A.; Hillaert, U.; Rozenski, J.; Hendrix, C.; Busson, R.; De Keukeleire, D.; Van Calenbergh, S.; Futerman, A. H.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 988-996.
- (207) Wallace, O. B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4939-4942.
- (208) Hoffman, R. V.; Tao, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3979-3985.
- (209) Chun, J.; He, L.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7634-7640.
- (210) Dondoni, A.; Perrone, D.; Turturici, E. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5557-5564.
- (211) Gordeev, M. F.; Luehr, G. W.; Hui, H. C.; Gordon, E. M.; Patel, D. V. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15879-15890.
- (212) Szulc, Z. M.; Hannun, Y. A.; Bielawska, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7821-7824.
- (213) Kim, D.-H.; Rho, H.-S.; You, J. W.; Lee, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 277-279.
- (214) Colthurst, M. J.; Williams, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, *2*, 1493-1497.
- (215) Schotten, C. *Ber.* **1884**, *17*, 2544.
- (216) Baumann, E. *Ber.* **1886**, *19*, 3218.
- (217) Bushnev, A.; Liotta, D. C. 2000; Vol. 311, p 535.
- (218) Johnson, M. A.; Maggiora, G. M. *Concepts and application of molecular similarity* New York, 1990.
- (219) Pascual, R.; Borrell, J. I.; Teixidó, J. In *Meeting on 'Structure-Based Drug Design'*; MGMS, Ed. Oxford, 2000.
- (220) Raith, K.; Darius, J.; Neubert, R. H. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 876.
- (221) Kadaba, P. K. *Synthesis* **1972**, 628-630.
- (222) Poitout, S.; Bues, R.; Le Rumeur, C. *Ent Exp Appl* **1972**, *20*, 341-350.