

**Síntesis d'anàlegs de BEL i de substrat
com a nous potencials inhibidors
de la fosfolipasa independent de calci (grup VIA)**

Xavier Matabosch Geronès



DEPARTAMENT DE QUÍMICA ORGÀNICA

FACULTAT DE QUÍMICA

Programa de Doctorat de Química Orgànica

Bienni 2002/2004

Síntesis d'anàlegs de BEL i de substrat
com a nous potencials inhibidors
de la fosfolipasa independent de calci (grup VIA)

Memòria presentada per Xavier Matabosch Geronès per optar al títol de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat en el grup RUBAM del Departament de Química Orgànica Biològica
de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (CSIC)

Director

Amadeu Llebaria Soldevila

Investigador Científic

IIQAB-CSIC

Tutor

Ángel Montaña Pedrero

Professor titular de Química Orgànica

Facultat de Química.

Universitat de Barcelona

“There is always an easy solution to every human problem - simple, plausible and wrong.”

H. L. Mencken

Un cop acabada l'escriptura d'aquesta memòria em veig obligat a agrair a totes les persones i institucions que han fet possible la realització d'aquest treball.

Voldria començar primer per la Fundació la Marató pel finançament d'aquest projecte, i també a totes les persones que any rere any col·laboren per la investigació en el nostre país. Així també al Ministerio de Ciencia y Tecnología per l'atorgament d'una beca predoctoral.

A l'Amadeu, per haver confiat en mi des d'aquell dia, ara tan llunyà, en que em vaig presentar al seu despatx amb un currículum a la mà, ara gràcies a la seva direcció sortiré del centre amb una tesi doctoral i molt més.

També a l'Antonio, que a més de donar bons consells en les reunions de treball, sempre ha tingut un moment per donar un toc diferent a les coses amb el seu humor característic.

Als altres membres del grup, a la Gemma, per la seva ajuda i per intentar sempre transmetre el seu entusiasme per la ciència; a la Fina, no només pels espectres de masses, i al Jesús per l'ajuda i formació que vaig rebre en arribar a aquest centre.

Evidentment, un agraïment molt especial per tots els companys i amics amb qui he compartit molt bons moments, i també m'han ajudat quan no ho eren tan. Vull començar per tots els meus companys del departament de Química de la Universitat de Girona, molt especialment a l'Ester i la Judit, per l'amistat que es va forjar des del primer dia a la universitat; a en Carles, el tigre de la Garrotxa, que en el món de la ciència es pot dir que em va ensenyar a gatejar junt amb els consells d'en David, la Pilar en Santi...

Als meus primers companys del 213, el José Luís, perquè tot i les aparences és de les millors persones que he conegut en aquest centre, a en Carles, l'enginyer més llunàtic i simpàtic del planeta (encara que ningú sàpiga quin!!), a la Victòria, per tots els consells que em vas donar, a la Gemma i al Sergio amb qui vaig compartir bons moments i em van ajudar en la química enmig de litres de CH_2N_2 . També a l'Ismael que va venir a treballar des de València i ens va ensenyar que no cal un mans lliures per treballar. D'aquells vells (bells) temps també em vull recordar dels companys del 314, amb qui vaig poder compartir moltes hores al menjador, sopars i altres sortides, molt especialment al Jorge, encara deu tenir agulletes de tantes columnes com va fer, a l'Itziar, pel seu sentit de l'humor i la paciència en tot moment i la Lourdes, una companya que sempre està allà per donar un cop de mà i que només li puc retreure una cosa, aquella caminada per l'Hospitalet perquè li venia de gust un SuperBatut de

maduixa (és broma!!). Més endavant també va arribar l'Esmeralda, amb qui vaig compartir bons moments, i no tant bons, superant les traves de la burocràcia.

A tots els companys del RUBAM, especialment al David que hauria d'estar als agraïments del laboratori, per totes les coses que he après de tu, i totes les idees que m'has donat, i també als agraïments socials, per aquells mesos compartint les tasques domèstiques del pis. A la Carma, pel seu caràcter, la seva amistat i el seu somriure. A la Isabel que sempre té un moment per ajudar i sobretot per encoratjar als companys i a la Marta, per aconseguir posar ordre al laboratori amb un somriure a la cara.

També als companys del 211, al Santi, per aquelles converses de química, de futbol, i de tantes altres coses... que m'han ajudat a tirar endavant en els moments difícils. A la Patricia per totes aquelles estones a prop del 500. A la Meri, per deixar el que estigui fent per ajudar als demés. També un agraïment pels últims fitxatges del grup, el Dani, l'Anna, el Youseff i el Jose, i també pels que van venir per una temporada, el Lewis (thank you for your english class), la Rebeca (tenemos que volver al museo de Chocolate), ...I als que ja no hi són, però sempre els recordarem, el Pedro, la Gemma, les Silvies, l'Albert i l'Elena.

Al Pedro i al Diego, per ensenyar-me tantes coses en biologia molecular, així com a les meves companyes de Farmàcia (la Joana Relat, la Cristina, la Xisca, la Laura, la Rosa, la Joana Ramis, la Mar i la Mariona) que em van tractar com un rei des del primer dia.

Un agradecimiento muy especial para Jesús Balsinde, de quién aprendí mucho en las reuniones de proyecto y siempre ha mostrado mucho interés para ayudar en mi tesis.

També un agraïment al Francisco Sanchez per haver-me ensenyat tantes coses del meravellós món de la ressonància i a tots els companys de departament, amb qui hem compartit cafès, alguns partits de futbol o bàsquet i també alguna conversa de química. També als sofàs de la segona planta per ser el centre neuràlgic de la planta i per de tant en tant, convidar-me a un cafè.

També als meus companys de pis durant aquests anys a Barcelona, primer amb la Sílvia, l'Emma i la Gloria i després amb en Ramon, en Robert en David i en Raül.

Aquí potser hauria d'escriure un capítol més llarg que els materials i mètodes però intentaré resumir-ho. A la Montse, per ajudar-me i animar-me tots aquests anys, primer amb les lliçons de clonatges i de com obrir els *Eppendorf* amb una sola mà i finalment en l'ajuda durant l'escriptura d'aquesta memòria; per no rendir-te mai i intentar donar sempre el màxim per superar els moments difícils, però sobretot per haver omplert el buit de la meva vida i donar-li sentit.

A tota la meva família, als meus pares, de química potser no en saben gaire, però m'han educat com cap altre mestre; al meu germà, amb qui he compartit tants moments. I a tota la resta de família i amics, simplement gràcies per estar al meu costat.

ABREVIATURES.....	17
1. INTRODUCCIÓ.....	19
1.1. Els fosfolípids	21
1.2. Les fosfolipases	21
1.2.1. Fosfolipasa secretada de tipus A ₂ (sPLA ₂)	23
1.2.2. Fosfolipasa citosòlica (cPLA ₂)	25
1.2.3. Fosfolipasa citosòlica independent de calci (iPLA ₂)	27
1.2.4. Inhibidors de les diferents PLA ₂	30
1.2.4.1. Inhibidors de sPLA ₂	31
1.2.4.2. Inhibidors de cPLA ₂	32
1.2.4.3. Inhibidors de iPLA ₂	33
1.3. Hipòtesi fosfolípídica de la esquizofrènia	35
1.3.1. Esquizofrènia.....	35
1.3.2. La hipòtesis de Horrobin.....	35
1.3.2.1. Estructura de la Membrana Neuronal	36
1.3.2.2. Metabolisme dels EFAs:	37
1.3.2.3. Hipòtesi de membrana:	39
1.3.2.4. Quines fosfolipases estan relacionades amb l'esquizofrènia?	40
2. OBJECTIUS.....	43
3. RESULTATS.....	47
3.1. Síntesi d'anàlegs de BEL.....	49
3.1.1. Síntesi d'anàlegs fluorats.....	49
3.1.1.1. Anàlisi Sintètic i Estratègia:.....	49
3.1.1.2. Síntesi de la cetona precursora (2):	52
3.1.1.3. Introducció dels àtoms de fluor:.....	53
3.1.2. Síntesi de α,α' -diariloxiciclohexanones	57
3.1.2.1. Anàlisi Sintètic i Estratègia:.....	57
3.1.2.2. Formació de l'intermedi 12 :.....	58
3.1.2.3. Obertura de l'epòxid 12 i obtenció dels productes finals:.....	60
3.1.2.4. Comprovació de l'estereoquímica dels productes finals:.....	65
3.1.3. Síntesi de α -ariloxiciclohexanones.....	70
3.2. Síntesi d'anàlegs de Substrat	72
3.2.1. Anàlisi Sintètic i Estratègia:	72

3.2.1.1. Síntesi de l'intermedi 17	75
3.2.2. Síntesi de fosfolípids. Via sintètica 1	76
3.2.3. Síntesi de fosfolípids. Via sintètica 2	79
3.2.4. Introducció de les diferents funcionalitats en el grup amino	80
3.2.5. Valoració de les dues vies sintètiques utilitzades per la síntesis dels compostos 24	83
3.2.6. Substitució de Fosfocolina per un grup Carbamat	85
3.3. Àcids borònics com a inhibidors de fosfolipases	86
3.4. Síntesi d'altres anàlegs de ceramida	87
3.4.1. Introducció	87
3.4.2. Síntesi d'anàlegs de ceramida	87
3.5. Expressió del centre catalític de iPLA₂	90
3.5.1. Amplificació del DNA motlle amb les dianes de restricció:	91
3.5.2. Clonatge amb el vector pRSET-B:	91
3.5.3. Expressió de les proteïnes de fusió:	91
4. DISCUSSIÓ	95
4.1. Assaig d'inhibició de fosfolipasa A₂	97
4.1.1. Anàlegs fluorats	97
4.1.2. α,α' -ariloxiciclohexanones (14 i 15)	98
4.1.3. α -ariloxiciclohexanones (16)	100
4.1.4. Anàlegs de Substrat	102
4.1.5. Àcids Borònics	107
4.2. Enzims del metabolisme d'esfingolípids	108
4.2.1. Ceramidasa	109
4.2.2. Dihidroceramida Dessaturasa (DHCD)	111
4.2.3. Mort Cel·lular	113
4.2.4. Esfingomielina Sintasa	116
5. CONCLUSIONS	121
6. MATERIALS I MÈTODES:	125
6.1. Descripció dels productes sintetitzats:	128
6.1.1. Síntesi d'anàlegs de BEL	128
6.1.1.1. 1-(2-nitrociclohexil)naftalè (1)	128
6.1.1.2. 2-naftalen-1-ilciclohexanona (2)	129
6.1.1.3. 2-fluoro-6-naftalen-1-ilciclohexanona (5)	130
6.1.1.4. 2,2-difluoro-6-naftalen-1-ilciclohexanona (7)	131

6.1.1.5. 2,2,6-trifluoro-6-naftalen-1-ilciclohexanona (9).....	132
6.1.1.6. 2-fluoro-2-naftalen-1-ilciclohexanona (10).....	133
6.1.1.7. 2-Bromo-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptà (11).....	134
6.1.1.8. 2-(Naftalen-1-iloxi)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12a).....	134
6.1.1.9. 2-(4-Benzilfenoxi)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12b).....	135
6.1.1.10. 2-(Naftalen-2-ilsulfanil)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12c).....	136
6.1.1.11. 2-(3-Deciloxifenoxi)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12d).....	136
6.1.1.12. 4-(7-Oxabicyclo[4.1.0]hept-2-iloxi)benzoic àcid al·lil ester (12e).....	137
6.1.1.13. 2-[4-(2-Metoxietil)fenoxi]-6-(naftalen-1-iloxi)ciclohexanol (13a).....	137
6.1.1.14. 2,6-Bis(naftalen-1-iloxi)ciclohexanol (13b).....	138
6.1.1.15. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-nitrofenoxi)ciclohexanol (13c).....	139
6.1.1.16. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzaldehyd (13d).....	139
6.1.1.17. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-trifluorometoxifenoxi)ciclohexanol (13e).....	140
6.1.1.18. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzaldehyd (13f).....	141
6.1.1.19. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat de metil (13g).....	141
6.1.1.20. 4-[3-(3-Deciloxifenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzoat de metil (13h).....	142
6.1.1.21. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-2-ilsulfanil)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (13i).....	142
6.1.1.22. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (13j).....	143
6.1.1.23. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (13j').....	144
6.1.1.24. 4-[3-(3-Deciloxifenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (13k).....	144
6.1.1.25. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (13l).....	145
6.1.1.26. 4-{2-Hidroxi-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]ciclohexiloxi}benzoat d'al·lil (13m).....	146
6.1.1.27. 4-[2-Hidroxi-3-(fenantren-9-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (13n).....	146
6.1.1.28. 2-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-6-(naftalen-1-iloxi)ciclohexanona (14a).....	147
6.1.1.29. 2,6-bis(naftalen-1-iloxi)ciclohexanona (14b).....	148
6.1.1.30. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-nitrofenoxi)ciclohexanona (14c).....	148
6.1.1.31. 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzaldehyd (14d).....	149
6.1.1.32. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-trifluorometoxifenoxi)ciclohexanona (14e).....	150
6.1.1.33. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzaldehyd (14f).....	150
6.1.1.34. 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat de metil (14g).....	151
6.1.1.35. 4-[3-(4-Deciloxifenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat de metil (14h).....	152
6.1.1.36. 4-[3-(Naftalen-2-ilsulfanil)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14i).....	152
6.1.1.37. 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14j).....	153
6.1.1.38. 4-[3-(4-Deciloxifenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14k).....	154
6.1.1.39. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14l).....	154
6.1.1.40. 4-{3-[4-(2-Metoxietil)fenoxi]-2-oxociclohexiloxi}benzoat d'al·lil (14m).....	155
6.1.1.41. 4-[2-Oxo-3-(fenantren-9-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14n).....	155
6.1.1.42. àcid 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (15a).....	156
6.1.1.43. àcid 4-[3-(Naftalen-2-ilsulfanil)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (15b).....	157
6.1.1.44. àcid 4-[3-(4-Deciloxifenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (15c).....	158

6.1.1.45. àcid 4-{3-[4-(2-metoxietil)-fenoxi]-2-oxociclohexiloxi}benzoic (15d)	158
6.1.1.46. àcid 4-[3-(3-benzilfenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (15e).....	159
6.1.1.47. àcid 4-[2-oxo-3-(fenantren-9-iloxi)ciclohexiloxi]benzoic (15f)	159
6.1.1.48. 2-(Naftalen-1-iloxi)ciclohexanona (16a)	160
6.1.1.49. 2-(3-Benzilfenoxi)ciclohexanona (16b).....	161
6.1.1.50. 2-[3-(2-Metoxietil)fenoxi]ciclohexanona (16c)	162
6.1.1.51. 2-(3-Propilfenoxi)ciclohexanona (16d).....	162
6.1.1.52. 2-(Benzo[1,3]dioxol-4-iloxi)ciclohexanona (16e)	163
6.1.1.53. 2-Fenoxiciclohexanona (16f)	163
6.1.1.54. 2-(Naftalen-2-ilsulfanil)-7-oxabicciclo[4.1.0]heptà (16g)	164
6.1.2. Síntesi d'anàlegs de Substrat	165
6.1.2.1. (S)-4-((hexadeciltio)metil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilat de tert-butil (17).....	165
6.1.2.2. (2S)-2-amino-3-(hexadeciltio)propan-1-ol (18)	165
6.1.2.3. (S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-ilcarboxilat de tert-butil (19).....	166
6.1.2.4. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)heptanamida (20a).....	167
6.1.2.5. (2R)-2-(4-clorofenil)-N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-3-metilbutanamida (R-20b) i (2S)-2-(4-clorofenil)-N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-3-metilbutanamida (S-20b).....	168
6.1.2.6. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-3,5,5-trimetilhexanamida (20c)	169
6.1.2.7. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-2-(naftalen-1-il)acetamida (20d).....	170
6.1.2.8. 4-tert-butil-N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)benzamida (20e)	171
6.1.2.9. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)palmitamida (20f).....	171
6.1.2.10. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-2-oxooctanamida (20g).....	172
6.1.2.11. (S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-ilcarboxilat de fenetil (20h).....	172
6.1.2.12. (S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-ilcarboxilat de decil (20i)	173
6.1.2.13. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)metilsulfonamida (20j).....	174
6.1.2.14. 1-(hexadeciltio)-2-(tert-butiloxicarbonilaminodeoxi)-3-[(2'-bromoetil)-fosfo]-sn-glicerol (21).....	174
6.1.2.15. 1-(hexadeciltio)-2-(tert-butiloxicarbonilaminodeoxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (23).....	175
6.1.2.16. 1-(hexadeciltio)-2-(heptanoilamino)-sn-glicero-3-fosfocolina (24a).....	176
6.1.2.17. 1-(hexadeciltio)-2-(2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoilamino)-sn-glicero-3-fosfocolina (24b)	176
6.1.2.18. 1-(hexadeciltio)-2-(3,5,5-trimetilhexanoilamino)-sn-glicero-3-fosfocolina (24c)	177
6.1.2.19. 1-(hexadeciltio)-2-[(naftalen-8-il)acetoilamino]-sn-glicero-3-fosfocolina (24d)	178
6.1.2.20. 1-(hexadeciltio)-2-(4-tert-butilbenzoilamino)-sn-glicero-3-fosfocolina (24e).....	178
6.1.2.21. 1-(hexadeciltio)-2-(hexadecilamino)-sn-glicero-3-fosfocolina (24f)	179
6.1.2.22. 1-(hexadeciltio)-2-(2-oxooctanoilamino)-sn-glicero-3-fosfocolina (24g).....	180
6.1.2.23. 1-(hexadeciltio)-2-(2-feniletiloxicarbonilaminodeoxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (24h)... 180	
6.1.2.24. 1-(hexadeciltio)-2-(deciloxicarbonilaminodeoxi)-sn-glicero-3-fosfocolina (24i).....	181
6.1.2.25. 1-(hexadeciltio)-2-(metilsulfonamido)-sn-glicero-3-fosfocolina (24j)	182

6.1.2.26. Desprotecció de 1-(hexadeciltio)-2-(tert-butiloxicarbonilamino-deoxi)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (23TFA).....	182
6.1.2.27. 1-(hexadeciltio)-2-(2-oxooctanoilamino)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24g).....	183
6.1.2.28. 1-(hexadeciltio)-2-(5-fenilpentanoilamino)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24k).....	183
6.1.2.29. 1-(hexadeciltio)-2-(2-hidroxiocetanoilamino)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24l).....	184
6.1.2.30. 1-(hexadeciltio)-2-(palmitoilamino)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24f).....	184
6.1.2.31. 1-(hexadeciltio)-2-(hexiloxicarbonilaminodeoxi)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24m).....	185
6.1.2.32. 1-(hexadeciltio)-2-(butilsulfonamido)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24n).....	186
6.1.2.33. 1-(hexadeciltio)-2-(octilsulfonamido)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24o).....	186
6.1.2.34. 1-(hexadeciltio)-2-(2-hidroxiocetilamino)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24p).....	187
6.1.2.35. 1-(hexadeciltio)-2-(ocetilamino)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (24q).....	188
6.1.2.36. 1 <i>H</i> -imidazole-1-carboxilat de (<i>S</i>)-2-(heptanamido)-3-(hexadecil-tio)-propil (25).....	189
6.1.2.37. 2-(dimetilamino)etilcarboxilat de (<i>S</i>)-2-(heptanamido)-3-(hexa-deciltio)-propil (26).....	189
6.1.3. Síntesi d'anàlegs de ceramida.....	190
6.1.3.1. (4 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)-4-(2-(hexadeciltio)-1-hidroxi-etil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilat de <i>tert</i> -butil (27).....	190
6.1.3.2. (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxi-butan-2-ilcarboxilat de <i>tert</i> -butil (28).....	191
6.1.3.3. (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-amino-4-(hexadeciltio)butan-1,3-diol (29).....	191
6.1.3.4. <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxi-butan-2-il)pivalàmida (30a).....	192
6.1.3.5. <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxi-butan-2-il)octanamida (30b).....	193
6.1.3.6. <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxi-butan-2-il)-2-oxooctanamida (30c).....	194
6.1.3.7. <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)pivalàmida (31).....	194
6.1.3.8. <i>N</i> -((<i>E</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il)pivalàmida (32).....	195
6.1.3.9. <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-4-(hexadecilsulfonil)-1,3-dihidroxi-butan-2-il)pivalàmida (33).....	196
6.1.3.10. <i>N</i> -((<i>S</i>)-3-(heptadecilsulfonil)-1-hidroxi-propan-2-il)heptanamida (34).....	196
6.1.3.11. <i>N</i> -((<i>S</i>)-3-(heptadecilsulfonil)-1-hidroxi-propan-2-il)heptanamida (35).....	197
6.2. Metodologia utilitzada en biologia molecular i expressió proteïnes:.....	198
6.2.1. Anàlisi aminoacídica de la seqüència.....	198
6.2.2. Material biològic i condicions de cultiu:.....	201
6.2.2.1. Soques bacterianes:.....	201
6.2.2.2. Medi de Cultiu:.....	201
6.2.2.3. Solucions utilitzades:.....	201
6.2.2.4. Antibiótics:.....	203
6.2.3. Vectors i Construccions:.....	203
6.2.3.1. Vectors:.....	203
6.2.3.2. Construccions:.....	204
6.2.4. Reacció en Cadena de Polimerasa (PCR).....	204
6.2.5. Digestió de DNA amb enzims de restricció.....	205
6.2.6. Lligació de fragments de DNA:.....	205
6.2.7. Transformació:.....	205

6.2.8. Obtenció de cDNA a partir de les colònies d'una placa (Miniprep).....	206
6.2.9. Condicions d'expressió:.....	206
6.2.10. Anàlisi per Western-Blot:	206
6.2.11. Expressió de siPLA amb l'addició de BEL	207
6.3. Assaigs d'inhibició.....	208
6.3.1. fosfolipasa independent de Calci (iPLA ₂).....	208
6.3.2. fosfolipasa citosòlica dependent de Calci (cPLA ₂).....	208
7. BIBLIOGRAFIA	209
8. ANNEX.....	215

AA:	àcid araquidònic
Ar:	anell aromàtic
Asp:	àcid aspàrtic
BEL:	3-(1-Naftil)-6(<i>E</i>)-(bromometilen)-tetrahidropiran-2-ona
cPLA ₂ :	fosfolipasa A ₂ citosòlica
d:	doblet (RMN)
DABCO:	1,4-Diazabicycle[2.2.2]octà
dd:	doblet de doblets (RMN)
ddd:	doblet de doblets de doblet (RMN)
DHA:	àcid docosahexaenoic
DHCD:	dihidroceramida dessaturada
DIPA:	diisopropilamina
DMAP:	dimetilaminopiridina
DMF:	dimetilaminoformamida
EDC:	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EFA:	àcids grassos essencials (essential fatty acids)
EPA:	àcid eicosapentaenoic
GT11:	<i>N</i> -[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-2-hidroxi-1-hidroximetil-2-(2-tridecil-1-ciclopropenil)etil]-octanamida
His:	Histidina
HOBt:	1-hidroxibenzotriazola
HPLC:	cromatografia líquida d'alta resolució
iPLA ₂ :	fosfolipasa A ₂ independent de calci
LDA:	diisopropiletilamina
Lis:	lisina
MAFP:	araquidonil fluorofosfonat de metil
Nu:	nucleòfil
PAF:	factor d'activació de plaquetes (1- <i>O</i> -alquil-2-acetil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina)
PCR:	reacció en cadena de polimerasa
PLA ₂ :	fosfolipasa A ₂
PUFA:	àcids grassos poliinsaturats
RMN:	ressonància magnètica nuclear
sPLA ₂ :	fosfolipasa A ₂ secretada
Ser:	serina
SMS:	esfingomielina sintasa
t:	triplet (RMN)
td:	triplet de doblet (RMN)
THF:	tetrahidrofurà

1. Introducció

1.1. Els fosfolípids

Els fosfolípids són una classe de lípids saponificables, formats per un esquelet de glicerol en el que dos alcohols d'aquest es troben esterificats per dos àcids grassos, i el tercer forma un enllaç fosfodiester amb un grup polar.

Normalment l'àcid gras de la posició 1 (*sn*-1) és un àcid gras saturat de cadena llarga, mentre que l'àcid de la posició *sn*-2 sol ésser un àcid gras insaturat.

En els fosfolípids es troba generalment un d'aquests quatre grups polars: colina, serina, inositol i etanolamina.

Pel seu caràcter amfipàtic els fosfolípids s'agrupen en forma de bicapes i són constituents de la membrana cel·lular.

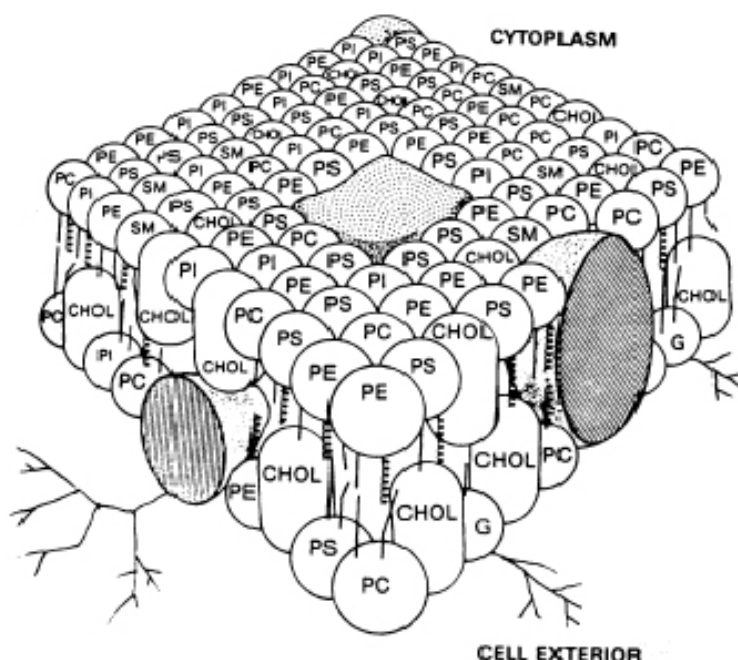


Figura 1. Representació d'una membrana cel·lular. Es pot observar que està formada majoritàriament per una bicapa de fosfolípids amb diferents grups polars (PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, PS, fosfatidilserina).

1.2. Les fosfolipases

Les fosfolipases són els enzims que catalitzen la hidròlisi dels fosfolípids. Es classifiquen segons la posició on actuen. Així les fosfolipases A₁ i A₂ catalitzen la hidròlisi dels àcids grassos de la posició *sn*-1 i *sn*-2 de l'esquelet de glicerol i les

fosfolipases C i D catalitzen la hidròlisi de l'enllaç ester fosfòric de la posició *sn*-3. Veure figura 2.

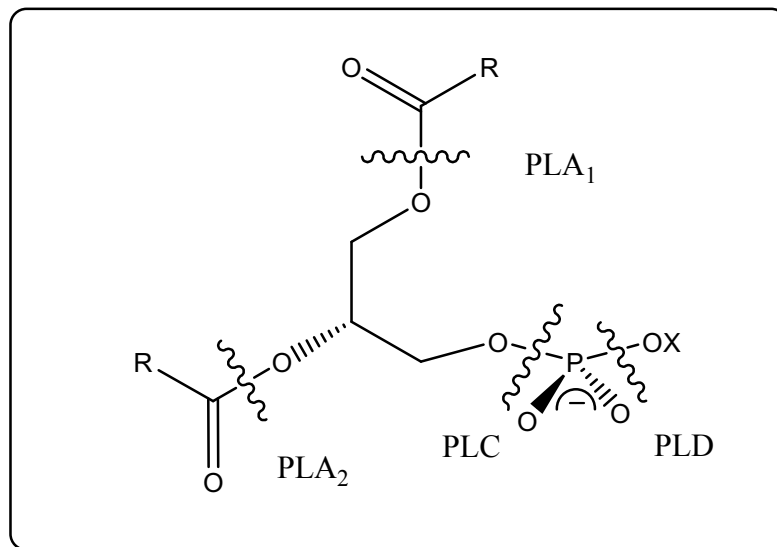


Figura 2. Representació d'un fosfolípid (esquelet de glicerol esterificat amb dos àcids grassos i un grup fosfat amb un grup polar (X)) i els punts a on actuen les diferents fosfolipases.

L'objectiu d'aquest treball s'ha centrat en les fosfolipases A₂ (PLA₂) que, com s'ha esmentat anteriorment, catalitzen la hidròlisi dels fosfolípids en la posició *sn*-2 generant un lisofosfolípid i un àcid gras.

La PLA₂ està implicada en processos inflamatoris perquè regula la síntesi de missatgers pro-inflamatoris (prostaglandines, leucotriens, ...) cap a la ciclooxigenasa (COX) i lipoxigenasa. En la última dècada s'han realitzant diferents estudis per purificar, seqüenciar i caracteritzar enzims amb activitat PLA₂. Fins al moment, s'han descrit 14 diferents grups de fosfolipasa segons la seqüència de nucleòtids del gen que codifica per la proteïna. No obstant, clàssicament les PLA₂s de mamífers s'han classificat en secretades (grups IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X i XII), citosòliques dependents de Ca²⁺ (grups IVA, IVB i IVC) i citosòliques independents de Ca²⁺ (grups VIA-1, VIA-2 i VIB). D'aquestes només unes poques han estat estudiades amb suficient detall per elucidar el seu paper en l'alliberament d'àcid araquidònic (AA) i la producció de eicosanoids en cèl·lules de mamífers.

<i>Famílies</i>	<i>Enzims^a</i>	<i>Altres noms</i>	<i>Mida (kDa)</i>	<i>Necessitat Ca²⁺</i>	<i>Domini Catalític</i>	
sPLA ₂	IB	PLA ₂ pancreàtica	14	mM	Díade His/Asp	
	IIA	PLA ₂ sinovial	14	mM	Díade His/Asp	
	IIC		15	mM	Díade His/Asp	
	IID		14	mM	Díade His/Asp	
	IIE		14	mM	Díade His/Asp	
	IIF		16	mM	Díade His/Asp	
	V		14	mM	Díade His/Asp	
	X		14	mM	Díade His/Asp	
	III		55	mM	Díade His/Asp	
	XII		19	mM	Díade His/Asp	
	cPLA ₂	IVA	cPLA ₂ α	85	<μM	Díade Ser/Asp
		IVB	cPLA ₂ β	110	<μM	Díade Ser/Asp
IVC		cPLA ₂ γ	60	No	Díade Ser/Asp	
iPLA ₂	VIA	iPLA ₂ β	85-88 ^b	No	Tríade Ser/His/Asp	
	VIB	iPLA ₂ γ	90	No	Tríade Ser/His/Asp	
PAF-AH	VIIA	Plasma PAF-AH	45	No	Tríade Ser/His/Asp	
	VIIIB	PAF-AH-II	40	No	Tríade Ser/His/Asp	
	VIIIA	PAF-AH-I _{α1}	30	No	Tríade Ser/His/Asp	
	VIIIB	PAF-AH-I _{α2}	30	No	Tríade Ser/His/Asp	

Figura 3. Classificació de les diferents fosfolipases conegudes en sPLA₂, cPLA₂, iPLA₂ i PAF.¹ a) d'acord amb la classificació de Dennis. b) pesos de dues variants VIA-1 i VIA-2.

1.2.1. Fosfolipasa secretada de tipus A₂ (sPLA₂)

Els enzims excretats (sPLA₂) del pàncrees, verins, i cèl·lules inflamatòries són els que estan millor caracteritzats.² Aquest enzims són petits (pes molecular ~14kDa), i presenten dos dominis conservats, un d'unió a calci (XCGXGG) i el domini del centre catalític (DXCCXXHD).¹ Necessiten de la presència de quantitats mil·limolars de Ca²⁺ com a cofactor catalític però no per la unió de l'enzim a la membrana. Les millors condicions d'hidròlisi tenen lloc a pH 7-9. Presenten una estructura molt rígida per la presència de entre 5 i 8 enllaços disulfur. Això confereix a aquests enzims estabilitat enfront proteases i resistència a la desnaturalització, així poden mantenir la seva activitat en els fluids extracel·lulars a on ells es troben.

En general les sPLA₂s no presenten selectivitat enfront la naturalesa dels diferents tipus de grups polars units al fosfolípid, excepte el grup II que hidrolitza preferentment fosfolípids aniònics³ i el grup X que té certa preferència per fosfatidilcolina, tampoc tenen preferència per l'estructura de la cadena d'àcid gras unida a l'esquelet de glicerol. Es creia que tenien preferència per àcids grassos oxidats, i per tant podien actuar com a reparadors de les membranes oxidades, però estudis més recents han posat en dubte que siguin les sPLA₂s que realitzin aquesta funció.⁴

Estudis mecanístics en diferents laboratoris han demostrat que la catàlisi no té lloc per la formació de l'intermedi clàssic acil-enzim de les esterases de serina.⁵ Les sPLA₂s

utilitzen un residu de d'histidina (His), assistit per un residu d'àcid aspàrtic (Asp), per polaritzar una molècula d'aigua, la qual després ataca al grup carbonil, en aquest procés el Ca^{2+} és necessari per estabilitzar l'estat de transició intermedi (veure figura 4).

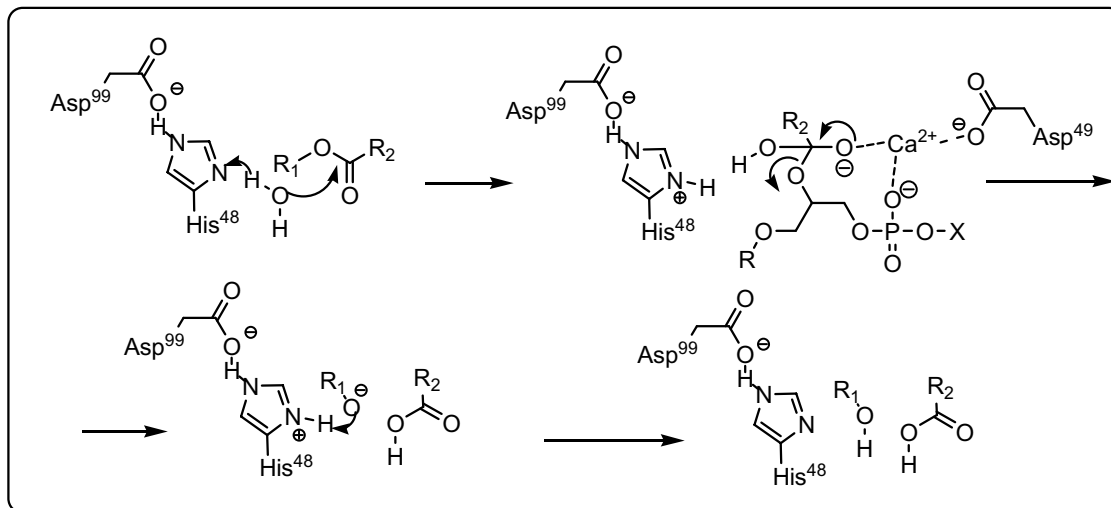


Figura 4. Mecanisme d'hidròlisi de les sPLA₂ en el que actuen una Histidina (His⁴⁸) i un aspartat (Asp⁹⁹) (R₁ = esquelet de fosfolípid, i R₂ = cadena àcid gras). En la segona etapa s'ha dibuixat tota l'estructura del fosfolípid per poder observar com actua l'àtom de Ca²⁺, el qual es troba complexat per la càrrega negativa del grup fosfat i alhora estabilitza la càrrega negativa de l'estat de transició.

Les sPLA₂s tenen diferents funcions segons la cèl·lula o el teixit a on es trobin.⁵ No està molt clar si regulen les quantitats d'AA en les cèl·lules, ja que aquesta funció es creu que la duen a terme les cPLA₂, però també podrien actuar conjuntament. A més d'aquesta possible funció general també hi ha altres funcions característiques dels diferents subgrups:

- les sPLA₂s pancreàtiques participen en la digestió dels fosfolípids en l'intestí.
- les sPLA₂ que es troben en verins també tenen funcions digestives, però a més en molts casos estant directament relacionades amb la toxicitat dels verins.
- les sPLA₂s grup IIA presenten propietats antimicrobianes, principalment en bacteris Gram-positius. La preferència pels fosfolípids aniònics li atorga selectivitat per les membranes bacterianes aniòniques, així aquesta PLA₂ es troba en altres concentracions en els intestins com un sistema innat de defensa. El grup XII és l'únic que presenta activitat remarcable contra el bacteri Gram-negatiu *E.coli*.¹ El rol d'aquests enzims en la degradació de bacteris consisteix en l'alliberament d'histamina, l'activació dels glòbuls vermells i l'alliberament d'àcid araquidònic de la membrana.

A més a més el grup IIA presenta activitat anticoagulant inhibint el factor Xa.

També es creu que alguns grups estant directament relacionats amb algunes patologies inflamatòries, com per exemple la malaltia de Crohn o bé l'asma.

1.2.2. Fosfolipasa citosòlica (cPLA₂)

Les cPLA₂, o grup IVA, tenen una mida major (~85kDa), es troben a la fracció citosòlica de pràcticament tots els tipus cel·lulars que s'han estudiat. Aquests enzims presenten característiques que suggereixen que estan involucrades en cascades de senyalització activant receptors. Es fosforilen per l'acció de les quinases, i això provoca un increment de l'activitat específica. A més a més, les cPLA₂s són capaces de traslladar-se a les membranes en resposta a un increment de Ca²⁺ intracel·lular mitjançant la unió amb el domini CaLB o C-2. Aquest domini s'uneix a dos ions Ca²⁺ i s'uneix preferentment a fosfatidilcolina.³

Presenten preferència pels fosfolípids que contenen àcid araquidònic (AA) i en contrast amb les sPLA₂s, les cPLA₂s no requereixen Ca²⁺ com a cofactor catalític, però sí per interacció amb la membrana.

La purificació del DNA que codifica les cPLA₂ de cèl·lules U937 indica que l'enzim no presenta regions homòlogues a les seqüències de sPLA₂s; a més a més, la seqüència d'aminoàcids presenta 45 residus en la regió amino terminal homòloga a les formes dependents de Ca²⁺ de la proteïna quinasa C i altres proteïnes d'unió a membrana dependents de calci.

Mecanísticament, les cPLA₂s sembla que actuen com una hidrolasa de serina, via un intermedi acil-enzim. Les cPLA₂s es podrien classificar com una nova classe de hidrolases de serina, perquè s'ha demostrat que no hi ha cap histidina essencial per catalisi, per tant enlloc de la clàssica tríade Ser/His/Asp tenen una díade Ser/Asp⁶(veure figura 5).

Les cPLA₂ estan constituïdes per tres isoformes, cPLA₂α, cPLA₂β, cPLA₂γ, les quals es classifiquen en el grup IVA, IVB, i IVC respectivament.³ Aquestes tres isoformes tenen 2 dominis catalítics A i B. La seqüència lipasa, GXSGS, està localitzada en el domini A. cPLA₂α i cPLA₂β tenen un domini C2 N-terminal, el qual és crític per l'associació als fosfolípids de membrana dependent de Ca²⁺.

El domini catalític de cPLA₂α, homòleg a fosfolipases B i lisofosfolipases presenta en el centre actiu una serina, aquesta Ser²²⁸ ataca a l'enllaç ester en posició *sn*-2 dels fosfolípids i Asp⁵⁴⁹ contribueix a l'activació del centre catalític.

La cPLA₂α es troba en tot l'organisme i s'està expressant contínuament en moltes cèl·lules i teixits. cPLA₂α presenta selectivitat remarcable cap a fosfolípids que contenen AA a la posició *sn*-2. També actua com a *sn*-1 lisofosfolipasa i transacilasa, no obstant la funció biològica d'aquestes activitats no està clara.

La màxima activació de cPLA₂α requereix fosforilació de les serines 505 i 727. Durant l'apoptosi la caspasa-3 fragmenta la proteïna en l'Asp⁵²², separant els dos aminoàcids essencials de la díade i per tant provocant la pèrdua d'activitat.

La principal funció de les cPLA₂ és la regulació d'AA. L'AA és el precursor d'una gran família de compostos coneguts com eicosanoids, la qual compren prostaglandines i leucotriens.² Els eicosanoids presenten un ampli ventall d'activitats biològiques, ja que modulen diferents senyals associats amb els processos inflamatoris. L'aspirina i altres fàrmacs antiinflamatoris actuen en aquest sentit inhibint la síntesi de prostaglandines a partir d'AA.

A més de la biosíntesi d'eicosanoids, la cPLA₂ també juga un altre paper important en la inflamació ja que l'altre component alliberat, el 2-lisofosfolípid, és utilitzat en alguns casos per la síntesi del factor d'activació de plaquetes (platelet-activating factor, PAF, 1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), un altre potent modulador inflamatori. Per aquest motiu hi ha molts estudis i la síntesi de molts potencials inhibidors d'aquesta fosfolipasa.

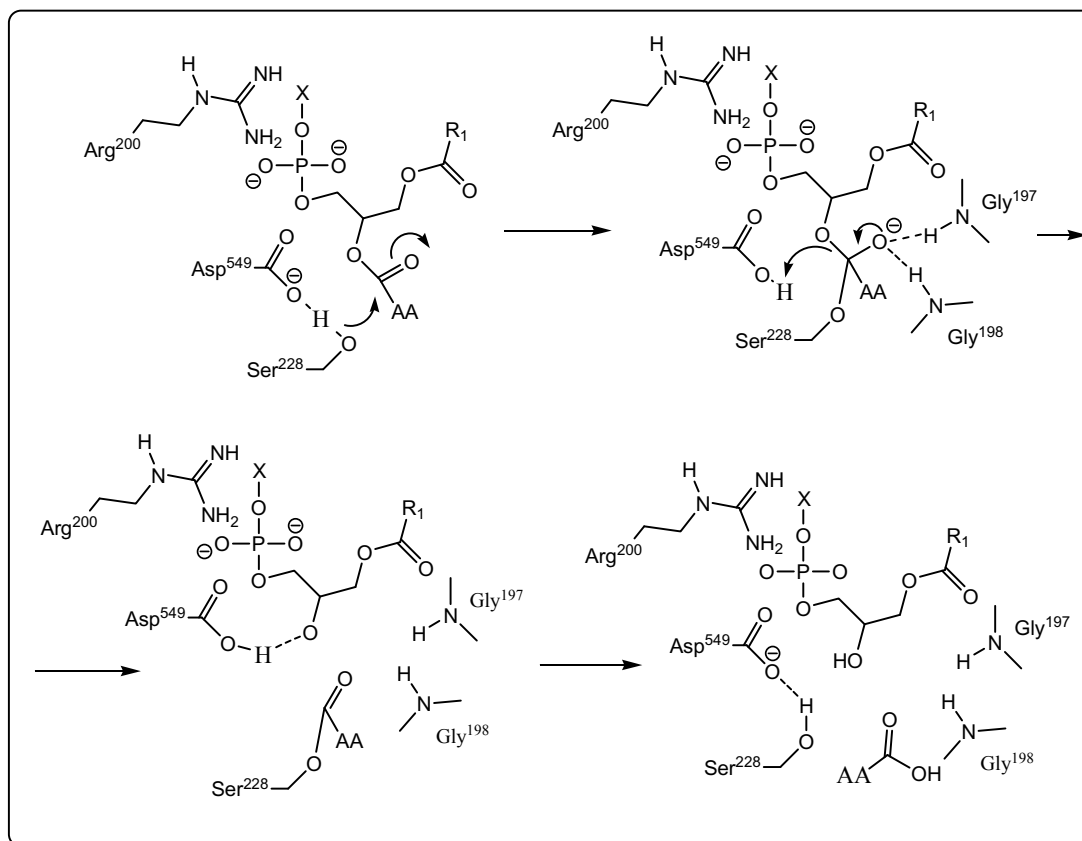


Figura 5. Mecanisme d'hidròlisi d'una cPLA₂ (cPLA₂α) en el que actua la díada catalítica Ser/Asp i s'observen que dues glicines també estabilitzen l'estat de transició.

1.2.3. Fosfolipasa citosòlica independent de calci (iPLA₂)

El 1992 es va identificar una nova fosfolipasa independent de calci (iPLA₂) en el citosol de cèl·lules del miocardi. Encara que s'han observat diverses activitats PLA₂ independents de Ca²⁺ en diferents teixits i homogenats de cèl·lules,⁷ només s'han seqüenciat i caracteritzat amb detall les PLA₂ grup VIA⁸ i VIB.

Aquest grup comparteix característiques amb les sPLA₂ i altres amb les cPLA₂. Igual com les sPLA₂, iPLA₂ no presenta especificitat per substrats que contenen AA i tampoc presenta modificacions covalents posttranscripcionals. Les iPLA₂ comparteixen mida, localització intracel·lular, i potser característiques del mecanisme catalític amb les cPLA₂⁸. A part de les necessitats de Ca²⁺, la principal diferència amb les cPLA₂ és la presència d'uns motius, a l'extrem N-terminal, anomenats repeticions d'anquirines (*ankyrin repeats*).⁹⁻¹¹

En analogia amb la cPLA₂, la iPLA₂ també actua com una hidrolasa de serina, però amb el residu de Ser localitzat en la seqüència GX SXG, que és comú en altres lipases⁸⁻¹⁰ entre elles el PAF o PLA₂ VII, en la qual aquesta serina forma part d'una tríade

Ser/His/Asp(veure figura 3), no obstant fins al moment no s'han pogut detectar els aminoàcids essencials en aquesta fosfolipasa a part de la Ser465¹².

Hi ha diferents isoformes d'aquesta PLA₂. iPLA₂-VIA-1 és una proteïna de 85 kDa que conté vuit repeticions d'anquirina en la regió N-terminal seguida d'un motiu lipasa (GX₂SXG) mencionat anteriorment, a on Ser⁴⁶⁵ actua com a aminoàcid nucleofilic. iPLA₂-VIA-2, una isoforma de 88 kDa, presenta bàsicament la mateixa estructura primària que l'anterior però la unitat de 8 repeticions d'anquirina està fragmentada per 54 aminoàcids addicionals.

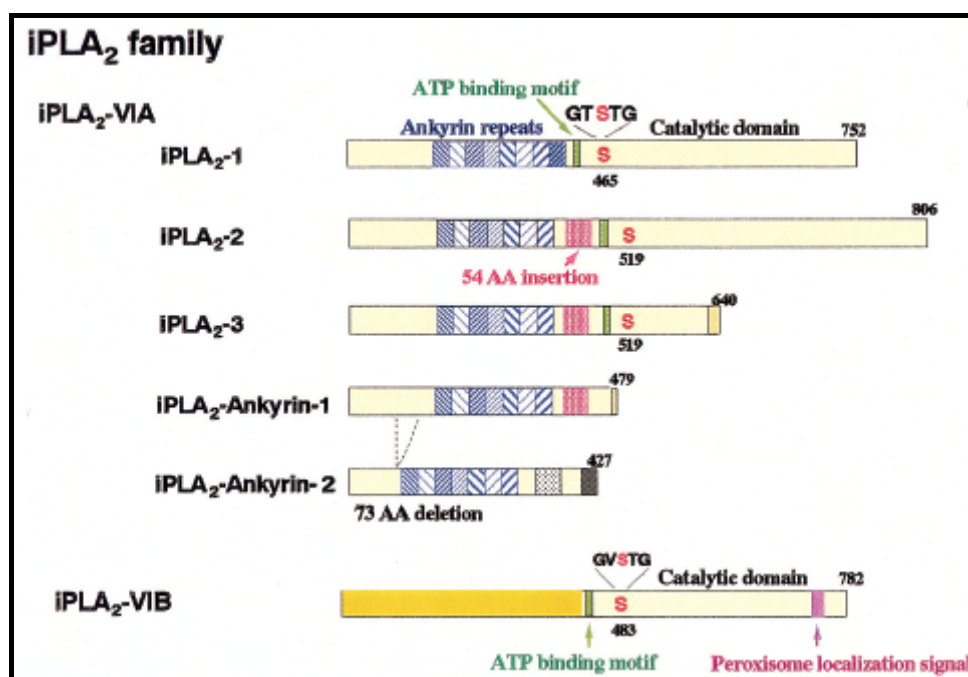


Figura 6. Diferents subgrups de la fosfolipasa independent de calci VI (iPLA₂).

Ambdós s'expressen en múltiples teixits, actuen en absència de Ca²⁺ i no presenten selectivitat per l'àcid gras de la posició *sn*-2 on actuen, ni pel cap polar unit al grup fosfat de la posició *sn*-3.

iPLA₂-VIA-1 presenta activitat *sn*-1 lisofosfolipasa, transacilasa i PAF-AH (PAF-acetilhidrolasa). El descobriment de l'activitat transacilasa proporciona més evidències per un mecanisme que transcorre per un intermedi acil-enzim. L'enzim primer ataca al carbonil de l'àcid gras per formar un intermedi acil-enzim; llavors la competència entre l'aigua o un altre lisofosfolípid que actuin com a nucleòfils sobre aquest intermedi resultarà en la hidròlisi de l'àcid gras o la transacilació cap a un altre fosfolípid.¹³ La inhibició d'aquest enzim per diferents inhibidors d'esterases de serina i que la mutació

de la Ser⁴⁶⁵ provoca la pèrdua d'activitat confirma que aquest mecanisme transcorre per un intermedi acil-serina.

Les altres proteïnes del grup VIA (3, ankyrin1 i ankyrin2) no presenten tot el domini catalític complet i per tant no tenen activitat fosfolipasa. No obstant, presenten les repeticions d'anquirines que es creu que estan involucrats en les interaccions proteïna-proteïna, així aquests fragments interaccionen amb el complex oligomèric i modulen l'activitat de iPLA₂, ja que aquesta sembla ser que actua en forma de tetràmer.¹⁴ Això es va demostrar cotransfectant iPLA₂-VIA i ankyrin-1 conduint a una disminució de la meitat de l'activitat de la iPLA₂-VIA transfectada sola.¹⁵

La principal funció de la iPLA₂ VIA és la remodelació dels fosfolípids de membrana (*fosfolipid remodelling*).^{8,16,17}

A la cèl·lula hi ha un cicle de desacilació/reacilació dels fosfolípids de membrana, conegut com el cicle de Lands,¹⁸ a on un fosfolípid existent és hidrolitzat per una PLA₂ intracel·lular generant un 2-lisofosfolípid, el qual pot tornar a ser reacilat amb diferents àcids grassos per generar un nou fosfolípid. Aquest procés de remodelació constitueix la principal ruta per la qual s'incorpora l'AA en els fosfolípids de les cèl·lules. També hi ha una segona ruta, ruta *de novo* o via de Kennedy; però aquesta via només és rellevant quan es disposen de concentracions micromolars d'AA lliure.

Així la incorporació d'AA en condicions normals és depenent de la fosfolipasa que proporciona els 2-lisofosfolípids. Aquest procés és independent de Ca²⁺, suggerint que iPLA₂ està implicada. Estudis amb inhibidors de iPLA₂ (BEL o inhibidors antisentit (*antisense*)), demostren aquest fet. Per tant aquest enzim regula la principal via per la qual s'incorpora l'AA i altres àcids grassos poliinsaturats (PUFA) en els fosfolípids de membrana. A més de la importància en el metabolisme cel·lular, el grau d'incorporació d'AA en els fosfolípids també determina la quantitat d'AA lliure que hi ha a les cèl·lules en condicions normals. Això és important perquè AA lliure és un factor limitant en la biosíntesi dels eicosanoids.

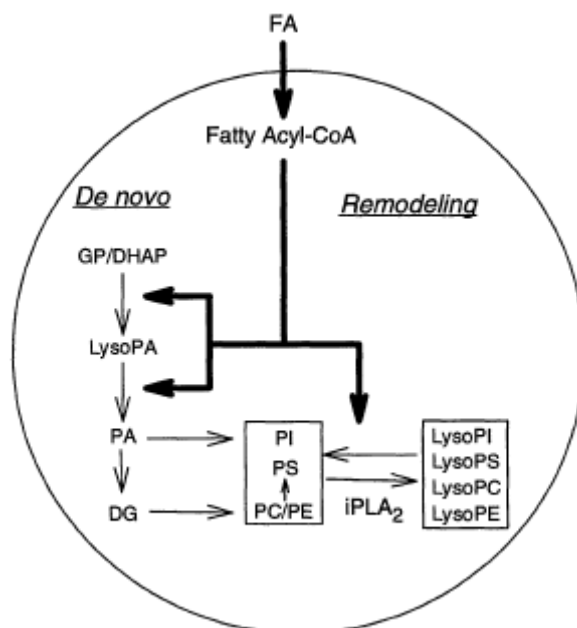


Figura 7. Dos possibles camins per sintetitzar els fosfolípids, la remodelació dels fosfolípids existents i la síntesi de novo.

En cèl·lules apoptòtiques, iPLA₂-VIA és fragmentada per caspases sobre la posició Asp¹⁸³, el qual resulta en una activació de l'enzim i un increment en l'alliberament d'àcids grassos. Aquest efecte sembla ser el responsable dels canvis que experimenta la membrana durant l'apoptosis.³

1.2.4. Inhibidors de les diferents PLA₂

El paper de la PLA₂ en el sistema nerviós central no està encara ben definit, provocat per la complexitat en l'expressió dels diferents grups de PLA₂ en el sistema i la necessitat d'inhibidors específics per cada grup de PLA₂.

En condicions fisiològiques PLA₂ està involucrada principalment en remodelació dels fosfolípids de membrana, destoxicació de peròxids de fosfolípids i l'alliberament de neurotransmissors. No obstant, en condicions patològiques, l'increment de l'activitat PLA₂ resulta en una pèrdua de glicerofosfolípids essencials de membrana provocant alteracions en la permeabilitat de la membrana, homeòstasi, increment de l'alliberament de àcids grassos, i acumulació de peròxids de lípids. Aquest procés podria culminar amb dany neuronal que s'observa en isquèmia i en malalties degeneratives com l'Alzheimer.¹⁹ Per això és important disposar d'inhibidors específics per cada grup de PLA₂, per poder estudiar millor tots aquests processos.

Existeixen diferents inhibidors selectius o generals de les diferents fosfolipases. Les sPLA₂s per ésser les primeres PLA₂s que es van detectar i les cPLA₂s per intervenir en els processos inflamatoris són les que s'han estudiat més i per tant s'han desenvolupat més inhibidors de les mateixes. La iPLA₂ en canvi al ésser la última detectada fins al moment, i que tampoc està molt clara la seva intervenció en processos patològics s'ha estudiat molt menys i fins al moment no és disposa de cap inhibidor específic, tal com veurem a continuació.

1.2.4.1. Inhibidors de sPLA₂

Els primers compostos descrits com inhibidors d'aquests enzims foren els fàrmacs antimalàrics (mepacrina); no obstant, aquestes molècules no inhibeixen les sPLA₂s sinó que impedeixen la interacció d'aquests enzims amb el substrat o amb el Ca²⁺.

Uns altres compostos no específics i inhibidors covalents que s'han utilitzat són la manoalida²⁰ i el bromur de *p*-bromofenacil.²¹ Aquests compostos inhibeixen les sPLA₂s *in vitro*, i no inhibeixen cPLA₂ ni iPLA₂, això és degut a la reactivitat d'aquests compostos amb els residus de His o Lis del centre actiu de les sPLA₂s. Per aquest fet aquests compostos poden reaccionar amb moltes altres proteïnes que continguin aquests aminoàcids en el centre actiu, fet que fa impossible treure conclusions sobre els seus efectes. No obstant en moltes publicacions es parla erròniament del bromur de *p*-bromofenacil com un inhibidor selectiu de sPLA₂.

Una altra sèrie de compostos que inhibeixen les sPLA₂ són els anàlegs de fosfolípids²²⁻²⁴ i anàlegs fosfats de l'estat de transició.²⁵ Desafortunadament, cap d'aquests presenten activitats remarcables tan *in vitro* com *in vivo*.

LY311727 és l'inhibidor més específic que s'ha desenvolupat fins al moment.²⁶ Aquest compost s'uneix a concentracions nanomolars i és selectiu per sPLA₂ IIA sobre IIB, no obstant normalment tampoc és necessari distingir entre aquests dos enzims. Més endavant s'ha observat que tot i està descrit com a selectiu per sPLA₂ IIA, també inhibeix el grup sPLA₂ V.²⁷

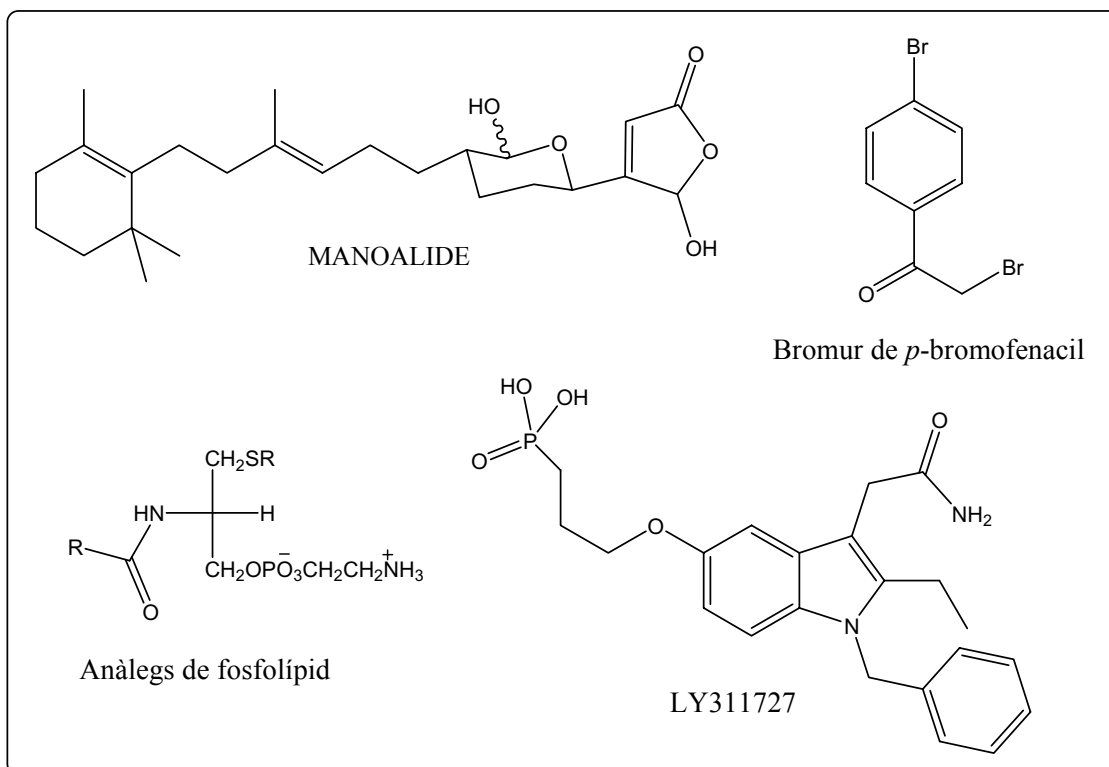


Figura 8. Diferents inhibidors de sPLA₂.

1.2.4.2. Inhibidors de cPLA₂

S'han utilitzat en molts estudis dos inhibidors de cPLA₂ (AACOCF₃ i MAFP²⁸). Aquests dos compostos presenten la mateixa estructura, una cadena d'àcid araquidònic acoblada a un grup que reaccioni amb una serina, aquest grup pot ser una trifluorometilcetona o un fluorofosfat. La principal diferència entre aquests enzims és que mentre les trifluorometilketones són inhibidors reversibles, el MAFP és un inhibidor irreversible que fosforila la serina del centre actiu. Desafortunadament aquests dos compostos també inhibeixen iPLA₂. Això no és una sorpresa ja que les dues fosfolipases presenten una serina catalítica.

L'any 2000 Seno i col·laboradors van observar que derivats de pirrolidina amb la presència del grup tiazolidinediona (pirrolidina-1 i pirrofenona)²⁹ eren bons inhibidors de cPLA₂ i selectius respecte iPLA₂. Actualment aquests dos compostos són els que s'utilitzen en diferents assaigs per distingir entre aquestes dues fosfolipases.

També s'han sintetitzat diferents anàlegs de substrat en que s'ha substituït el grup fosfat per un grup àcid carboxílic,³⁰ i recentment s'han obtingut alguns d'aquests compostos

que inhibeixen cPLA₂ i iPLA₂, però també n'hi ha algun que és selectiu i només inhibeix cPLA₂.³¹

També es va desenvolupar un altre tipus d'inhibidors de cPLA₂ basats en un esquelet de 2-propanona,^{32,33} en que també s'utilitza un grup àcid carboxílic que mimetitzi el grup fosfat, però la seva reactivitat sobre iPLA₂ no està descrita.

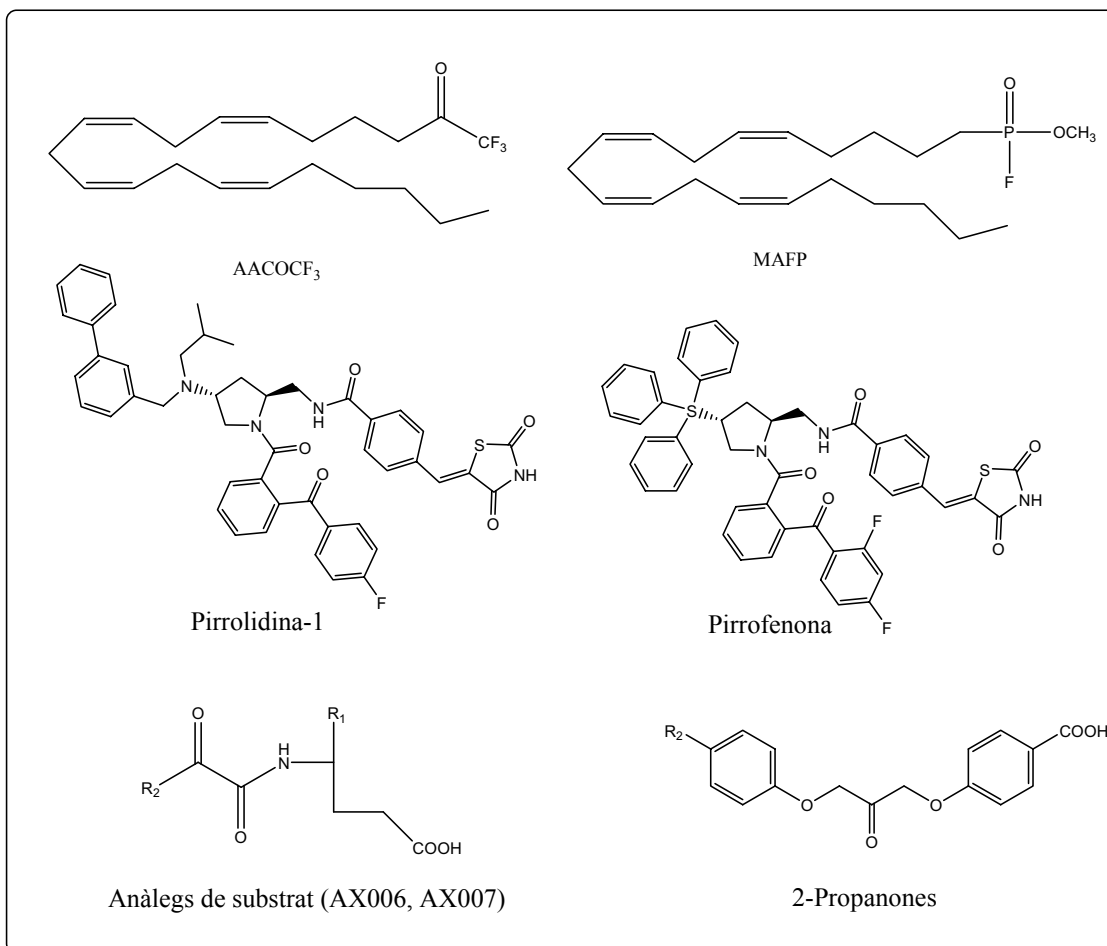


Figura 9. Diferents inhibidors de cPLA₂.

1.2.4.3. Inhibidors de iPLA₂

Aquesta PLA₂ s'inhibeix, tal com s'ha vist anteriorment, pels inhibidors de cPLA₂ (AACOCF₃ i MAFP).

Així en estudis per distingir entre aquestes dues proteïnes s'utilitzen aquests compostos junt amb una bromoenol lactona, coneguda com BEL, que actua com a substrat suïcida i és selectiu per iPLA₂ respecte a altres fosfolipases. El mecanisme d'inhibició consisteix en l'obertura de la lactona mitjançant la serina del centre actiu, així és forma una α-bromocetona que reacciona amb un aminoàcid desconegut del centre actiu i forma un

enllaç covalent no hidrolitzable que no permet l'entrada de cap més molècula de substrat. Aquesta estratègia va ser desenvolupada per Rando el 1974,³⁴ i més endavant es van sintetitzar diverses haloenol lactones, entre elles BEL com a inhibidors de diferents proteases de serina,^{35,36} l'any 1991 Hazen i col·laboradors van observar que BEL inhibia irreversiblement iPLA₂ i era mil vegades més reactiva sobre aquest enzim que no sobre la cPLA₂.³⁷ Recentment s'ha publicat un treball en el que s'afirma que diferents residus de cisteïna serien els responsables d'aquesta interacció irreversible.³⁸

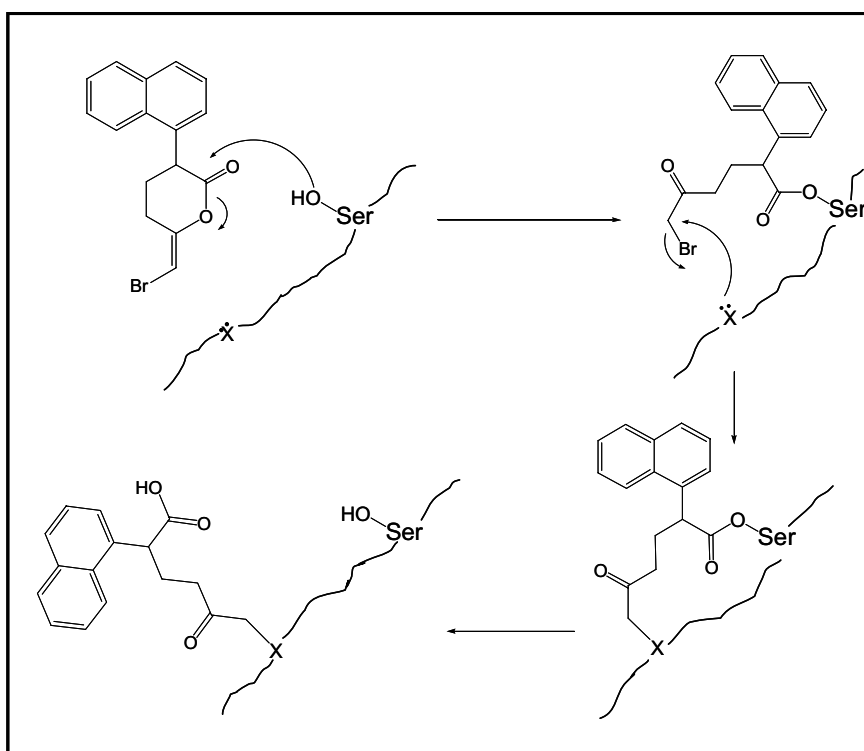


Figura 10. Mecanisme d'inhibició de BEL sobre iPLA₂. Primer reacciona amb la serina del centre catalític, l'obertura de la lactona proporciona una α -bromocetona que és susceptible d'un atac d'un altre aminoàcid proper al centre actiu formant un enllaç covalent irreversible.

No obstant BEL presenta diferents inconvenients, el primer és que és un inhibidor irreversible, per aquestes condicions es pot utilitzar en estudis al laboratori però no és útil per a una possible teràpia farmacològica. A més a més, s'ha observat que BEL també inhibeix un altre enzim clau en el metabolisme fosfolipídic (PAP-1, fosfohidrolasa fosfatídica dependent de calci)^{16,39} i provoca apoptosi en diferents línies cel·lulars activant les procaspases 3 i 9.⁴⁰

També s'ha observat que alguns anàlegs de substrat són bons inhibidors per aquest enzim, però de moment no se n'ha obtingut cap de selectiu respecte cPLA₂.³¹

1.3. Hipòtesi fosfolípídica de la esquizofrènia

1.3.1. Esquizofrènia

L'esquizofrènia és un desordre mental caracteritzat per defectes continus en la percepció o expressió de la realitat. Un pacient d'esquizofrènia normalment presenta pensaments desordenats, il·lusions i al·lucinacions auditives. No obstant, aquests primers desordres sobre la cognició poden contribuir a problemes crònics sobre les emocions i la conducta. Com hi ha moltes possibles combinacions de símptomes, és difícil dir si es tracta d'un sol desordre psiquiàtric, així el psiquiatre Eugen Bleuler les anomenà les malalties esquizofrèniques. La paraula esquizofrènia prové del terme *schizo* (en grec significa dividir) i el terme *phrēn* que significa ment; va ésser utilitzada per Eugen Bleuler per referir-se a la falta d'interacció entre el procés de pensament i la percepció. *“Els pacients que jo he observat no responen a les situacions com ells haurien; ells estan espantats per alguna cosa que no està allà, en canvi es mostren indiferents a la realitat. És com si ells tinguessin la ment dividida”*. A pesar de l'etimologia no s'ha de confondre amb els desordres de doble personalitat.

El diagnòstic es basa en les experiències personals dels pacients combinades amb senyals secundaris observats per psiquiatres. No existeix un test biològic per l'esquizofrènia, encara que hi ha estudis que suggereixen que tant efectes genètics com bioquímics podrien contribuir al desenvolupament de la malaltia. La recerca actual està bàsicament centrada en la neurobiologia ja que de moment no s'ha trobat una causa orgànica identificable.

Els símptomes es poden dividir en positius i negatius. Els positius són bàsicament al·lucinacions, falses creences i els símptomes negatius més corrents són la falta de motivació, pobresa en el llenguatge, manca d'emocions o emocions inapropiades.

1.3.2. La hipòtesis de Horrobin

El neuroendocrinòleg britànic David Horrobin (1939-2003) que va ocupar el càrrec, durant diversos anys, de president de la Associació Britànica d'Esquizofrènia va mantenir, des dels anys 70, que la causa de la esquizofrènia era un metabolisme anormal

dels àcids grassos essencials i va ser el primer en suggerir el tractament amb àcids grassos omega-3 (ω -3).⁴¹

El Dr. Horrobin havia observat que els pacients esquizofrènics rarament patien artritis o altres malalties inflamatòries, i tenien més alt el llindar del dolor, els seus símptomes psicopàtics desapareixien quan tenien febre i retornaven quan la febre disminuïa; els seus eritròcits eren deficientes en alguns àcids grassos ω -3 i ω -6. Ell va relacionar tota aquesta informació amb els àcids grassos essencials araquidònic (AA), docosahexaenoic (DHA) i eicosapentaenoic (EPA), i amb les proteïnes de les membranes cel·lulars. Aquests àcids grassos i diferents proteïnes són bàsics en el desenvolupament de les funcions cognitives, intel·lectuals i creatives del cervell.

Aquestes conclusions podrien indicar que el problema de l'esquizofrènia no és a causa dels neurotransmissors, que envien senyals entre les cèl·lules i el sistema nerviós, sinó el metabolisme anormal dels fosfolípids de membrana.

Així l'any 1994 va postular la hipòtesi de membrana de l'esquizofrènia.⁴² Aquesta suggereix que la esquizofrènia és un desordre en el qual el metabolisme i l'estructura dels fosfolípids de la membrana estan alterats, principalment en el cervell, però també en altres teixits.

1.3.2.1. Estructura de la Membrana Neuronal

Les neurones, igual que tota la resta de cèl·lules, tenen una membrana lipídica; aquesta és responsable de regular l'activitat neuronal, controlant l'acció i l'alliberament de neurotransmissors en els llocs pre- i post-sinàptics. Les membranes, les quals estan formades per fosfolípids i colesterol en diferents formes, contenen diverses proteïnes com ara, receptors, canals iònics, enzims, i components del sistema de missatgers secundaris. La configuració i acció bioquímica de totes aquestes proteïnes està modulada per la composició dels lípids de la membrana a la que estan unides.

Les membranes cel·lulars estan formades per fosfolípids que estant units formant una bicapa lipídica, en la qual les cadenes d'àcids grassos hidrofòbics queden a l'interior de la membrana mentre que els caps polars hidrofílics estant en contacte amb els fluids extra o intracel·lulars.

Els àcids grassos poden ser saturats o contenir entre 1 i 6 insaturacions. En general els àcids grassos saturats formen membranes més estables i rígides, i com més

insaturacions presenten, la membrana és més flexible i més fàcilment degradable. A més la inserció de molècules de colesterol dins l'estructura de la membrana també confereix més rigidesa i estabilitat a la mateixa.

Els fosfolípids, colesterol, àcids grassos saturats i monoinsaturats poden tots ells ésser sintetitzats en el cos. En canvi, els àcids grassos essencials poliinsaturats (EFA, essential fatty acids), que també formen part de la membrana no poden ser sintetitzats en el cos mitjançant la síntesi *de novo*. Si per alguna raó aquests no són proporcionats en el cos mitjançant la dieta, l'estructura de la membrana esdevé anormal, més rígida i el comportament cel·lular difereix de l'habitual.

1.3.2.2. Metabolisme dels EFAs:

Hi ha dotze EFAs agrupats en dues series: ω -6 (o n-6) i ω -3 (o n-3), les quals no són interconvertibles en mamífers. Els compostos a partir dels quals es poden sintetitzar tots ells, àcid linoleic (18:2n-6) i α -linolènic (18:3n-3) són abundants en dietes normals; i són dirigits cap al fetge a on són metabolitzats amb una seqüència de reaccions a tota la resta d'àcids ω -3 i ω -6, en aquest procés es produeixen diverses insaturacions i a més a més s'allarguen les cadenes introduint parelles d'àtoms de carboni.⁴³ (veure figura 11).

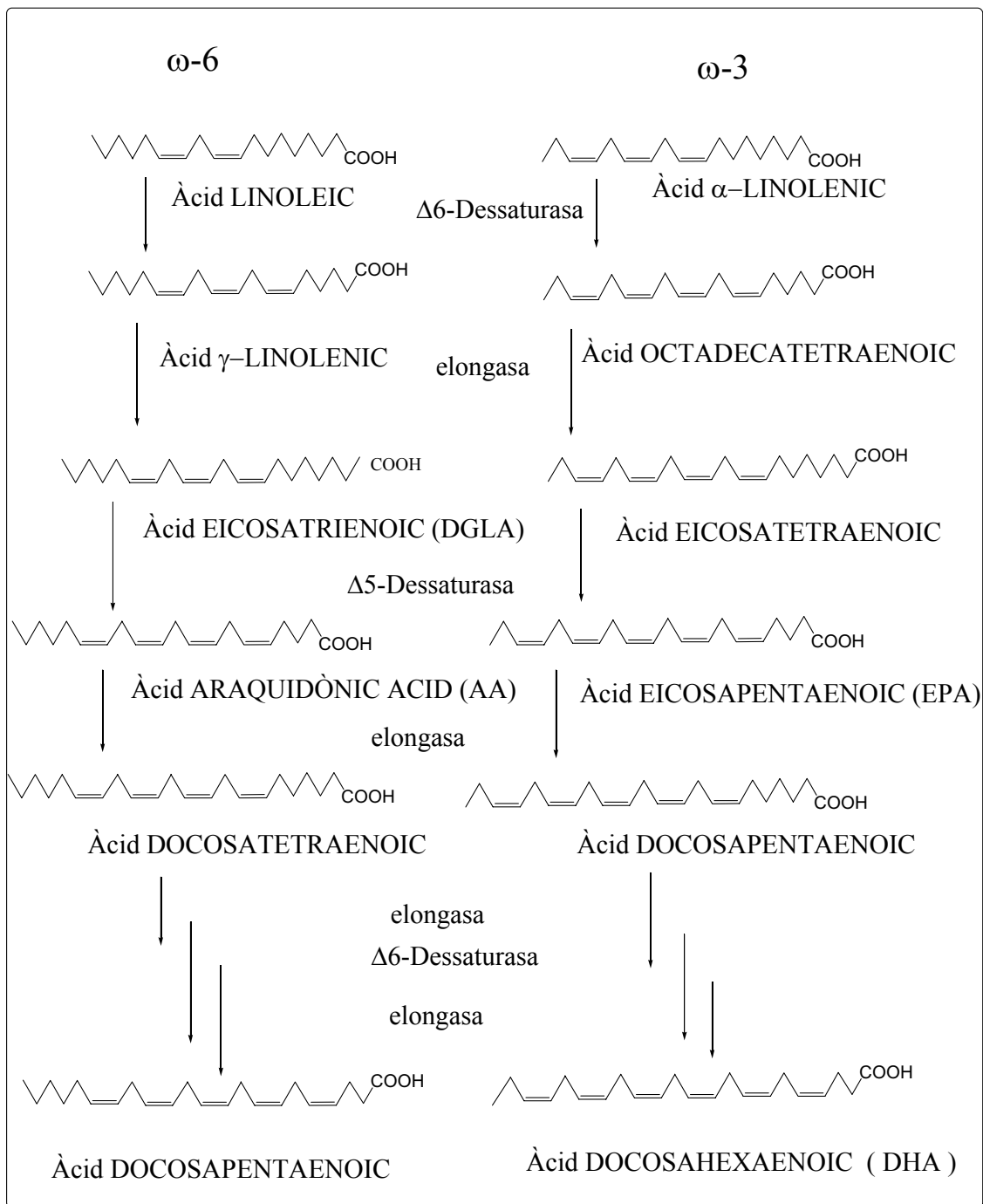


Figura 11. Biosíntesi dels àcids grassos essencials en el fetge a partir dels precursors linoleic i α-linolènic.

En general les reaccions d'allargament són ràpides, mentre que les reaccions de dessaturació són més lentes i susceptibles a ser alterades. L'etapa limitant és la primera, la dessaturació en delta-6. Aquesta és dependent de diversos cofactors, incloent zinc, NADPH, i probablement ferro, i està regulada hormonalment.

En mamífers l'envelliment provoca una pèrdua de l'activitat Δ-6 dessaturasa, mentre que això no té lloc en humans. També s'ha observat que baixos nivells d'alcohol

estimulen mentre que altes concentracions inhibeixen aquesta activitat; igualment fumar sembla reduir la conversió dels àcids linoleic i linolènic als seus metabòlits; aquest fet també s'observa en diferents infeccions virals.

L'àcid linoleic és un component important de moltes membranes, excepte les membranes del cervell; aquestes estant constituïdes per sis EFAs, però dos d'ells, àcid araquidònic (AA) i docosahexaenoic (DHA) són molt més abundants; entre els dos constitueixen el 20% del pes sec del cervell.

Els EFAs no només són importants en l'estructura de la membrana; ells mateixos o els seus metabòlits poden desenvolupar un ampli ventall d'accions a nivells de missatgers secundaris (regulació de quinases, les prostaglandines, formades a partir dels EFAs produeixen diferents accions necessàries, però també altres d'indesitjables,...).

En el context de l'esquizofrènia també és important observar els efectes que la membrana pot provocar en les funcions dels receptors. Així un simple canvi en l'estructura de la membrana podria produir canvis en el comportament de tots els tipus de receptors associats a la membrana en qüestió; així mateix un simple canvi en l'estructura de la membrana neuronal podria alterar la conducta i la resposta de qualsevol sistema de neurotransmissors.

En aquest sentit s'ha observat que la manca d'àcids grassos de les series n-3 i n-6 comporta grans canvis en l'activitat dopaminèrgica del cervell.

Mentre que els àcids grassos saturats no poden ser directament oxidats, els àcids grassos insaturats poden ser destruïts mitjançant un procés d'oxidació; i a major nombre d'insaturacions menor és l'estabilitat d'aquests àcids. Per minimitzar el dany, el cos ha elaborat un sistema per prevenir el procés d'oxidació i per eliminar els productes oxidats que s'hagin pogut formar. La vitamina E és el principal antioxidant en les membranes cel·lulars, aquest pot ser regenerat per un procés cíclic en el que intervé l'àcid ascòrbic. En els pacients esquizofrènics també s'ha observat que una disminució en el dany oxidatiu disminueix els símptomes dels mateixos.

1.3.2.3. Hipòtesi de membrana:

La hipòtesi de membrana postulada per Horrobin⁴² es pot construir en tres nivells, cadascun d'ells més específic i precís, però alhora menys segura és la seva hipòtesi.

Primer nivell: L'esquizofrènia és deguda a una anomalia bioquímica de la membrana provocant un canvi en l'estructura de les membranes de tot el cos, no només del sistema nerviós central.

Segon nivell: Aquesta anomalia bioquímica de la membrana és una alteració del camí pel qual els fosfolípids són sintetitzats, incorporats a la membrana i contínuament reorganitzats.

Tercer nivell: aquesta alteració modifica la incorporació dels EFAs en la reorganització de les membranes i el procés en el qual aquests àcids són metabolitzats.

Les anomalies dels EFAs en les membranes dels pacients amb símptomes negatius es troben particularment a la posició *sn-2* dels fosfolípids. Aquests àcids grassos estan subjectes a un procés de remodelació continu durant tota la vida de la membrana. Primer els àcids grassos són hidrolitzats dels fosfolípids per uns enzims coneguts com fosfolipases, seguidament altres àcids grassos són reincorporats a la posició *sn-2* mitjançant l'acció d'aciltransferases.

Aquests dos grups d'enzims podrien ser uns grans candidats a un defecte bioquímic en l'esquizofrènia. Aquest defecte podria ser:

- un dèficit en l'activitat aciltransferasa, la qual no incorporaria els EFAs de 20 i 22 àtoms de carboni a la posició *sn-2* dels fosfolípids.
- o un augment de l'activitat fosfolipasa A₂, la qual específicament hidrolitzaria els EFAs de 20 i 22 àtoms de carboni.

1.3.2.4. Quines fosfolipases estan relacionades amb l'esquizofrènia?

En el moment en que Horrobin va postular aquesta teoria només es coneixien dos grups de fosfolipases, sPLA₂ i cPLA₂, de fet ja s'havien descobert les iPLA₂, però es disposava de poca informació de les mateixes (veure apartat 1.2)

Les cPLA₂ són específiques per la hidròlisi dels fosfolípids que contenen àcid araquidònic a la posició *sn-2*. Aquest grup es troba en els fluids intracel·lulars, és present al cervell, i en aquell moment es creia que estava relacionat amb la remodelació dels fosfolípids de membrana; així que es va pensar en aquest grup com un candidat a estar alterat en pacients esquizofrènics.

No obstant, posteriorment a aquesta teoria, es va observar que la iPLA₂ era la responsable de la remodelació dels fosfolípids de membrana. Així aquest grup sembla el més interessant a estudiar en pacients d'esquizofrènia, per això es va pensar en la síntesi d'inhibidors d'aquest enzim per estudiar la relació entre aquesta fosfolipasa i l'esquizofrènia i a llarg termini poder millorar el nivell de vida dels pacients.

2. Objectius

Tal com s'ha explicat a la introducció les alteracions en el metabolisme dels fosfolípids de membrana podrien ser de gran importància en l'esquizofrènia; i per tant la fosfolipasa A_2 independent de calci podria ser un blanc farmacològic en el tractament d'aquesta malaltia.

En aquest sentit l'objectiu general d'aquest treball és el disseny i la síntesi de nous potencials inhibidors de $iPLA_2$. Per preparar-los es van seguir dues aproximacions, primer sintetitzar anàlegs a un inhibidor conegut (BEL) i segon, preparar anàlegs al substrat natural de l'enzim.

Anàlegs a BEL:

Per fer els anàlegs a l'inhibidor BEL es va decidir mantenir l'anell de 6 membres amb un grup carbonílic electrofílic i un anell aromàtic hidrofòbic, per tal d'intentar conservar la selectivitat sobre $cPLA_2$, però amb diferent funcionalitat per evitar una unió irreversible. Aquestes diferents funcionalitats cal buscar-les en altres inhibidors de fosfolipases, en aquest sentit les trifluorometilcetones són inhibidors molt coneguts de diferents lipases i també en concret de diferents fosfolipases.^{44,45} Les propietats de les trifluorometilcetones són causades pels àtoms de fluor, els quals retiren densitat electrònica del carboni carbonílic; però també es pot aconseguir un carbonil més electrofílic introduint altres funcionalitats als carbonis adjacents a la cetona; així per exemple algunes α,α' -diariloxicetones, estant descrites com a inhibidors de $cPLA_2$,³³ i es creu que poden conduir a una nova sèrie de potencial inhibidors.

Així doncs, els dos primers objectius són la síntesi de les dues famílies de compostos que es mostren en la figura 12

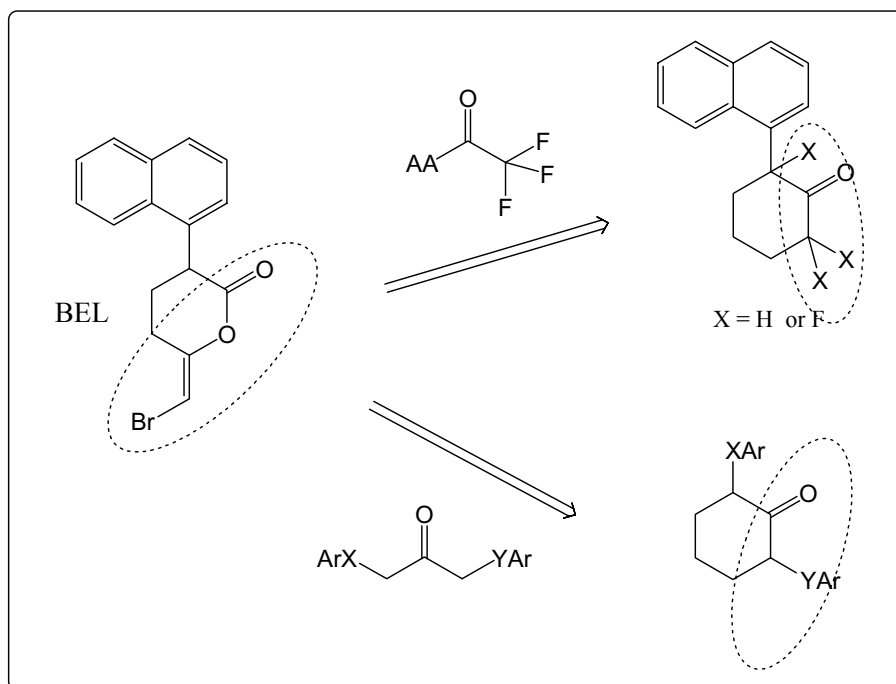


Figura 12. Representació esquemàtica del disseny dels anàlegs a BEL, utilitzant funcionalitats d'altres inhibidors de fosfolipases.

Anàlegs de Substrat:

Una altra estratègia per dissenyar potencials inhibidors és la síntesi d'anàlegs al substrat natural de l'enzim, en el nostre cas, de fosfolípids. Principalment es modifica la funcionalitat que reacciona en el procés enzimàtic; alguns anàlegs similars a aquests han demostrant ésser bons inhibidors d'altres famílies de fosfolipases.^{22,46,47}

Així el tercer objectiu és la síntesi d'anàlegs de substrat amb diferents funcionalitats (amida, carbamat, sulfonamida...) en la posició *sn-2* per intentar aconseguir selectivitat enfront cPLA₂.

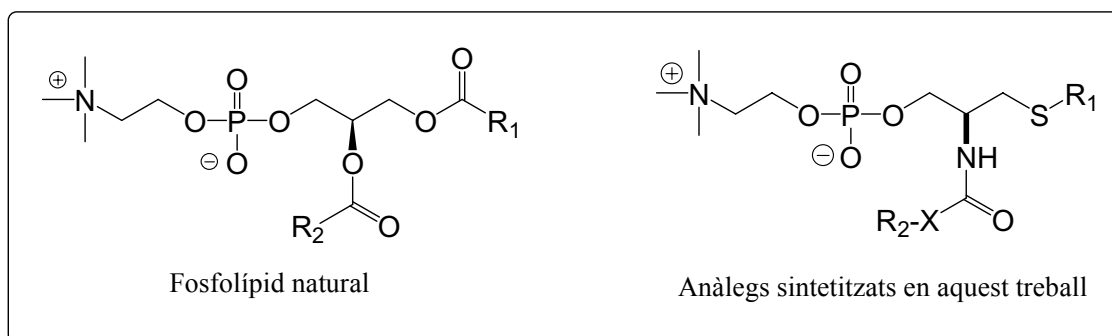


Figura 13. Representació esquemàtica dels anàlegs a substrat a sintetitzar en aquest treball, i d'un fosfolípid natural.

Estudis del centre actiu de la proteïna:

Una de les maneres més eficaces de preparar potencials inhibidors és a partir del coneixement de l'estructura tridimensional de la proteïna i un cop determinada emprar mètodes quimiinformàtics per dissenyar noves molècules, i determinar quins grups funcionals són els que permetran una millor interacció amb el centre actiu.

Així el quart objectiu d'aquesta tesi consisteix en l'expressió de la fosfolipasa independent de calci, o d'un domini que representi el centre catalític, per tal d'obtenir proteïna suficient per a dur a terme estudis de la seva estructura per cristal·lografia de raigs X o fer estudis de "mapping" mitjançant tècniques de HPLC-MS per poder tenir la màxima informació del centre actiu i poder dissenyar nous compostos.

Metabolisme d'esfingolípid:

Finalment, aprofitant el fet que per tal de preparar els anàlegs de fosfolípid es sintetitzen uns compostos que són anàlegs a ceramida, un objectiu nou que va aparèixer durant el transcurs d'aquesta tesi doctoral fou la síntesi d'anàlegs de ceramida com a potencials inhibidors de diferents etapes del metabolisme d'esfingolípid, en un treball en col·laboració amb altres membres del grup de recerca on s'ha portat a terme aquesta tesi doctoral.

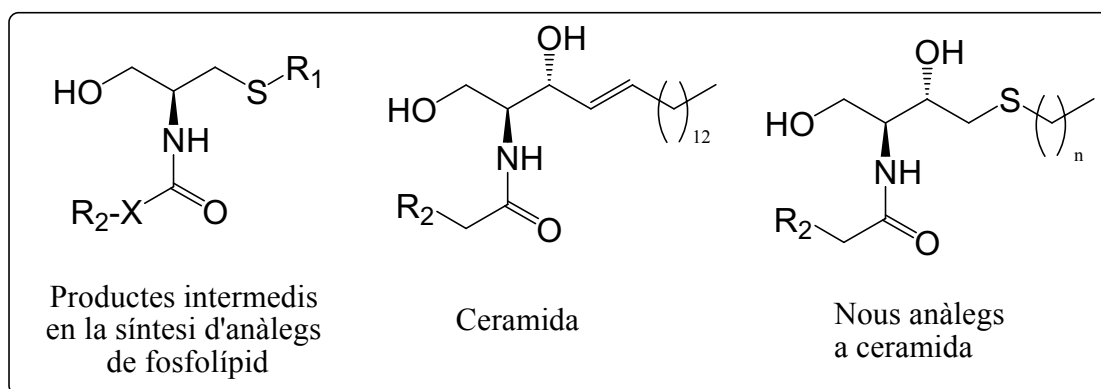


Figura 14. Estructura de la ceramida, dels compostos sintetitzats en aquesta tesi doctoral com a precursors dels anàlegs de fosfolípid i dels nous anàlegs a ceramida sintetitzats en aquest treball.

3. Resultats

3.1. Síntesi d'anàlegs de BEL

3.1.1. Síntesi d'anàlegs fluorats

Tal com s'ha mencionat en els objectius els primers potencials inhibidors que es van dissenyar en el transcurs d'aquesta tesi doctoral van ser uns anàlegs fluorats a BEL. Aquests compostos compartien un esquelet de ciclohexanona, un anell de naftalè igual com BEL, però tenien diferents àtoms de fluor en posició α per tal d'augmentar l'electrofilia del grup carbonílic.

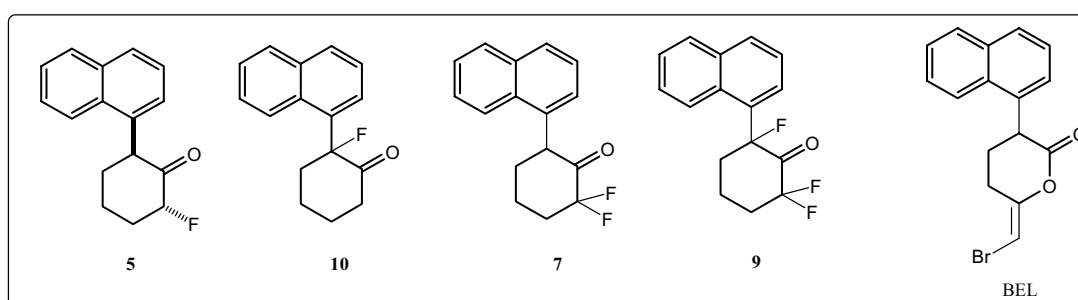


Figura 15. Diferents compostos fluorats com a anàlegs de BEL dissenyats en aquest treball.

3.1.1.1. Anàlisi Sintètic i Estratègia:

Per preparar aquests compostos es necessitava una manera selectiva i eficaç d'introduir els diferents àtoms de fluor, per tant es va realitzar una recerca bibliogràfica dels principals mètodes de fluoració utilitzats en química orgànica.

Per les seves propietats inhibidores de fosfolipases⁴⁴ o altres esterases⁴⁸ o proteases⁴⁹ s'han desenvolupat múltiples síntesis de trifluorometilcetones,^{50,51} no obstant la majoria d'aquestes síntesis no són aplicables per tal d'obtenir els compostos dissenyats, ja que en aquests procediments el grup trifluorometil prové d'un precursor sintètic adient (generalment un derivat de l'àcid trifluoroacètic); per tant no ens permet una síntesi amb diferents àtoms de fluor ni introduir aquests àtoms a un anell tancat.

Històricament l'espècie de fluor que s'ha utilitzat en química és HF, no obstant la conversió directa de l'enllaç CH a CF generalment no és fàcil amb química basada amb HF.

Aquestes dificultats van estimular el desenvolupament de fonts alternatives de fluor positiu (reactius electròfils que es poden utilitzar de manera fàcil i segura en síntesi orgànica).⁵² Els primers reactius emprats com a fonts de fluor positiu van ser el clorat de fluor (FCIO₃), difluorur de xenó (XeF₂), hipofluorit de trifluorometil (CF₃OF), i diversos hipofluorits d'acil i perfluoroacil (RC(O)OF i R_fC(O)OF); aquests compostos presenten la reactivitat típica de F⁺ tant en addicions sobre carbanions i enolats com en la fluoració d'anells aromàtics. Tot i que generalment són més selectius que el F₂, hi ha diverses limitacions que han impedit el seu ampli ús. Així el FCIO₃ s'ha utilitzat en fluoracions d'enolats d'esteroides a escala industrial i al laboratori⁵³, no obstant amb compostos orgànics pot ser un perillós agent oxidant, igual que els hipofluorits. El XeF₂ és un valuós reactiu fluorant al laboratori però per motius econòmics no és aplicable la seva química en processos a gran escala. Finalment CF₃OF és estable a temperatura ambient, però els hipofluorits d'acetil i perfluoroacetil són menys estables i generalment s'han de preparar *in situ*.

A principis dels anys 90 van sorgir una sèrie d'agents fluorants que contenen el grup NF, que van proporcionar una química fàcil, segura, manejable i selectiva.⁵²

Aquests compostos poden ser neutres, R₂NF, o sals d'amoni quaternari, R₃N⁺FA⁻, a on A⁻ és un anió no nucleòfil.

Els fragments organonitrogenats, R₂N i R₃N es van escollir per ser bons grups sortints, i proporcionaven alta reactivitat a l'enllaç nitrogen-fluor en presència de diferents nucleòfils.

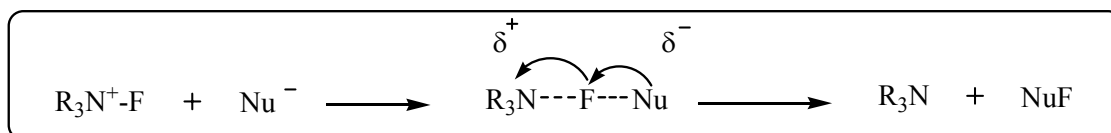


Figura 16. Mecanisme de fluoració dels agents fluorants NF.

Aquests reactius N-fluorants són capaços de reaccionar amb benzè i anells aromàtics activats, carbanions estabilitzats, olefines activades (alquens conjugats amb arils, alquil i sililenol èters, enol acetats i enamines). Aquests agents fluorants de tipus NF no són tan reactius com els compostos mencionats anteriorment si bé presenten avantatges notables que han permès desenvolupar molts reactius diferents d'aquesta família, dels quals alguns són assequibles comercialment.

Així gràcies a aquests reactius hi ha un mètode senzill per obtenir compostos α -fluoro carbonílics que consisteix en la reacció de diferents enolats (metàl·lics, sililenol èters, enamines, enol èters, ...) ⁵⁴ amb un reactiu amb enllaç NF.

En el nostre cas, es va decidir preparar els silil enols èters necessaris i introduir els àtoms de fluor mitjançant un d'aquests agents fluorants (Selectfluor™).

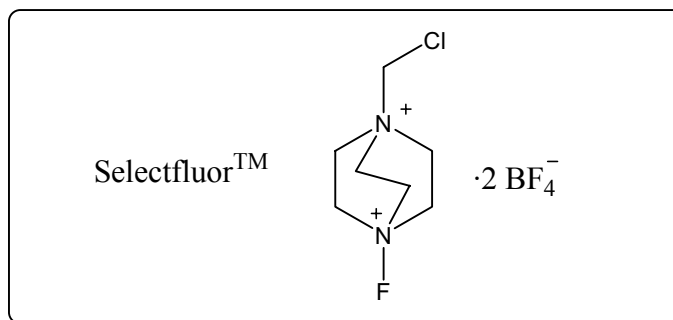


Figura 17. Estructura de l'agent fluorant utilitzat. Es pot veure que el catió F^+ es troba estabilitzat per una amina terciària.

Així utilitzant aquest mètode de fluoració es van preparar els productes desitjats segons l'esquema retrosintètic de la figura 18.

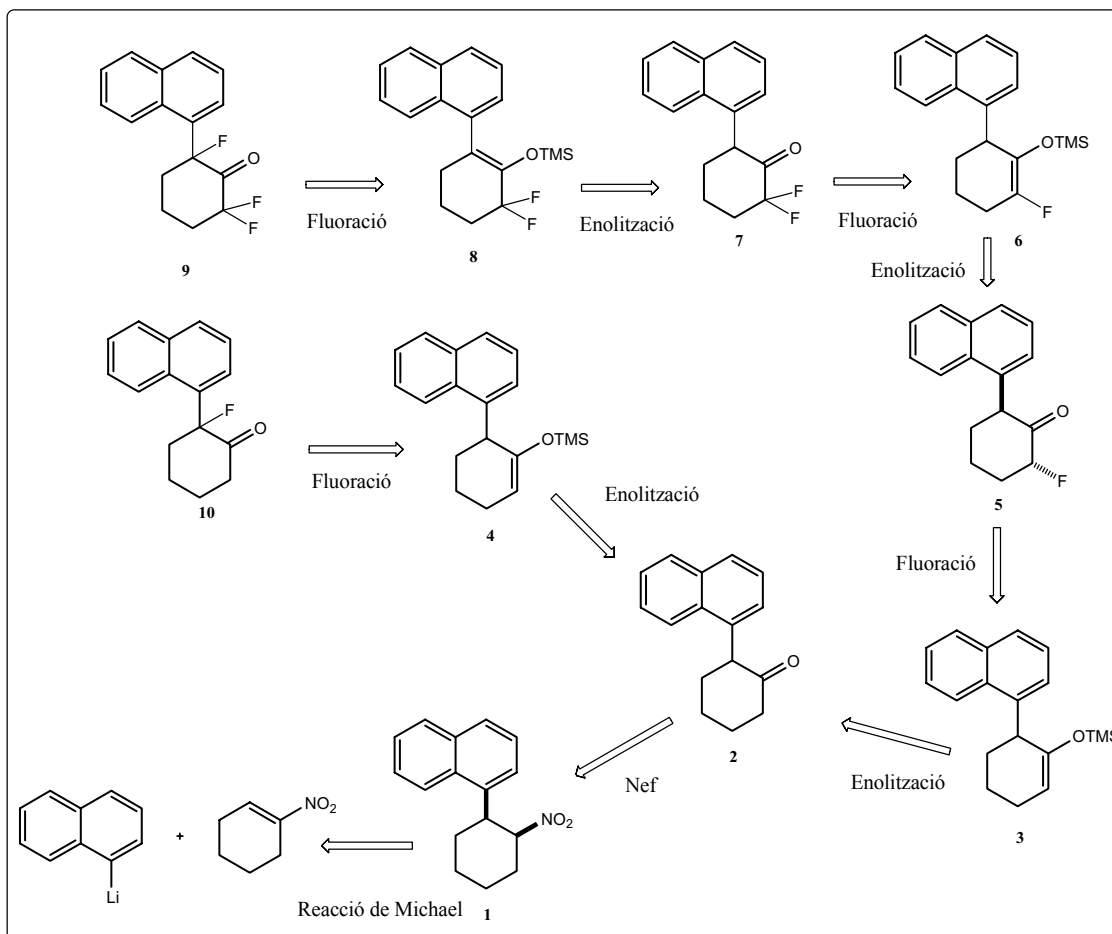


Figura 18. Esquema retrosintètic dels diferents anàlegs fluorats de BEL.

En aquest procés els compostos que presenten diversos àtoms de fluor a la seva estructura provenen de la fluoració a través del sililenol èter d'un compost on ja s'havien introduït altres àtoms de fluor. Tots els compostos fluorats provenen de la mateixa ciclohexanona (**2**), la qual en la primera etapa pot proporcionar dos sililenol èters, un en condicions de control cinètic i l'altre en condicions de control termodinàmic.

La naftilciclohexanona (**2**) es va obtenir seguit la metodologia de Santos i col·laboradors,⁵⁵ a partir del compost comercial 1-nitrociclohexè, en que primer es va realitzar una reacció de tipus Michael i a continuació la transformació del grup nitro a cetona mitjançant una reacció de Nef que va conduir al producte desitjat.

3.1.1.2. Síntesi de la cetona precursora (**2**):

La primera etapa es va realitzar mitjançant una addició de tipus Michael de naftil liti, preparat *in situ*, sobre 1-nitrociclohexè, conduint al compost **1**, amb un rendiment del 70%. Aquesta reacció es va dur a terme diverses vegades amb un rendiments i puresa del cru similars, sempre i quan es controlés molt bé la humitat i la temperatura del sistema, cosa que no va ser sempre fàcil durant els mesos d'estiu.

El naftil liti es va preparar mitjançant una reacció de bescanvi halògen-metall, utilitzant 1-bromonaftalè i *n*-BuLi.

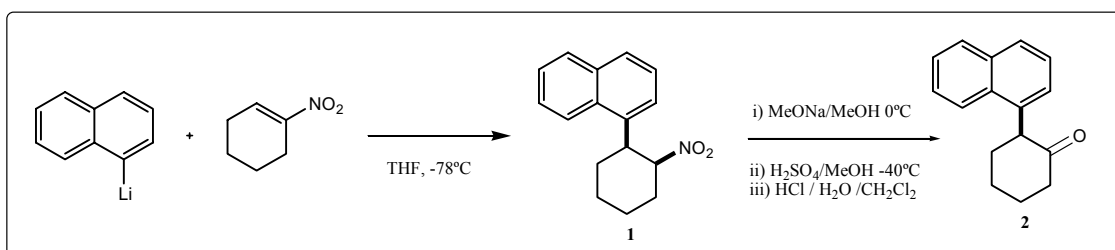


Figura 19. Esquema sintètic per preparar els compostos **1** i **2**.

Cal destacar que com es va partir de compostos aquirals es va obtenir una mescla racèmica, però sempre en configuració relativa *cis*, fet que està d'acord amb la bibliografia.⁵⁶ De totes maneres la configuració relativa obtinguda no era molt important ja que en la següent etapa es va transformar el grup nitro a cetona mitjançant una

reacció de Nef,⁵⁷ que consisteix en una hidròlisi en medi àcid fort del nitronat, generat a partir d'un tractament bàsic d'un nitroalcà.

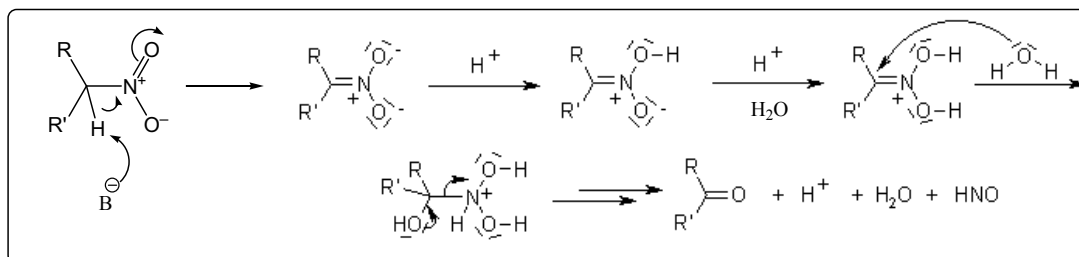


Figura 20. Mecanisme de transformació del nitroalcà a cetona utilitzant les condicions de Nef.

La distribució dels diferents productes en aquesta reacció es troba molt afectada per l'acidesa del sistema.⁵⁸ A $\text{pH} > 1$ es poden formar oximes i altres espècies de tipus hidroxinitroso en quantitats apreciables. Per aquesta raó és necessària una ràpida acidificació del nitronat i això és més fàcil si s'addiciona la sal sobre el medi àcid i no al revés.

La reacció es va dur a terme amb les condicions utilitzades per Hayashi i col·laboradors⁵⁹ conduint al compost **2** amb un rendiment moderat (60%) en un cru de reacció complex, en el qual es troben, segurament, intermedis de reacció (veure figura 20). Aquestes condicions foren en una primera etapa amb MeONa/MeOH a 0°C , seguida d'una addició de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ a -40°C i finalment una hidròlisi mitjançant HCl aquós.

3.1.1.3. Introducció dels àtoms de fluor:

A continuació es van introduir els diferents àtoms de fluor en posició α al carbonil de **2**, per això es va preparar l'enolat de la cetona atrapant-se *in situ* en forma de sililenol èter. Aquest, posteriorment, es va fer reaccionar amb F^+ , el qual es troba estabilitzat amb una amina terciària en el compost comercial SelectfluorTM, formant-se la fluorocetona desitjada.

En funció de les condicions utilitzades en l'enolització, es va poder obtenir l'enol termodinàmic **4**, que es trobava conjugat amb el grup aromàtic, o l'enol cinètic **3**, el qual es va obtenir de l'extracció del protó menys impedit. Per tal d'obtenir el compost de control cinètic es va fer reaccionar **2** amb LDA, preparada *in situ* mitjançant

diisopropilamina i *n*-BuLi, en THF a -78°C .⁶⁰ Per obtenir el compost de control termodinàmic, s'utilitzà trietilamina en DMF a 100°C ,⁶¹ utilitzant ambdós casos els derivats de trimetilsilil de l'enolat. En els dos procediments es van obtenir uns rendiments similars, no obstant, la reacció l'enolització en condicions de control cinètic proporcionava crús de reacció més purs que en el cas de treballar en condicions de control termodinàmic en que es van observar altres subproductes de reacció en petita quantitat que no es van poder caracteritzar.

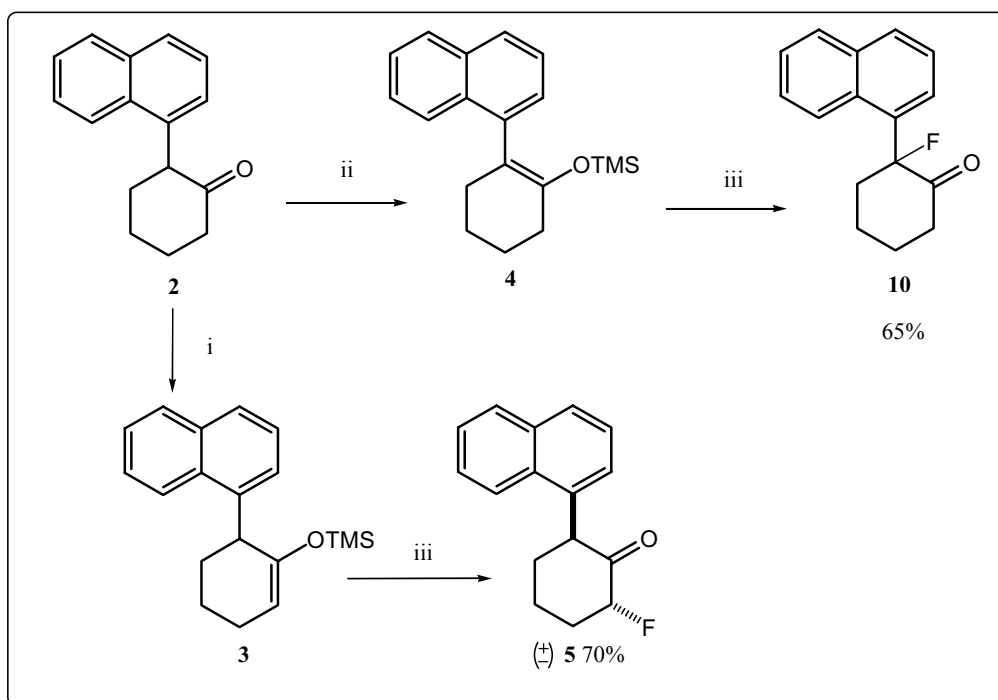


Figura 21. Síntesis de naftilfluorociclohexanones amb un rendiment de fluoració del 65% i del 70%. i) LDA, THF, CH_3SiCl -78°C , ii) DMF, Et_3N , CH_3SiCl 130°C iii) SelectfluorTM, DMF.

Posteriorment la introducció d'un àtom de fluor sobre els èters d'enol sililats va proporcionar les fluorocetones corresponents **5** o **10**, segons l'èter d'enol de partida emprant com a agent fluorant el reactiu comercial SelectfluorTM.⁵²

Cal observar que el compost **10** només presenta un centre estereogènic, i considerant que no es va treballar amb auxiliars o reactius quirals es va obtenir una mescla racèmica. Quan es va fluorar l'èter d'enol cinètic es va generar un nou centre estereogènic, per tant, d'entrada, es podrien obtenir mescles de diastereòmers. No obstant, es van obtenir només una mescla racèmica dels dos enantiòmers que presenten el grup naftil i l'àtom de fluor en configuració relativa *trans*. Això és degut,

probablement, a l'impediment estèric del grup naftil que provoca que el donador de l'àtom de fluor s'aproximi per la cara contrària al mateix.

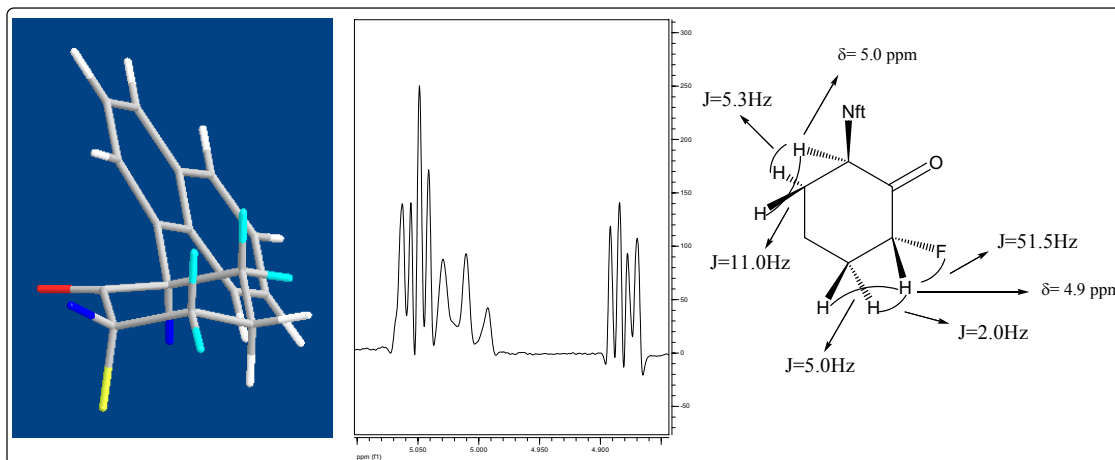


Figura 22. A l'esquerra representació tridimensional del compost **5** (protons es estudi en color blau fosc, protons que acoblen amb ells de color blau clar, fluor en color groc i oxigen en color vermell). Al centre, espectre de ^1H -RMN dels dos protons en posició α respecte la cetona. A la dreta constants d'acoblament observades experimentalment per aquesta molècula.

Com podem veure en la figura 22, tot i la presència d'un carboni sp^2 a l'anell la conformació més estable del compost **5** és una cadira lleugerament distorsionada, en aquesta conformació, l'anell aromàtic es col·loca en posició equatorial, i l'àtom de fluor (color groc en la figura) es col·loca en posició axial. Això està d'acord amb les constants d'acoblament observades per aquesta molècula en el seu espectre de ^1H -RMN.

Es pot veure en l'espectre de ^1H -RMN de **5** que l'àtom d'hidrogen geminal al F presenta una constant d'acoblament gran (51.5Hz), per l'acoblament amb el fluor, això fa que el senyal del mateix es desdobli i presenti dos dobles dobles un a cada extrem de l'espectre. Aquests dobles dobles tenen unes constants d'acoblament petites (5 i 2Mhz), que són típiques d'acoblements axial-equatorial i equatorial-equatorial. Per contra l'àtom d'hidrogen geminal a l'anell aromàtic presenta un doble doblet (el senyal no es resol bé perquè està una mica distorsionat per la presència d'un dels dobles de l'altre protó i un senyal està solapat, es pot veure que hi ha un pic més alt que els altres en l'altre senyal) amb unes constants més grans (11.0Hz i 5.3Hz) típiques d'acoblements axial-axial i axial-equatorial.

A continuació es van introduir, seqüencialment, dos àtoms de fluor sobre la 2-fluoro-6-naftilciclohexanona (**5**), seguint un esquema sintètic molt semblant al utilitzat fins al moment (veure figura 23).

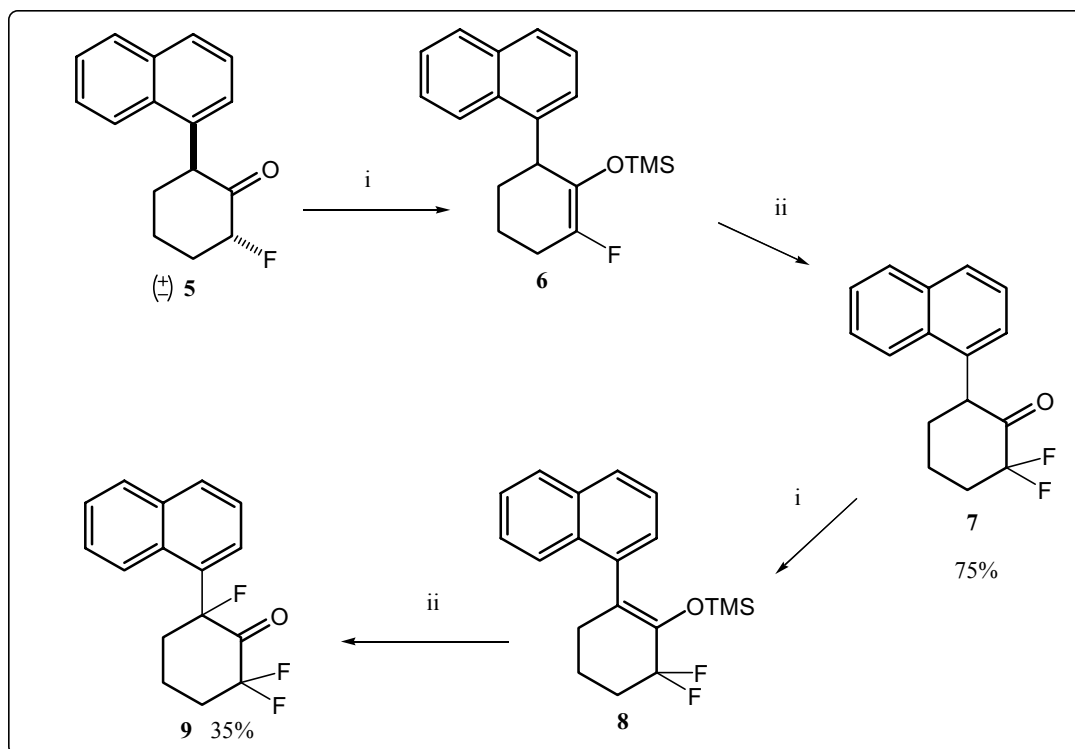


Figura 23. Síntesis de naftilfluorociclohexanones. i) LDA, THF, CH_3SiCl_3 -78°C , ii) SelectfluorTM, DMF.

Es va preparar el sililenol èter de la cetona **5**. Per això, es va utilitzar la mateixa metodologia que utilitza Denmark,⁶⁰ (veure figura 24) que consisteix en preparar una mescla de reacció amb LDA i clorur de trimetilsilil a la que finalment s'addiciona la fluorocetona **5**.

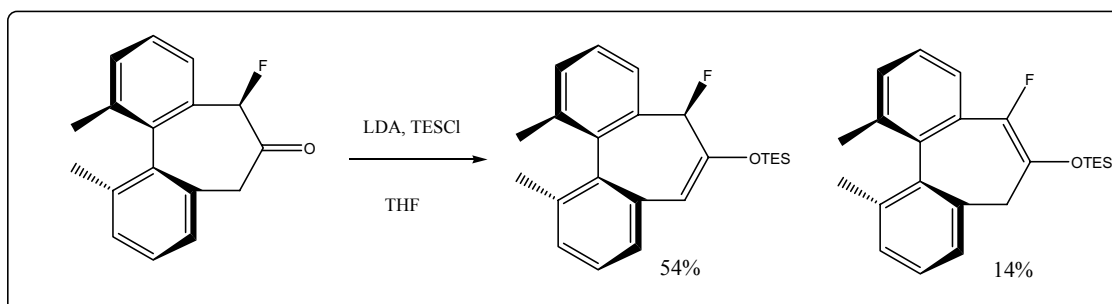


Figura 24. Esquema de síntesi utilitzat per Denmark, en el qual s'obtenen els dos isòmers amb un rendiment del 54 i el 14%.

En la síntesi de Denmark, la reacció no tenia una regioselectivitat total (aprox. 80:20) per tant havien de separar els dos sililenol èters formats mitjançant cromatografia, en el nostre cas això no va ser necessari ja que quan es va emprar aquesta metodologia per generar l'èter d'enol silílic de **5** es va obtenir el compost (**6**) amb total regioselectivitat.

Aquest silil enol èter **6** en les condicions de fluoració descrites anteriorment va conduir al compost **7** amb un rendiment global en les dues etapes del 75%. Finalment **7** va proporcionar el sililenol èter intermedi **8** i la trifluorocetona **9**, aplicant el mateix esquema de síntesi amb un rendiment global en les dues etapes del 35%. Cal mencionar que la 2,2,6-trifluoro-6-naftilciclohexanona (**9**) és tan higroscòpica que per tal d'obtenir el producte en forma ceto va ser necessari assecat-lo al buit i escalfar-lo a 80°C durant diverses hores, ja que es trobava en forma d'hidrat, probablement per aquest fet es va obtenir un rendiment molt inferior que en tots altres casos.

3.1.2. Síntesi de α,α' -diariloxiciclohexanones

3.1.2.1. Anàlisi Sintètic i Estratègia:

Per tal de preparar aquests compostos es va utilitzar un esquema sintètic molt semblant al utilitzat per Connolly i col·laboradors,³³ (veure figura 25) en la seva síntesi de 1,3-diariloxipropanones. Consisteix en la reacció entre un fenol i epiclorhidrina, seguit d'una obertura de l'epòxid amb un segon compost fenòlic. Finalment amb l'oxidació de l'alcohol secundari a cetona s'obtenien les 2-propanones amb dos anells aromàtics diferents en posició α i α' .

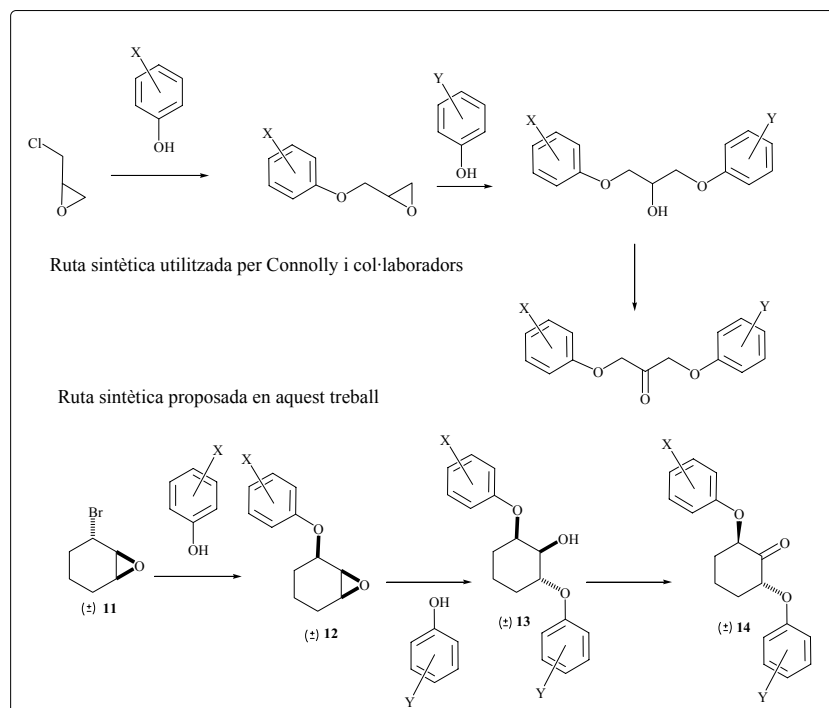


Figura 25. A dalt, ruta sintètica utilitzada en la síntesi dels inhibidors de cPLA₂ de Connolly. A baix, ruta sintètica proposada en el nostre treball basada en la síntesi anterior.

En el nostre cas el material de partida necessari, equivalent a la epicloridrina utilitzada per Connolly és l'epòxid **11** que no és assequible comercialment.

3.1.2.2. Formació de l'intermedi **12**:

Per preparar el material de partida, l'epòxid racèmic **11**, es va partir del compost comercial 3-bromociclohexè. Aquest es va oxidar mitjançant àcid *m*-cloroperbenzoic conduint a l'oxirà desitjat, amb bon rendiment (90%) i una alta puresa del cru ja que amb un simple rentat en medi bàsic per eliminar les restes d'àcid es va obtenir el producte amb elevada puresa.

Tal com s'havia observat en estudis anteriors,⁶² la reacció de l'àcid *m*-cloroperbenzoic amb 3-bromociclohexè proporciona el compost **11** amb configuració relativa *trans*, ja que l'addició sempre té lloc per la cara menys impedida de l'alquè.

Un cop obtingut l'epòxid **11** es va fer reaccionar amb diversos fenols; emprant Cs_2CO_3 es va realitzar un atac $\text{S}_\text{N}2$ d'un derivat de fenol sobre l'àtom de brom del compost **11** conduint a la sèrie de compostos **12** amb uns rendiments entre baixos i moderats (40-70%) provocat per la formació d'un subproducte no desitjat en alguns casos en quantitat apreciables.

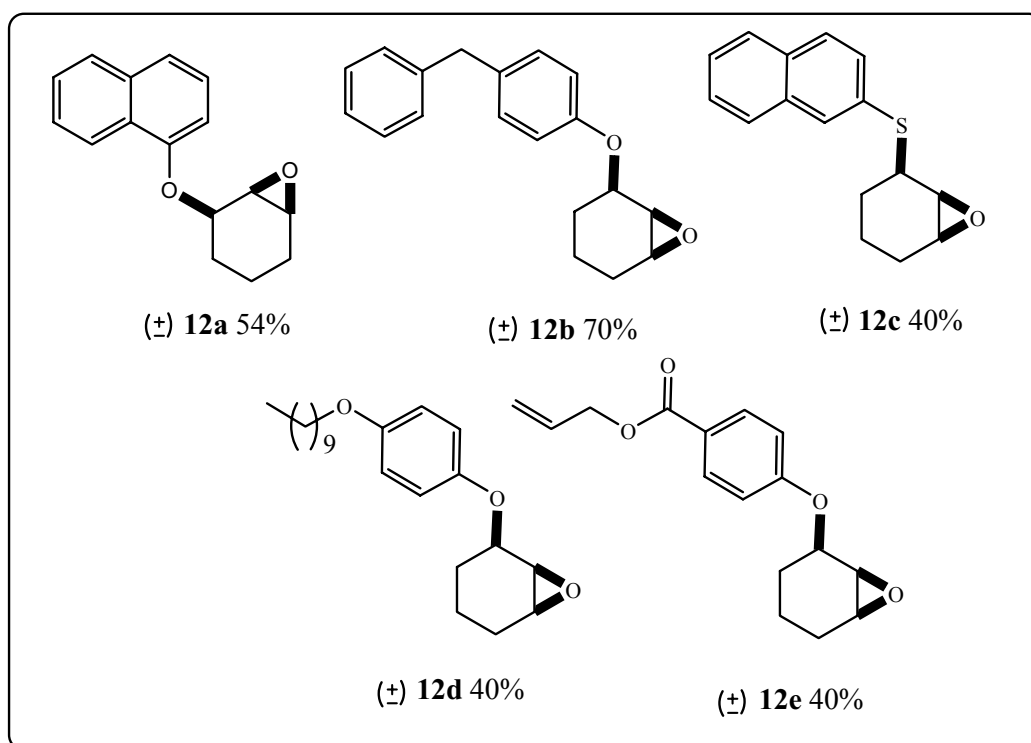


Figura 26. Estructura dels diferents compostos tipus **12** preparats en aquest treball i el rendiment de la reacció de substitució de l'àtom de brom.

En aquest punt calia comprovar de nou l'estereoquímica dels productes obtinguts ja que hi ha dos possibles camins de reacció pels quals pot transcórrer aquesta reacció conduint als dos diastereòmers possibles (*cis* o *trans*). Aquests camins poden ser una substitució directa de l'àtom de brom pel compost fenòlic o bé una obertura de l'epòxid pel compost fenòlic i que l'intermedi format evolucioni cap a un altre epòxid desplaçant l'àtom de brom (veure figura 28).

Abans d'observar els possibles camins de reacció en l'obertura de l'epòxid **11** cal tenir en compte la regla de Fürst-Plattner; aquesta afirma que quan es produeix la obertura d'un epòxid present en un anell de ciclohexà, el nucleòfil sempre ataca en el carboni que produeixi una disposició *trans*-diaxial del nucleòfil i de l'oxigen de l'epòxid (veure figura 27).^{63,64}

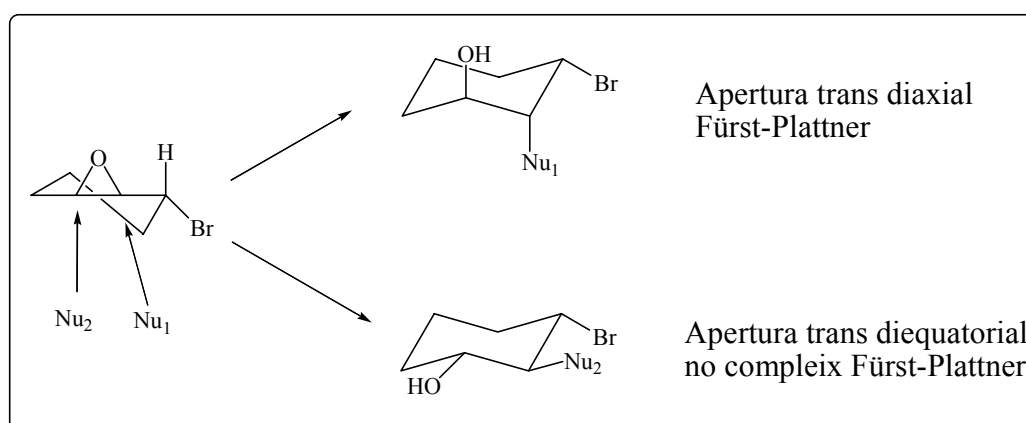


Figura 27. Segons la regla de Fürst-Plattner, en les obertures d'epòxids presents en anells de ciclohexà el nucleòfil ataca preferentment sobre el carboni que condueix a una obertura *trans*-diaxial.

En les condicions experimentals utilitzades en aquesta reacció podien tenir lloc tres possibles reaccions. El compost format pot provenir d'una substitució directa de l'àtom de brom s'obtindria el compost *cis* (figura 28A). També pot ser que primer es produeixi una obertura de l'epòxid. Aquesta obertura pot tenir lloc en dos carbonis diferents, en un cas es compleix la regla de Fürst-Plattner, però llavors no s'obté un epòxid (figura 28C), aquest compost podria ser el subproducte que es forma en alguns casos, si bé no s'ha pogut aïllar i caracteritzar plenament aquest producte secundari. Per tal que s'obtingui un epòxid s'hauria de produir una obertura *trans*-diequatorial, no afavorida per la regla de Fürst-Plattner, i s'obtindria el compost **12'** en configuració relativa *trans* (veure figura 28B).

Per tant, segurament el producte obtingut presenta configuració relativa *cis*, per tal de comprovar-ho experimentalment s'han estudiat les constants d'acoblament en els

espectres de ^1H -RMN dels productes obtinguts (veure apartat 3.1.2.4), i així demostrar que la regla de Fürst-Plattner també es compleix en el nostre cas.

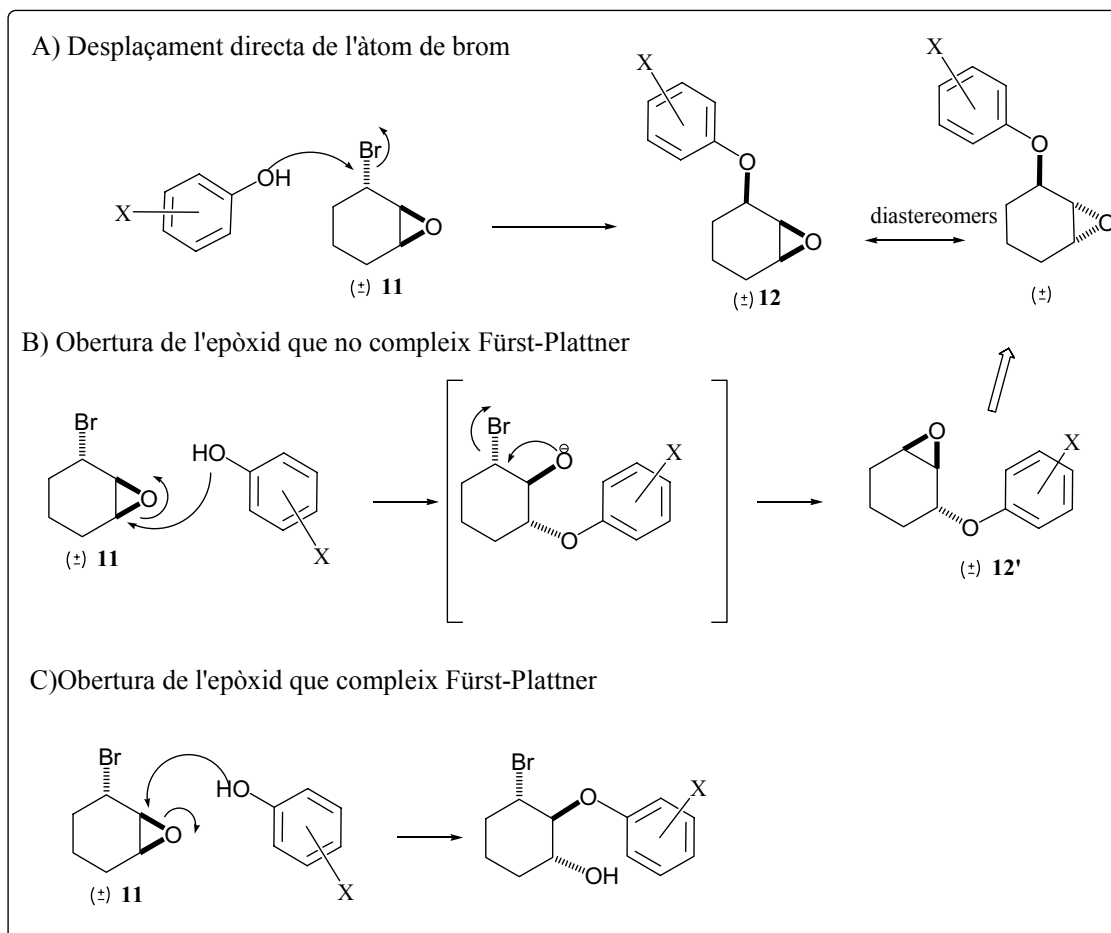


Figura 28. Camins de reacció possibles (atac directe sobre el brom (A) i obertura anti Fürst-Plattner i posterior desplaçament de l'àtom de brom regenerant l'epòxid (B)) per la síntesi dels compostos **12** que condueixen a dos diastereòmers diferents. L'obertura transdiaxial no condueix a cap epòxid (C), per tant la reacció no té lloc per aquest camí, però aquesta reacció podria explicar la formació d'un producte no desitjat. A l'apartat 3.1.2.4 es demostra que la reacció va transcórrer per l'atac directe sobre l'àtom de brom.

3.1.2.3. Obertura de l'epòxid **12** i obtenció dels productes finals:

Posteriorment l'obertura de l'epòxid **12** amb DABCO catalític, acetonitril a reflux i un altre fenol va conduir a la sèrie de compostos **13** (veure figura 34) amb uns rendiments, en general, més elevats (60-80%) quan el fenol contenia algun grup carbonil electronatraient (aldehid, ester) i els rendiments eren menors (40-50%) quan el fenol no presentava cap grup atraient d'electrons. El compost que contenia el grup nitro (**13c**) tampoc va presentar un rendiment molt elevat (45%), segurament, perquè l'anió es troba

tan estabilitzat que és menys nucleòfil igual com en el compost amb l'anell de 9-fenantré (**13n**) el qual es va obtenir només amb un 20% de rendiment.

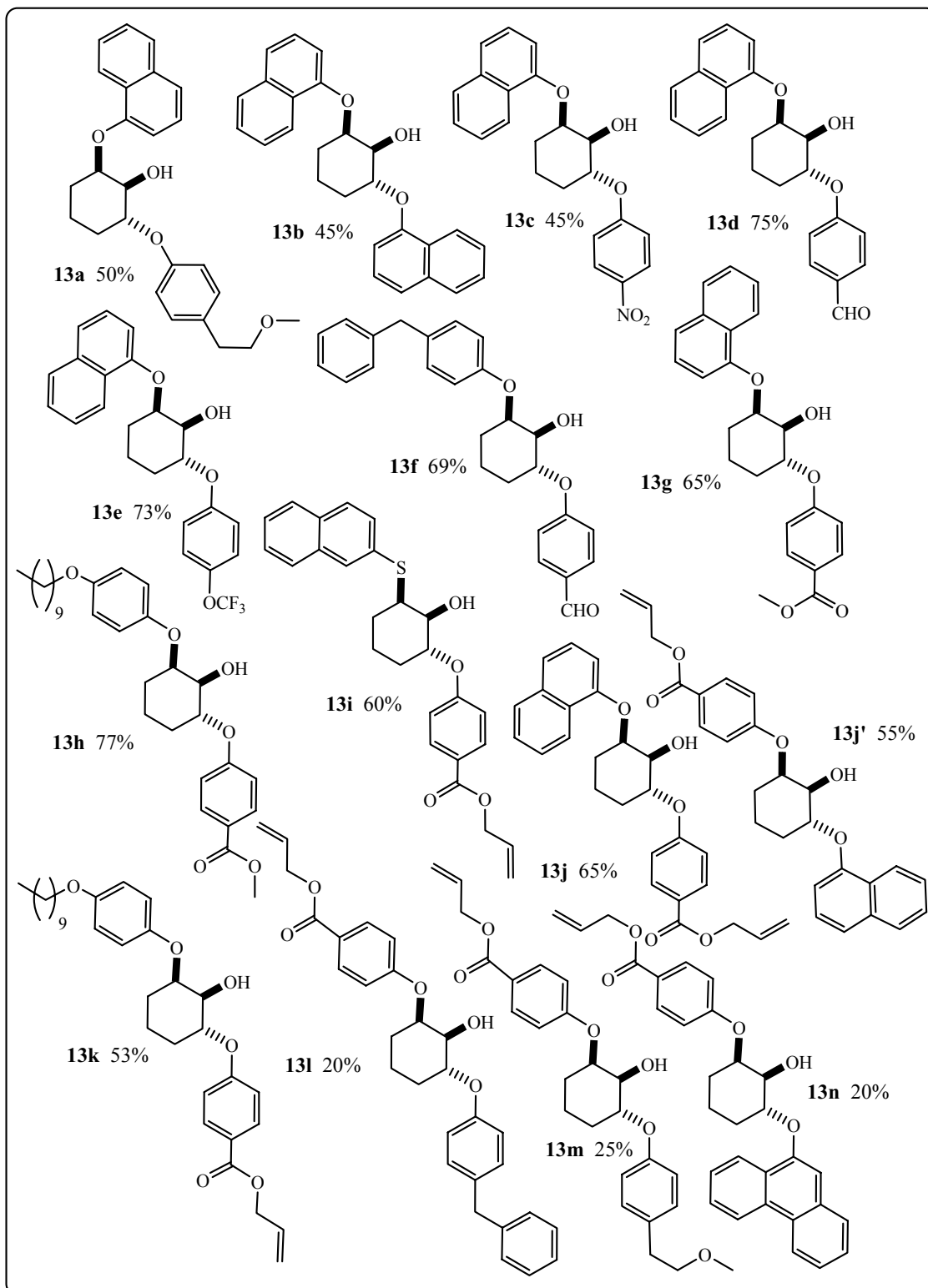


Figura 29. Estructura dels diferents compostos tipus **13** preparats en aquest treball i el rendiment de la reacció d'obertura de l'epòxid. Encara que no es mostri en la figura recordar que tots aquests productes són una mescla racèmica de dos enantiòmers.

Per tal de poder obtenir finalment els compostos **15**, els quals contenen un grup benzoic, igual que alguns inhibidors de cPLA₂,³³ es va utilitzar l'èster al·lílic de l'àcid 4-hidroxi benzoic; el qual es va sintetitzar seguint la mateixa metodologia utilitzada per Connolly i col·laboradors,³³ que va consistir en escalfar a 80°C una mescla d'àcid benzoic, alcohol al·lílic i clorur de trimetilsilil durant 8 hores conduint al producte desitjat de manera quantitativa i amb elevada puresa del cru.

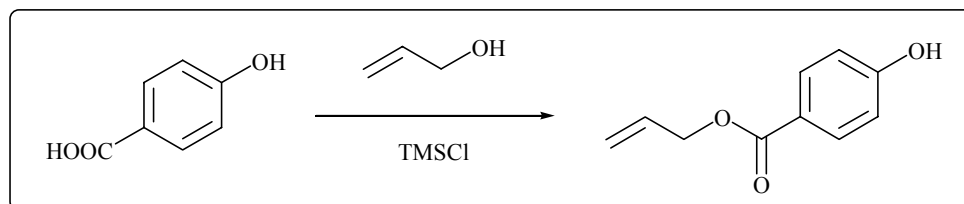


Figura 30. Síntesi de l'èter al·lílic de l'àcid 4-hidroxi benzoic, per tal d'obtenir l'àcid protegit per poder realitzar l'obertura de l'epòxid dels compostos **11** o **12**.

A continuació s'oxidà el grup alcohol dels compostos **13** a cetona mitjançant el reactiu de Dess-Martin conduint als compostos **14** amb uns rendiments entre moderats i molt elevats. En alguns dels compostos que presenten un èster al·lílic, el cru va ser suficient pur com per procedir a la reacció de desprotecció sense necessitat de purificar-lo mitjançant columna cromatogràfica fins a assolir el producte final desitjat (**15**).

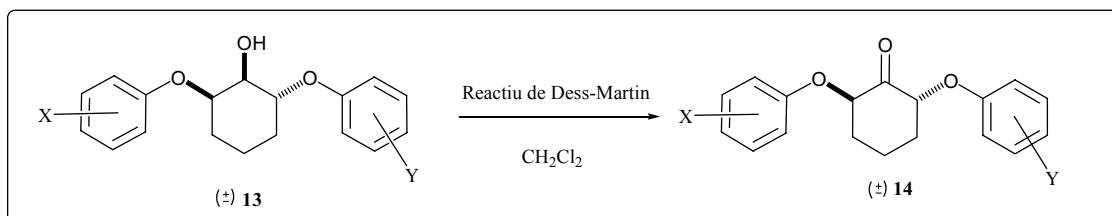


Figura 31. Oxidació de l'alcohol dels compostos tipus **13** amb el reactiu de Dess-Martin per obtenir els compostos tipus **14**.

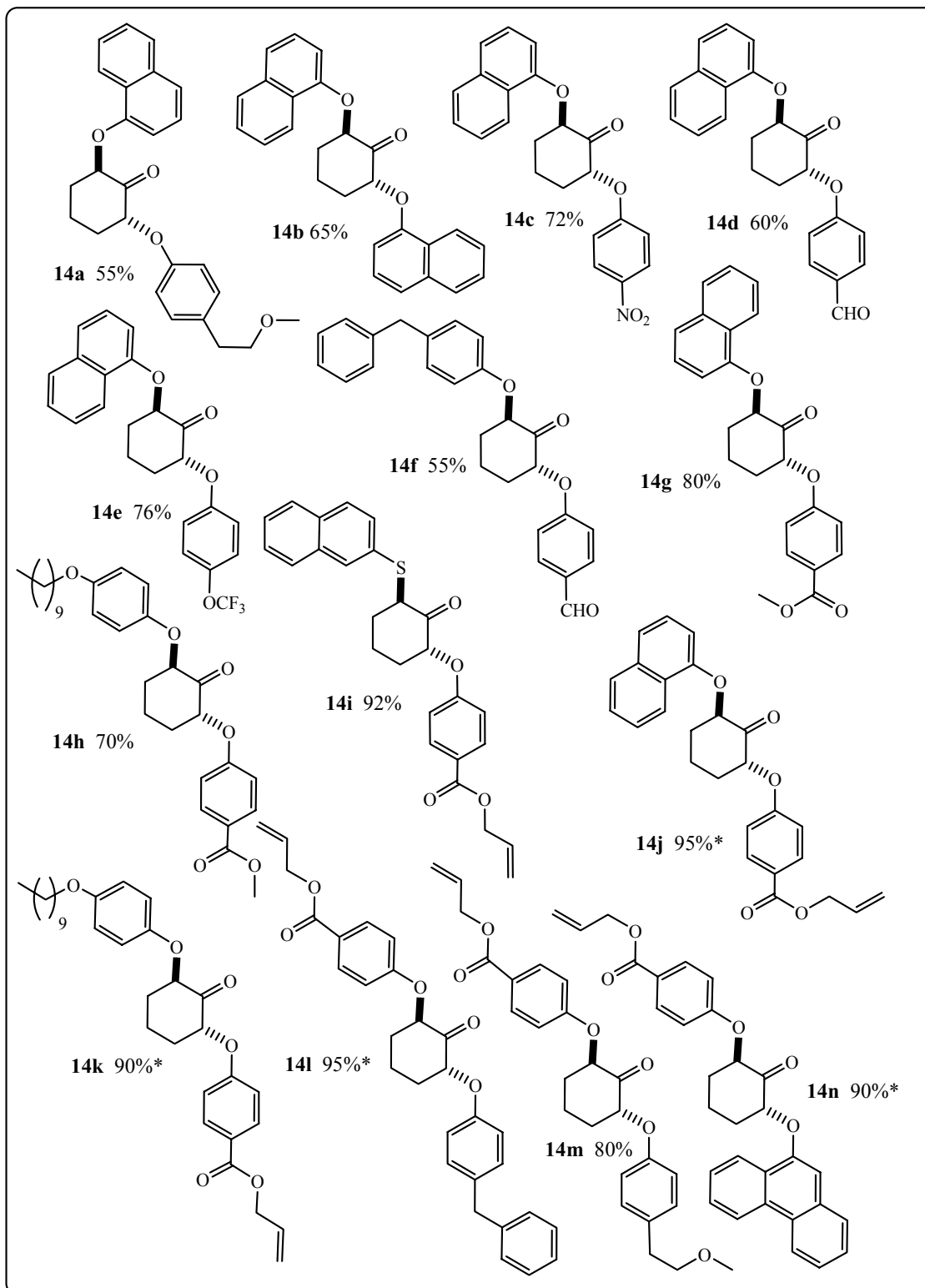


Figura 32. Estructura dels diferents compostos tipus **14** preparats en aquest treball i el rendiment de la reacció d'oxidació. Encara que no es mostri en la figura recordar que tots aquests productes són una mescla racèmica de dos enantiòmers.* en aquests casos el producte no es va purificar mitjançant columna cromatogràfica.

Finalment, en els compostos **14** que contenen benzoats protegits en forma d'èster al·lílic es desprotegí aquest grup amb $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en una barreja de THF i àcid acètic conduint a la sèrie de productes **15** amb uns rendiments moderats (figura 33).

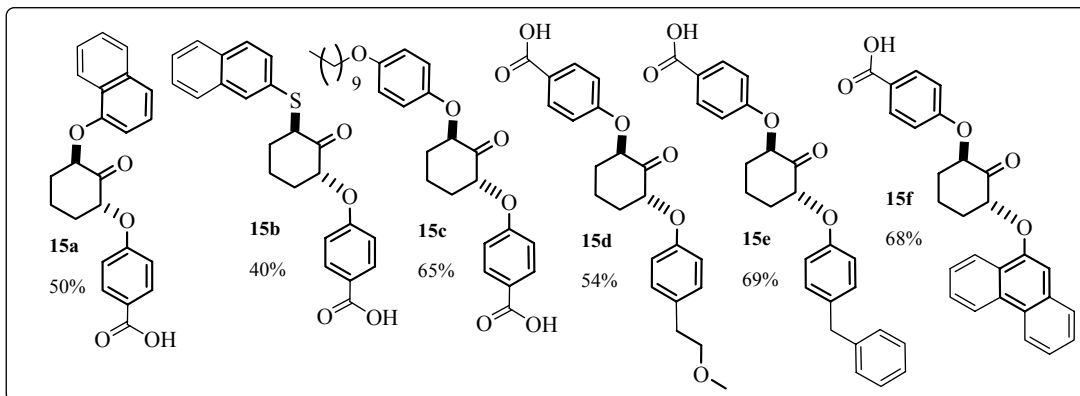


Figura 33. Estructura de totes els compostos amb un àcid lliure (**15**) sintetitzats i el rendiment en la reacció de desprotecció. Encara que no es mostri en la figura recordar que tots aquests productes són una mescla racèmica de dos enantiòmers.

A la figura 34 es mostra un esquema amb totes les etapes de síntesi emprades per obtenir els compostos desitjats (**14** i **15**).

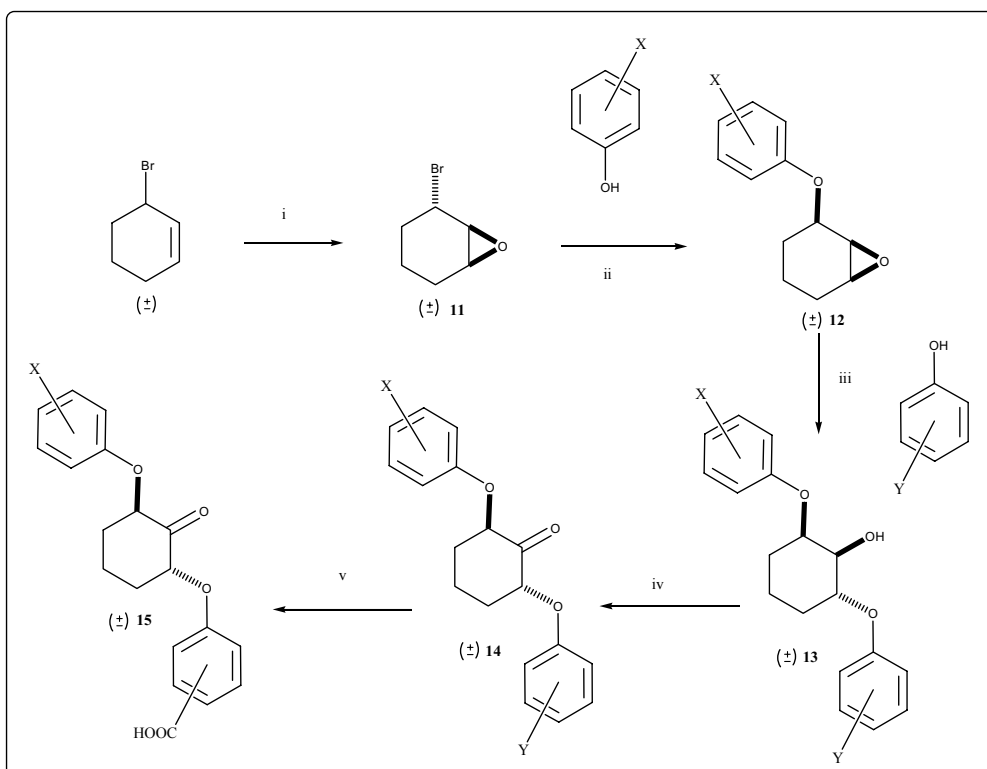


Figura 34. Síntesi 2,6-difenoxiciclohexanones. i) MCPBA, CH_2Cl_2 , ii) Cs_2CO_3 , CH_3CN 82°C , iii) DABCO, CH_3CN 82°C , iv) CH_2Cl_2 Dess-Martin periodinate, v) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, THF i AcOH (desprotecció, només pels èsters al·lílics)

Cal mencionar que per obtenir els productes finals l'ordre d'addició dels grups ariloxi va ser indiferent, tot i que l'esquema sintètic tenia lloc per intermedis diferents, ja que els productes **13** eren diastereòmers, els productes finals **14** i **15** eren els mateixos ja que amb l'oxidació a cetona es perd l'únic centre estereogènic amb diferent estereoquímica. Així en el nostre cas per la majoria de productes, primer es va utilitzar el fenol amb l'anell aromàtic més hidrofòbic que a més a més també era el menys reactiu (naftalè, *p*-benzilbenzè, *p*-deciloxibenzen) i en el segon cas es va introduir l'anell més hidrofílic (nitrobenzè, benzaldehyd, ...). No obstant per preparar els compostos (**15**), que presenten tots l'anell d'àcid benzoic era més pràctic primer introduir el grup fenol que contenia el l'ester al·lílic de l'àcid benzoic i llavors amb diferents obertures de l'epòxid format es van poder obtenir tants compostos com grup fenol hidrofòbics utilitzats en la reacció d'obertura.

3.1.2.4. Comprovació de l'estereoquímica dels productes finals:

Tal com s'ha mencionat anteriorment la reacció de desplaçament de l'àtom de brom del compost **11** (Ar^1OH , CsCO_3 , CH_3CN reflux) podia proporcionar dos compostos: **12** (desplaçament directe del brom) i **12'** (obertura de l'epòxid, i l'alcohol desplaça el brom, reconstruint l'epòxid). A més a més, l'obertura de l'epòxid **12** o **12'** (Ar^2OH , DABCO cat., DMF, 120°C) podia donar dos productes en funció de l'àtom de carboni al qual ataqués el fenol, per tant calia comprovar molt bé quina era la connectivitat i l'estereoquímica dels productes obtinguts per saber quin era el compost que s'havia format, tot i que segons la regla de Fürst-Plattner el compost més probable que es pot formar és l'isòmer **13**.

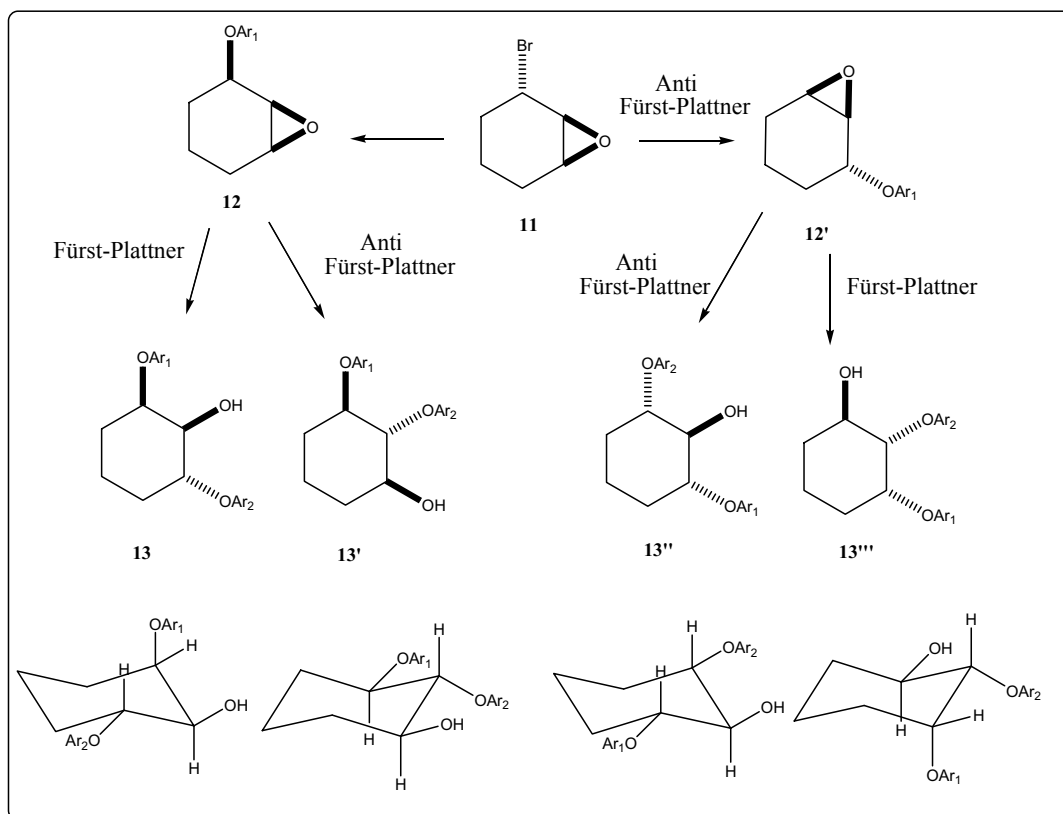


Figura 35. Diferents diastereòmers que es podrien obtenir en funció del mecanisme de desplaçament del brom i segons l'àtom de carboni de l'epòxid que sigui atacat per la segona molècula de fenol i conformació de cadira més estable de cadascun d'ells. Cal mencionar que, a priori, segons la regla de Füst-Plattner el compost més probable que es forma és el **13**.

Això va ser possible gràcies a l'estudi de les multiplicitats i les constants d'acoblament que s'observaven en els espectres de ressonància magnètica nuclear dels àtoms d'hidrogen dels diferents centres estereogènics. Aquestes també indiquen que el producte format és **13**, ja que la seva conformació de cadira és la única que pot explicar els valors experimentals.

Els compostos de la sèrie **12** són els que presenten una conformació menys semblant a una cadira, ja que l'anell de oxirà és molt rígid i no permet la formació de la cadira, per tant en els protons de l'oxirà no es troben ni en posició axial ni equatorial, per tant les constants d'acoblament tabulades són molt diferents de les experimentals, però observant les constants d'acoblament dels epòxids **12**, i comparant amb altres epòxids semblants descrits a la literatura, les constants experimentals es semblen més al sistema en configuració relativa *cis*. (veure figura 36)

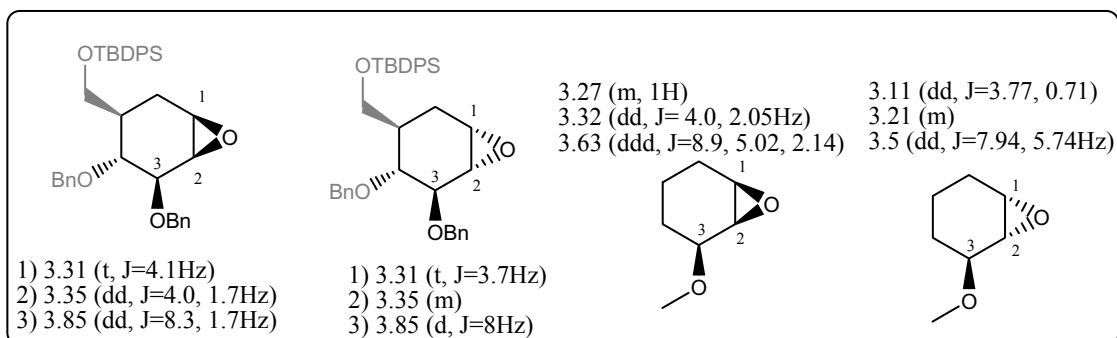


Figura 36. A l'esquerra, constants d'acoblament dels protons indicats de l'article de Yu i col·laboradors.⁶⁵ A la dreta, constants d'acoblament dels protons indicats de l'article de Murray i col·laboradors.⁶⁶ Pel compost **12a** les constants observades són: 3.3 (tt_{ap}, J=3.9, 1.2Hz), 3.48 (dd, J=4.2, 2.1Hz), 4.78 (ddd, J=8.5, 5.8, 2.1Hz).

No obstant aquestes constants són molt semblants en els dos casos per això es van estudiar amb més detall les constants dels productes obtinguts a partir dels epòxids **12**.

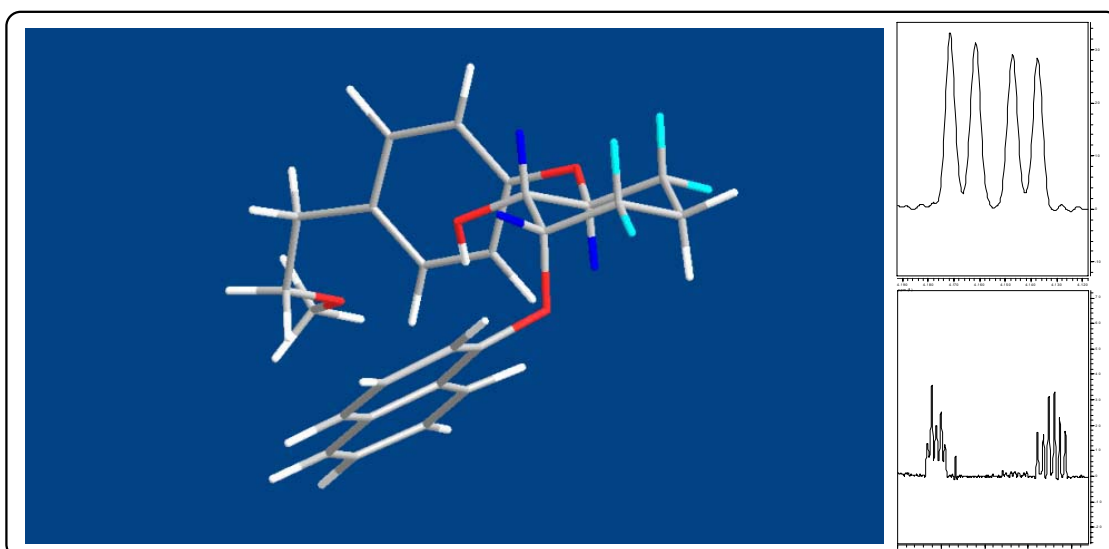


Figura 37. A l'esquerra, representació tridimensional de **13a** considerant que s'ha format l'isòmer **13**. A dalt, espectre de ¹H-RMN de CHOH del compost **13a**, i a baix, espectre de ¹H-RMN dels dos hidrògens de CHOAr.

Les principals observacions es mostren a continuació:

El senyal de H¹-RMN del CH-OH presenta una multiplicitat de dd (exemple compost **13a**, 4.1 (dd, 1H, J¹=7.3 Hz, J²=2.9 Hz)), això indica que acobla només amb dos àtoms d'hidrogen, i com les constants són molt diferents aquests s'han de trobar un en posició axial i l'altre en posició equatorial (**13**); si l'alcohol està al costat d'un CH₂ i d'un CHOAr (**13'** i **13''**) es veurien acoblaments amb 3 H diferents, conduint a un ddd, o

potser un td, si dues de les constants fossin molt semblants o iguals; i si tinguéssim el compost **13''** llavors hauríem d'observar un triplet o un doble doblet però amb les constant molts semblants.

Igualment, un *CHOAr* presenta una multiplicitat de td (exemple **13a**, $J^1=7,6\text{Hz}$, $J^2=3,8\text{Hz}$) mentre que l'altre *CHOAr*, tot i que en l'espectre no es veuen molt bé les constant d'acoblament, aquestes són més petites com es pot veure en la figura 37, *CHOAr_Y* acobla amb dos hidrògens en axial-axial i amb un altre en axial-equatorial (td constants d'acoblament grans) mentre que *CHOAr_X* acobla amb dos hidrògens axial-equatorial i un en equatorial-equatorial (també hauria de ser un td però amb les constant menors. (Constant tabulades axial-axial=8-13, Ax-Eq=2-6 i Eq-Eq=2-5, generalment $J_{eq,ax}=J_{eq,eq}+1$).

Quan els fenols utilitzats en les dues reaccions eren iguals (**13b**) llavors tots els protons dels dos anells aromàtics i els dos protons de *CHOAr* tenien un desplaçament químic de H^1 -RMN molt semblant entre ells, i quan es va oxidar l'alcohol a cetona (**14b**) llavors tenien el mateix desplaçament químic formant un dd, que integrava 2 protons, això era així perquè la molècula final era simètrica, cosa que només podia tenir lloc en els compostos **13** i **13''**.

Quan es va oxidar l'alcohol a cetona, compostos **14**, els dos *CHOAr* de **13''** haurien de tenir el mateix angle entre els dos protons del CH_2 veïnal, i per tant una constant d'acoblament semblant, no obstant, aquests presentaven unes constants d'acoblament diferents (exemples : **14a** [(dd, $J^1=8.4\text{Hz}$, $J^2=4.6\text{Hz}$) i (dd, $J^1=6.7\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$)] o **14e** [(dd, $J^1=9.1\text{Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$) i (dd, $J^1=6.1\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$) veure figura 38]) indicant que un dels dos protons es trobava en posició axial, constants grans, i l'altre en posició equatorial, constants petites.

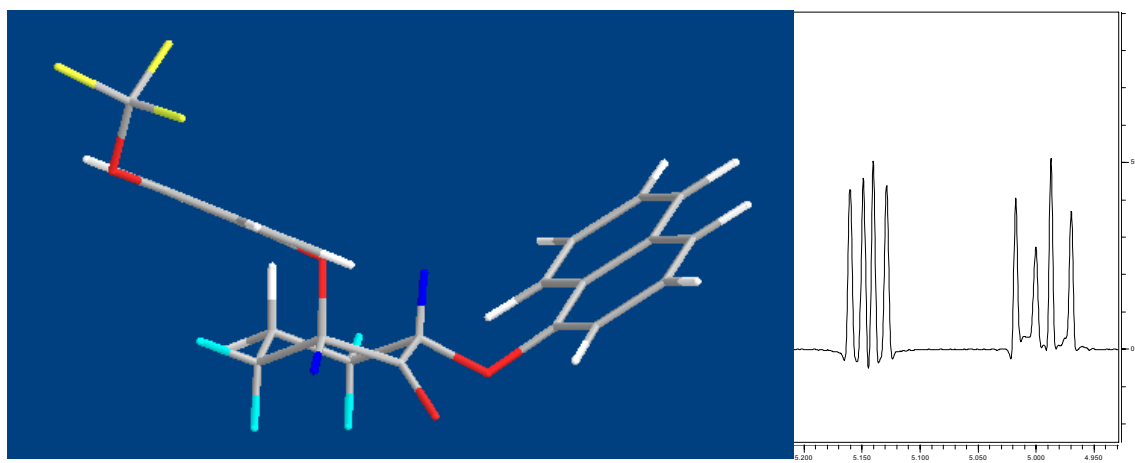


Figura 38. Representació tridimensional del compost **14e**, i espectre de ^1H -RMN dels dos protons en estudi (color blau fosc, que acoblen amb els protons en color blau clar).

Quan l'epòxid **12** o **12''** es va fer reaccionar amb el mateix aril que s'havia utilitzat per a la seva formació es va obtenir un ciclohexanol que presentava els dos CHOAr iguals, no obstant no s'observaven uns espectres de RMN simètrics:

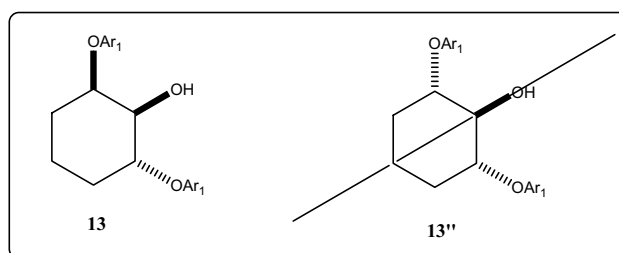


Figura 39. Es pot veure que la molècula **13''** és simètrica perquè té un pla de simetria, per tant el CHOH veu dos protons iguals, en canvi **13** no és simètrica, per tant el CHOH acoblaria amb dos protons diferents.

Si observem aquestes molècules podem observar que **13''** és simètrica ja que presenta un pla de simetria, per tant, les característiques espectrals haurien de ser iguals. No obstant quan es va sintetitzar la molècula amb dos grups naftalè es va observar el següent en els espectres de RMN:

Espectre de ^1H -RMN:

CHOH és un multiplet, i no un triplet

Els CHOAr tenen diferent desplaçament químic, també són multiplets, però encara que no es pot observar la multiplicat esperada (dt o td) si que s'observa que tenen diferents constants d'acoblament, ja que un multiplet és molt més ample que l'altre.

Espectre de ^{13}C -RMN:

Els dos CHOAr tenen diferent desplaçament químic, i totes les senyals del naftil també ja que es veien totes desdoblades.

Quan es va oxidar l'alcohol a cetona (compost **14b**) llavors si que es va poder observar l'espectre d'una molècula simètrica, provocat per un eix de rotació en la molècula. Per tant, l'espectre presenta un sol senyal de CHOAr, un sol senyal pels dos CH₂ veïnals, i un altre senyal per l'altre CH₂, i només s'observa un senyal pels diferents àtoms de carboni del grup aromàtic, a diferencia dels hidrògens del compost **13** que presenta tots els senyals desdoblats. El diastereòmer **14''** també és una molècula simètrica ja que presenta un pla de simetria, però ja s'ha demostrat anteriorment que no s'ha format aquesta molècula.

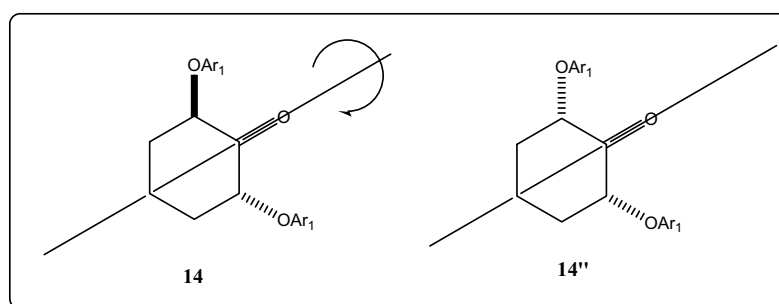


Figura 40. En aquest cas les dues molècules són simètriques, **14** presenta un eix de rotació C₂ mentre que **14''** continua tenint un pla de simetria.

Basats en tots els arguments anteriors, es pot concloure que l'estructura dels compostos obtinguts correspon a l'isòmer **13**, descartant la formació de **13'**, **13''** i **13'''**. Per tant, aquest és un altre cas en que es compleix la regla de Fürst-Plattner.

3.1.3. Síntesi de α -ariloxiciclohexanones

Els compostos preparats a partir del bromoepòxid **11** posseeixen dos grups aromàtics, en canvi BEL només presenta un grup aromàtic, per tant, es va decidir preparar una petita col·lecció d'anàlegs amb un sol grup aromàtic. Igual que en el cas de BEL, tots els compostos aromàtics que es van utilitzar foren grups hidrofòbics, per tal que aquests puguin interaccionar amb la butxaca hidrofòbica del centre actiu de l'enzim.

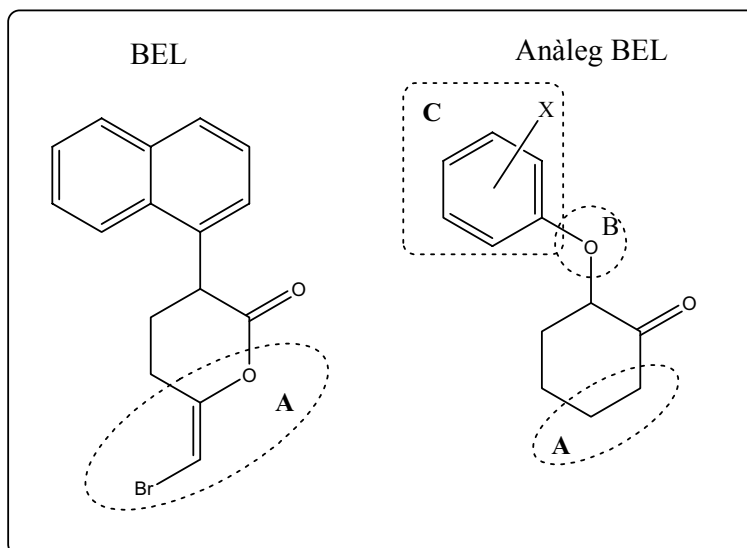


Figura 41. Estructura BEL i dels nous anàlegs sintetitzats. S'observen tres grans modificacions en l'estructura de l'inhibidor: A) S'elimina, l'èter d'enol, ja que aquest és el responsable que el compost sigui irreversible; B) S'introdueix un heteroàtom per tal d'augmentar el caràcter electronatracient de la cetona; C) S'utilitzen diferents grups aromàtics hidrofòbics per observar quin d'ells interacciona millor amb la butxaca hidrofòbica propera al centre actiu de l'enzim i proporciona millors resultats d'inhibició.

Aquests compostos es van preparar en forma racèmica mitjançant un desplaçament nucleofílic de l'àtom de clor del compost comercial 2-clorociclohexanona utilitzant diferents fenols i també un tiol per estudiar si l'heteroàtom influïa en l'activitat biològica dels compostos d'aquesta família.

Primer es va provar la reacció amb naftol i K_2CO_3 a reflux d'acetona, però no es va obtenir el producte desitjat, descomponent la clorociclohexanona i recuperant-se el naftol de partida.

Així per tal que el nucleòfil atacés ràpidament al clor, abans no descomposés la clorociclohexanona, es va decidir preparar la sal sòdica del derivat de fenol, utilitzant metòxid sòdic en metanol. A continuació es va eliminar el metanol, per impedir que aquest actués com a nucleòfil, es va redissoldre en èter etílic anhidre i s'hi va addicionar lentament la clorociclohexanona, formant-se en aquest cas el producte desitjat. Així es va repetir el mateix procediment per una petita sèrie de fenols i en tots els casos es va formar el producte desitjat amb uns rendiments moderats (veure figura 42), excepte quan es va utilitzar 4-nitrofenol i el 9-fenantrol en que no es va formar el producte desitjat, probablement perquè l'anió estava molt estabilitzat pel grup nitro o la presència dels tres anells aromàtics, respectivament, i per tant l'anió era molt poc nucleòfil.

En el cas d'utilitzar un tiol, concretament es va utilitzar el 2-tionaftol, es van obtenir millors resultats emprant unes altres condicions experimentals. Aquestes foren DMF com a dissolvent i NaH com a base.

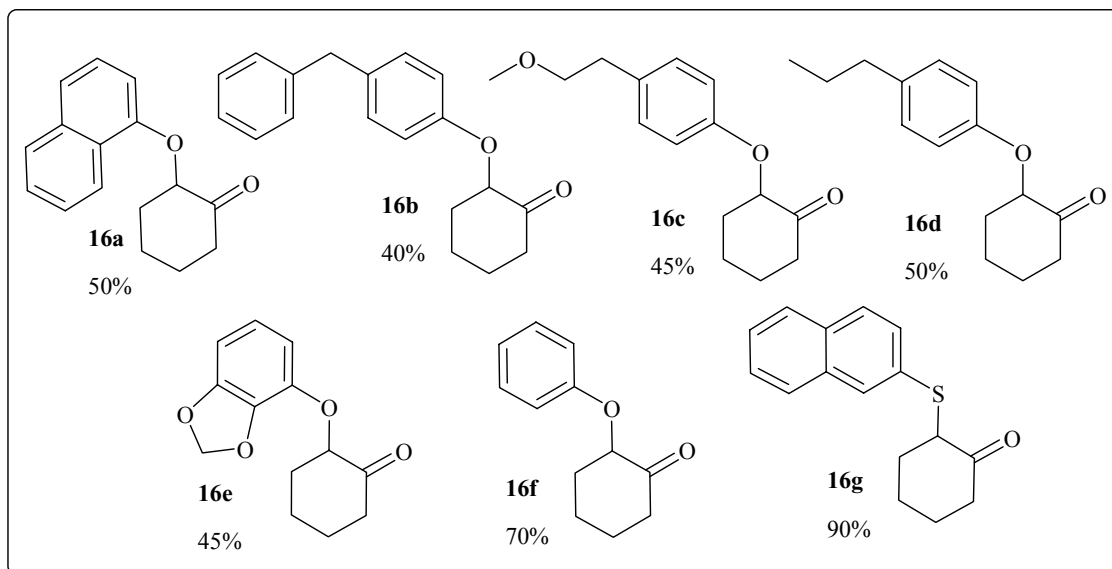


Figura 42. Estructura de totes les α -ariloxiciclohexanones sintetitzades, i el rendiment de la reacció.

3.2. Síntesi d'anàlegs de Substrat.

3.2.1. Anàlisi Sintètic i Estratègia:

Per tal de preparar anàlegs de fosfolípid, es van realitzar diferents alteracions al substrat natural. Es va modificar la funcionalitat de la posició *sn*-2, substituint el grup ester per una amida, i el grup ester de la posició *sn*-1 per un tioèter, funcionalitat mimètica de l'ester, que ja s'havia utilitzat en altres grups de recerca en la síntesi de diferents inhibidors de sPLA₂ (figura 43).

En el grup polar s'hi va mantenir el grup fosforilcolina, un dels caps polars més abundants en els fosfolípids de membrana, i que es present en els substrats de les fosfolipases en estudi.

A la bibliografia es troben diferents anàlegs de fosfolípid amb modificacions a la posició *sn*-2, però tots ells s'havien assajat com a inhibidors de la fosfolipasa extracel·lular (sPLA₂) ja sigui de verins de serp^{22,46} o de fluids pancreàtics⁶⁷ o també com a anàlegs de PAF^{47,68} (fosfolípid amb un èter de cadena llarga a la posició *sn*-1 i un

acetat a la posició *sn*-2) però fins al moment no s'havien assajat anàlegs de substrat com a inhibidors de la iPLA₂ ni s'havien introduït diferents grups per tal d'obtenir selectivitat enfront cPLA₂.

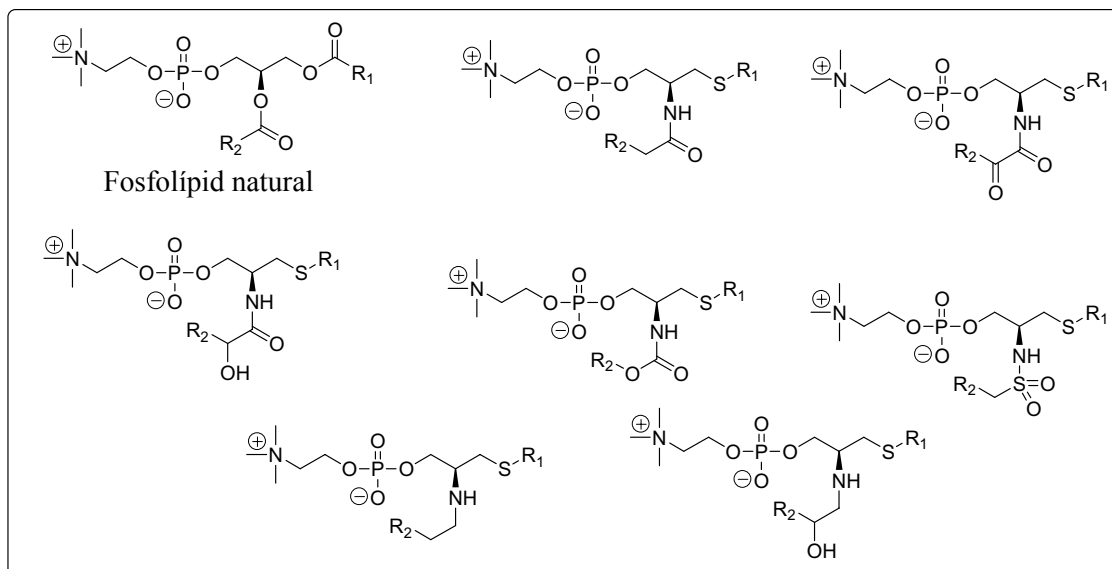


Figura 43. Estructura d'un fosfolípid natural i estructura dels anàlegs amb diferent funcionalitat en la posició *sn*-2 que es sintetitzen en aquest treball. R₁: cadena saturada de 16 àtoms de carboni, R₂: diferents cadenes laterals (cadenes lineals, ramificades o cadenes amb grups aromàtics).

A més de la funcionalitat amida, pràcticament la única estudiada en tots els anàlegs descrits a la literatura, també es van preparar alguns derivats amb altres funcionalitats (carbamat, sulfonamida, cetoamida...) tal com es pot veure en la figura 43.

D'anàlegs amb la funció carbamat descrits a la bibliografia només se n'han trobat amb la cadena lateral de 16 àtoms de carboni^{46,68,69} d'un sol àtom de carboni⁷⁰ o de 8 àtoms de carboni, però en aquest cas amb un ester a la posició *sn*-1⁷¹.

Amb la funció sulfonamida, només s'han descrit anàlegs derivats de l'àcid metansulfònic a la posició *sn*-2^{70,72}, tot i que s'han descrit altres compostos amb diferents estructures com a inhibidors de diferents proteases que contenen aquesta funcionalitat.⁷³

També s'han descrit anàlegs en que el grup ester de la posició *sn*-2 es reemplaça per un grup amino,⁷⁴ en aquest treball a més a més es va preparar un altre anàleg de fosfolípid amb un grup *N*-2-hidroxiocetil, en analogia als isòsters peptídics de tipus *N*-hidroxietil que són inhibidors de diferents proteases,⁷⁵⁻⁷⁷ però que fins al moment no s'havien utilitzat en cap anàleg de fosfolípid.

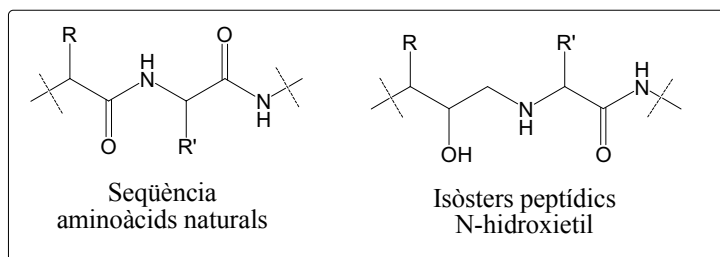


Figura 44. Estructura d'un peptid natural i dels isòsters peptídics de tipus *N*-hidroxietil, inhibidors de diferents proteases.

Fins aquest treball no s'ha descrit cap fosfolípid amb un grup cetoamida a la posició *sn*-2, que per contra si s'ha descrit en altres inhibidors d'esterases.⁷³

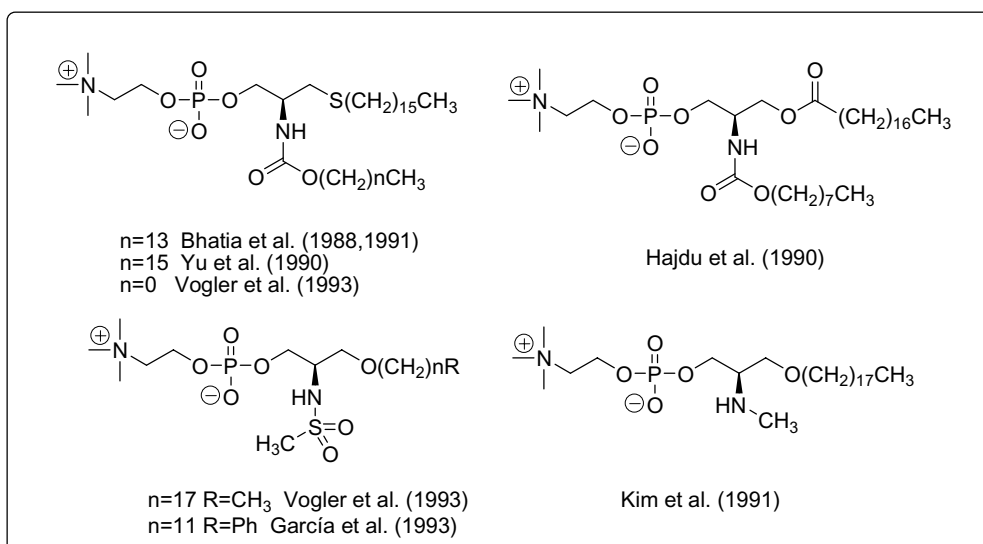


Figura 45. Anàlegs de fosfolípid que es troben a la literatura amb funcionalitat diferent a amida en posició *sn*-2.

La cadena lateral de la posició R_1 (figura 43) dels anàlegs de fosfolípid es va substituir per una cadena alquílica saturada de setze àtoms de carboni, pel fet que els fosfolípids normalment contenen un àcid gras saturat en aquesta posició.

En la cadena lateral R_2 s'hi van addicionar diferents substituents, cadenes lineals saturades de diferent llargada, cadenes ramificades, i també grups aromàtics.

Els fosfolípids naturals no presenten compostos aromàtics en la cadena lateral de la posició *sn*-2, però hi ha diferents antecedents que ens van fer pensar que podria ser interessant utilitzar-los. En el compost BEL, es pensa que el grup naftil mimetitzava una cadena lineal insaturada, es col·loca a la butxaca hidrofòbica del centre actiu de l'enzim, i podria ser el responsable de la selectivitat enfront de cPLA₂.

Per altra banda hi ha un treball del grup del Dr. E.A. Dennis, investigador especialitzat sobretot en l'estudi de diferents fosfolipases A_2 ,⁴⁴ en el qual van observar que la cadena lateral 5-fenilpentanoil era la que conferia més selectivitat entre aquestes dues fosfolipases en una sèrie de diferents trifluorometilcetones.

Així, *a priori*, les esterificacions amb els àcids 2-naftilacètic i 5-fenilpentanoic i altres anells aromàtics eren bones candidates per conferir selectivitat respecte a $cPLA_2$.

A diferència dels anàlegs de BEL que es van sintetitzar en forma racèmica, perquè no es coneixia quina seria l'estereoquímica que encaixaria millor en el centre actiu de l'enzim, els anàlegs de substrat es van preparar enantiomèricament purs i amb la mateixa estereoquímica que el substrat natural, utilitzant l'aminoàcid natural L-serina per tal d'obtenir aquest centre estereogènic en la configuració desitjada.

3.2.1.1. Síntesi de l'intermedi **17**

Per tal de preparar els anàlegs de substrat es va partir de l'alcohol de Garner, el qual es va sintetitzar utilitzant el mètode de Herold,⁷⁸ que va millorar la síntesi descrita per Garner i col·laboradors⁷⁹ que partia del compost natural L-serina.

L'alcohol de Garner es va fer reaccionar amb clorur de tosil, utilitzant trietilamina per neutralitzar l'àcid clorhídric que es va formar i dimetilaminopiridina per catalitzar la reacció en el si de diclorometà. A continuació es va desplaçar el grup tosil afegint-lo sobre una mescla de 1-hexadecantiol amb NaH en el si de DMF i es va escalfar a 40°C conduint al compost **17** en una reacció molt neta i amb un 80% de rendiment (veure figura 46).

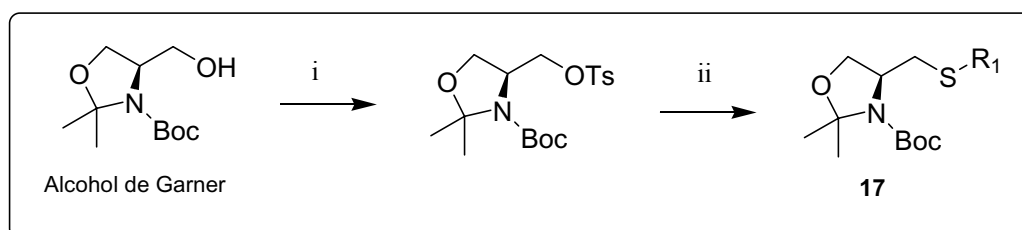


Figura 46. Síntesi de l'intermedi **17**. i) Et₃N, TsCl, DMAP, CH₂Cl₂. ii) R₁SH, NaH, DMF 40°C.

A partir d'aquest compost es van seguir dues vies sintètiques diferents per arribar als anàlegs de fosfolípid.

3.2.2. Síntesi de fosfolípids. Via sintètica 1.

En la primera ruta sintètica es van introduir en primer lloc les diferents funcionalitats en la posició *sn*-2, posteriorment, es va introduir el grup fosforilcolina (veure figura 47).

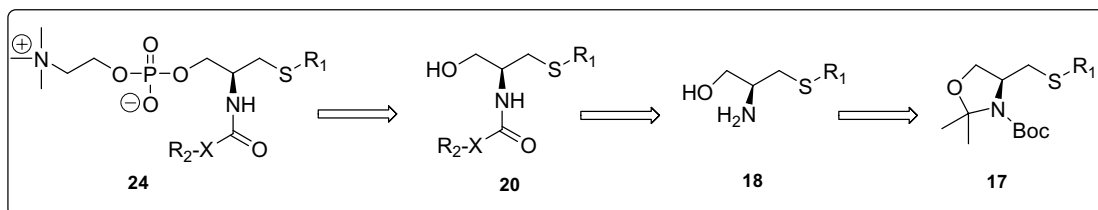


Figura 47. Esquema retrosintètic dels anàlegs de fosfolípid. El producte final (**24**) es sintetitza a partir de la fosforilació del precursor **20**. El compost **20** es prepara a partir de l'intermedi **17**, el qual es desprotegeix totalment, i s'introdueixen les funcionalitats desitjades en la posició *sn*-2.

Per realitzar aquesta síntesi, es va desprotegir totalment el grup alcohol i el grup amino del compost **17** mitjançant àcid trifluoroacètic, formant-se la corresponent sal de trifluoroacetat. Aquesta sal es va neutralitzar amb NaOH 1M i el producte **18** es va extreure en Et₂O. A partir d'aquest compost es van poder introduir diferents funcionalitats en aquesta posició i aprofitant que l'amina era molt més reactiva que l'alcohol no va ser necessària la protecció del mateix (veure apartat 3.2.4 per una explicació més detallada de com es van introduir aquestes funcionalitats).

Un cop es van haver introduït les diferents funcionalitats sobre el grup amino, s'havia d'introduir el grup fosforilcolina. Primerament es va provar una metodologia sintètica utilitzada en altres grups de recerca,^{47,74} que consisteix en l'addició d'un fosfat cíclic el qual mitjançant un desplaçament nucleòfil amb trimetilamina condueix al producte desitjat.

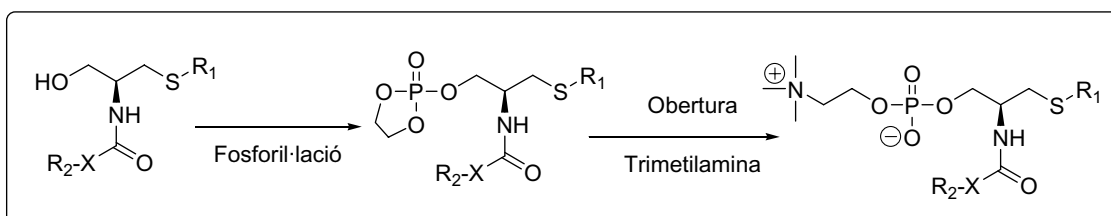


Figura 48. Procés de síntesi d'anàlegs de fosfolípids emprant 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolà.

Per dur a terme la primera etapa es van utilitzar condicions de reacció típiques per aquesta reacció (toluè i trietilamina) conduint al producte desitjat però amb baixos rendiments; així per tal de millorar els rendiment d'aquesta reacció és va canviar el

dissolvent i la base, sent els millors entre els que es van provar la combinació de diclorometà i *N*-metilimidazol.

Per tal de procedir a la obertura de l'anell de 5 membres, en primer lloc es va preparar una solució de trimetilamina en el si d'acetonitril fent bombollear trimetilamina gas sobre acetonitril anhidre. Posteriorment, en condicions anhidres, en un tub hermèticament tancat i capaç de resistir la pressió internada generada es va escalfar a 80°C la reacció amb el compost fosforilat cíclic i la trimetilamina en el si d'acetonitril. Malauradament no es va poder aïllar el producte desitjat en cap dels diferents assaigs duts a terme, obtenint-se barreges de productes no identificats.

Així es va decidir canviar de metodologia, introduint un millor grup sortint que pogués ésser més fàcilment desplaçat per la trimetilamina. Es va seguir el procediment de la figura 49.

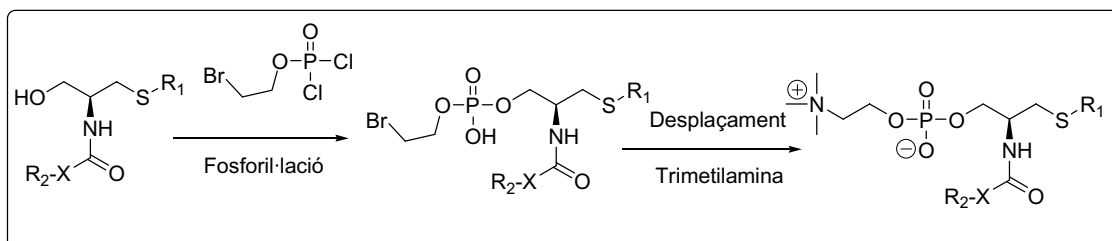


Figura 49. Procés de síntesi d'anàlegs de fosfolípids emprant fosforodiolur de 2-bromoetil.

Per això es va preparar el compost fosforilant que contenia el grup 2-bromoetanol, utilitzant el desplaçament d'un àtom de clor del compost comercial POCl_3 seguint la metodologia utilitzada per Timperley i col·laboradors.⁸⁰ Aquesta reacció va permetre obtenir quantitativament el fosforodiolur de 2-bromoetil, el mateix reactiu amb el qual introdueix el fòsfor el grup del Dr. Dennis²² (veure figura 49) en la seva síntesi d'anàlegs de fosfolípids.

Per tal de fosforilar la sèrie de compostos **20** es van assajar diferents condicions de reacció, essent entre totes elles la millor la que va emprar diclorometà com a dissolvent i *N*-metilimidazol com a promotor i base.

A continuació es va utilitzar el cru d'aquesta reacció per efectuar la substitució del brom per trimetilamina. En aquest cas, però es va utilitzar una dissolució de trimetilamina al 40% en aigua, assequible comercialment.²² Es van obtenir els productes desitjats en tots els casos, si bé amb uns rendiments baixos en la suma de les dues etapes, fosforilació i introducció del grup trimetilamoni.

Per tal d'evitar la manipulació de trimetilamina, molt volàtil, tòxica, amb olors bastant desagradables i que generava pressions internes en la reacció que podien causar explosions, i sobretot que provocava rendiments de reacció molt baixos en l'última etapa de síntesi, es va intentar la síntesi d'un agent fosforilant alternatiu que ja contingués aquest grup funcional (veure figura 50).

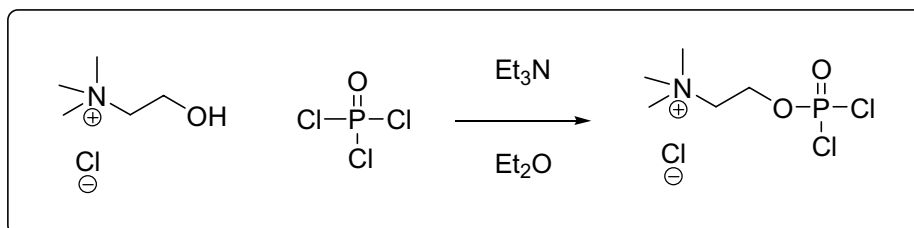


Figura 50. Intent de síntesi d'un agent fosforilant que presentés el grup colina seguint les mateixes condicions de síntesi emprades anteriorment per preparar el fosforodiolur de 2-bromoetil.

Per tal de preparar aquest compost es va utilitzar la mateixa metodologia emprada en l'agent fosforilant amb un àtom de brom, però en aquest cas es va utilitzar el clorur de trimetilaminoetanol; no obstant, probablement per la baixa solubilitat d'aquesta sal, no es va poder obtenir el compost desitjat en els diversos intents duts a terme.

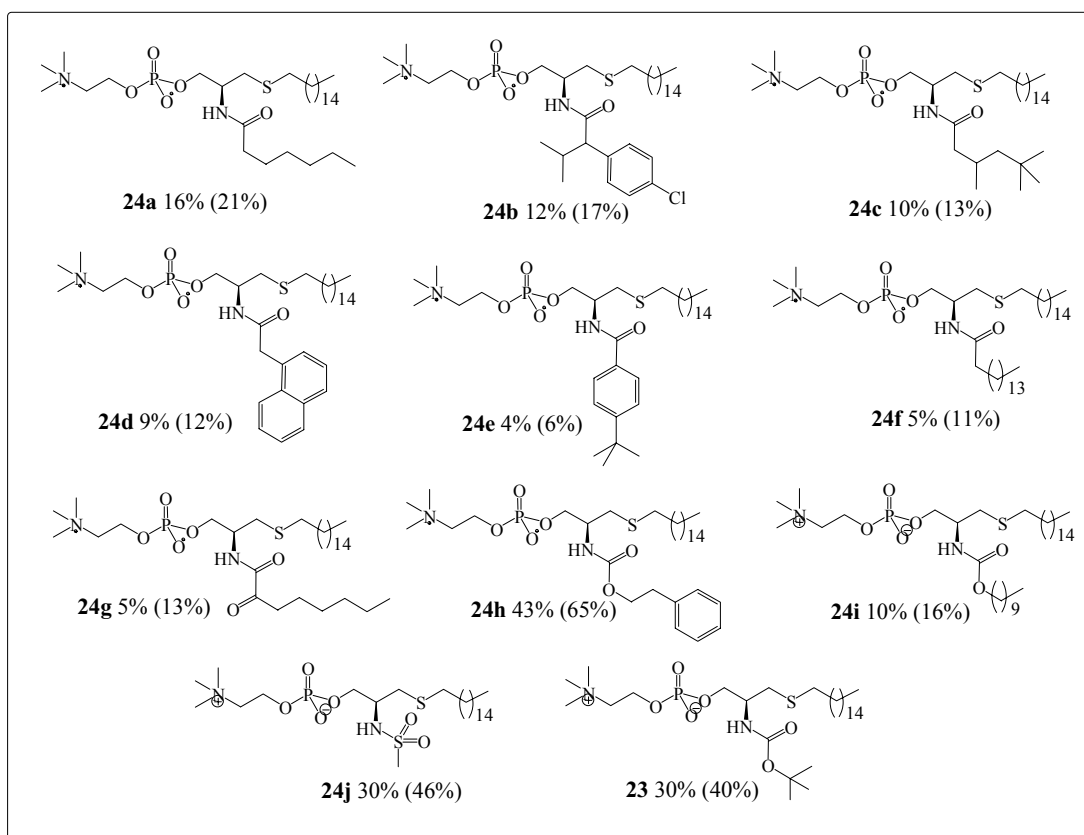


Figura 51. Estructura de tots els anàlegs de fosfolípids sintetitzats amb la primera ruta de síntesi. Es mostra el rendiment global de síntesi a partir del tosilat de l'alcohol de Garner, i entre parèntesi el rendiment en la introducció del grup fosforilcolina.

Cal dir que es van utilitzar dues cadenes laterals (compostos **24b** i **24c**) que presentaven un centre estereogènic en forma racèmica ja que no eren assequibles comercialment els clorurs d'àcid enantiomèrics per separat. Per tant, van conduir als dos diastereòmers possibles, en el cas de **24b** es van separar els dos diastereòmers i es va preparar l'anàleg fosforilat només d'un d'ells. En canvi pel compost **24c** es va fosforilar la mescla dels dos diastereòmers.

Aquesta primera ruta sintètica no va ser prou eficaç per la síntesi dels anàlegs de fosfolípid perquè les etapes de fosforilació i d'introducció de la trimetilamina presentaven rendiments molt baixos, entre el 10 i el 20% en la majoria dels productes, degut a la formació de diferents subproductes. En alguns casos aquest rendiments no van ser tan baixos com en altres, això es produïa quan en la posició *sn*-2 hi havia la funcionalitat carbamat, principalment en el cas del grup *tert*-butoxicarbonilamino (40%), o també en el cas de la sulfonamida (46%). Per això es va decidir dissenyar una altra via de síntesi en la qual s'introduïssin les diferents funcionalitats en la posició *sn*-2 al final de la síntesi, bescanviant l'ordre de les etapes de fosforilació i *N*-funcionalització.

3.2.3. Síntesi de fosfolípids. Via sintètica 2.

La segona ruta sintètica que es va dur a terme va consistir en obtenir el compost tipus **23** amb el grup *tert*-butoxicarbonilamino a la posició *sn*-2, per tal d'introduir les funcionalitats i cadenes laterals desitjades en l'etapa final de la síntesi (veure figura 52).

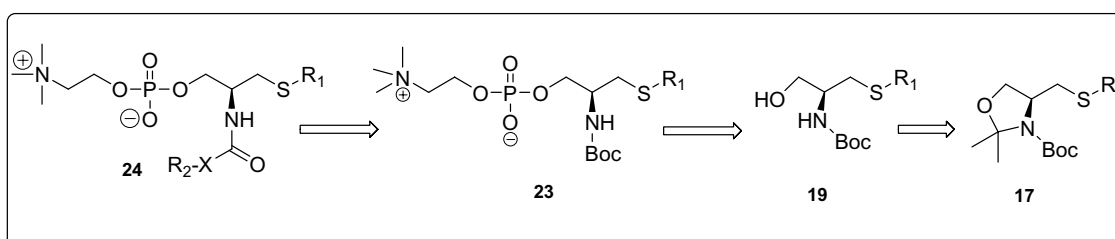


Figura 52. Esquema retrosintètic dels anàlegs de fosfolípid. El producte final (**24**) es va sintetitzar introduint les diferents funcionalitats desitjades després de la desprotecció del grup *N*-Boc del compost **23**. El compost **23** es va preparar per fosforilació del compost **19**, el qual prové de la desprotecció parcial del compost **17**.

La primera reacció fou la desprotecció selectiva del grup acetònid en condicions àcides conduint a l'alcohol lliure **19** amb un rendiment del 90% i una elevada puresa en el cru. A continuació es va fosforilar amb fosforodiolur de 2-bromoetil utilitzant les mateixes

condicions que en l'esquema sintètic anterior. Seguidament es va introduir el grup trimetilamoni per reacció amb trimetilamina. Es va desprotegir el grup *tert*-butoxicarbonil amb àcid trifluoroacètic i es va utilitzar directament la sal de trifluoroacetat formada (**23TFA**) en la següent reacció que fou la introducció de les funcionalitats desitjades (veure apartat 3.2.4).

A la figura 53 es mostren tots els anàlegs de fosfolípid sintetitzats per aquesta segona ruta sintètica; s'observa que els rendiments globals són molt més elevats quan tenim la funcionalitat amida en la posició *sn*-2, a causa d'un millor rendiment en la introducció del grup fosforilcolina quan tenim el grup carbamat, en canvi pels grups carbamat i sulfonamida els rendiments són millors utilitzant la primera ruta sintètica.

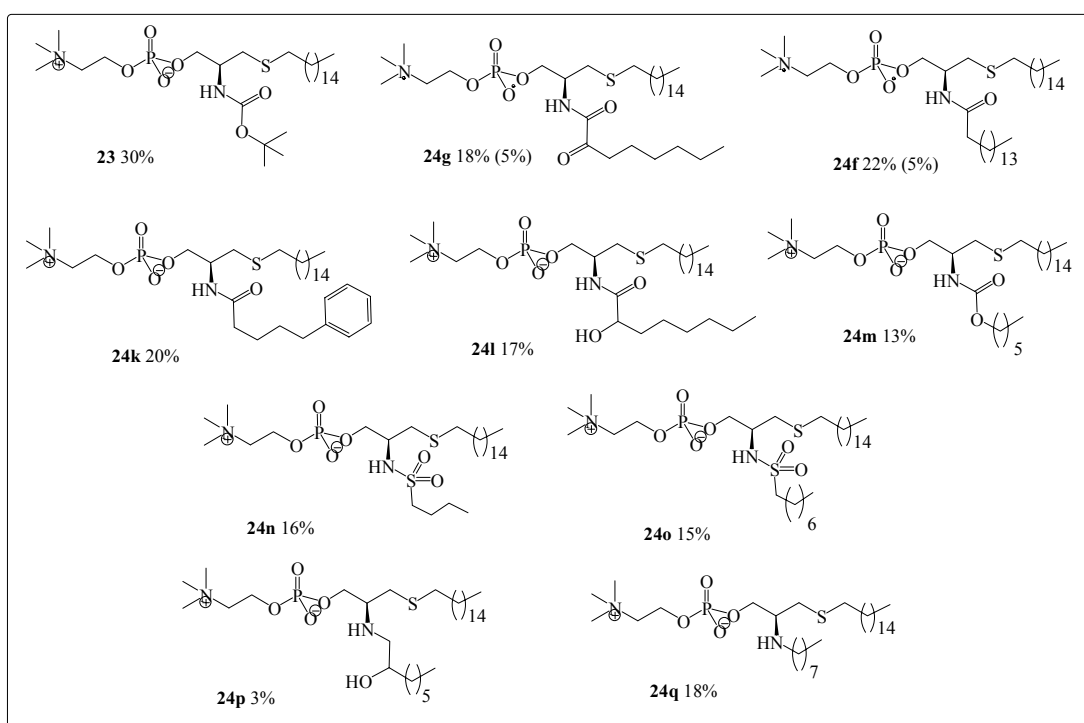


Figura 53. Estructura de tots els anàlegs de fosfolípids sintetitzats amb aquesta segona ruta de síntesi. Es mostra el rendiment global de síntesi a partir del tosil de Garner, i entre parèntesi el rendiment obtingut en la primera ruta dels compostos que s'han sintetitzat de les dues maneres.

3.2.4. Introducció de les diferents funcionalitats en el grup amino

Cal mencionar que aquestes reaccions va ser pràcticament iguals en les dues rutes sintètiques que es van seguir en el nostre grup de recerca. La principal diferència fou en la desprotecció amb àcid trifluoroacètic; ja que en la via 1 es va neutralitzar el medi i es va purificar l'amina lliure **18**, i en canvi en la via 2, es desprotegí igualment amb TFA,

però en aquest cas no es neutralitzà el producte, sinó que s'utilitzà la sal de trifluoroacetat obtinguda en la següent reacció sense cap purificació.

Per tal de preparar els compostos amb la funcionalitat amida a la posició *sn*-2 es van utilitzar dues reaccions molt conegudes, la primera consistia en una acilació de l'amina utilitzant els agents d'acoblament EDC i HOBt per tal d'activar l'àcid. Alternativament es va emprar la reacció de Schotten-Baumann⁸¹ a partir del clorur d'àcid, essent les dues metodologies equivalents en les dues vies sintètiques en termes de rendiment (entre un 75 i un 95%) i puresa dels productes finals obtinguts. El compost amb la cadena lateral de 16 àtoms de carboni (**24f**), i el que presenta la funcionalitat cetoàcid (**24g**) es van sintetitzar per les dues vies sintètiques, obtenint-se el producte desitjat amb major rendiment, en ambdós casos en l'acilació de la ruta sintètica 2.

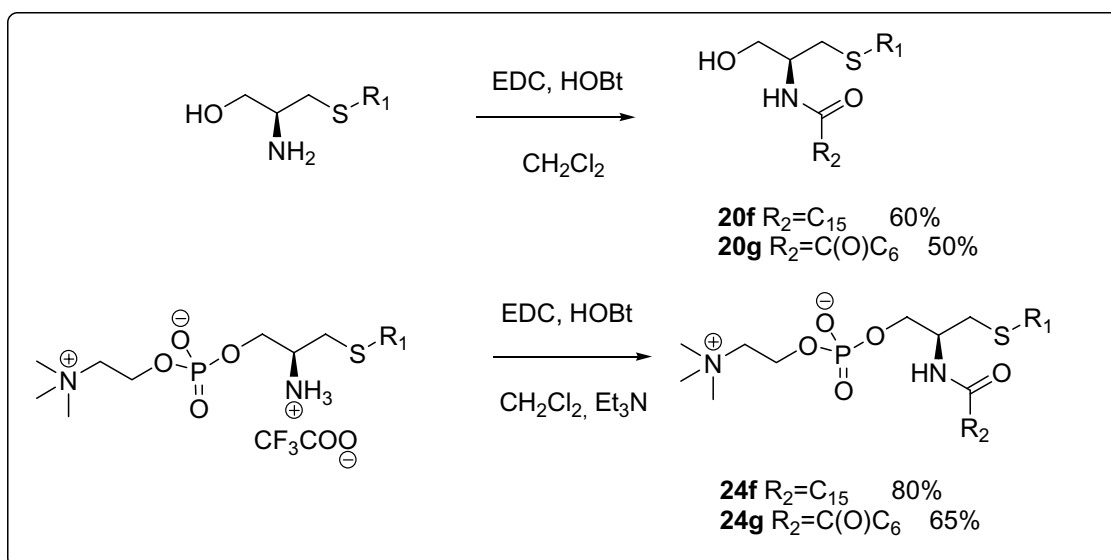


Figura 54. Comparativa de rendiments en la reacció d'acilació utilitzant els mateixos àcids, en les dues vies sintètiques. L'anàleg amb un grup α -hidroxiamida es va preparar amb les mateixes condicions que l' α -cetoàcid a través de la ruta sintètica 2 i amb un rendiment molt similar a l'anterior (60%).

Per tal d'obtenir anàlegs amb un grup carbamat com a mimètic del grup ester, calia prèviament preparar un intermedi que presentés la cadena lateral desitjada i un grup imidazol⁸², que és un molt bon grup sortint en aquesta reacció i ens va permetre introduir la nostra amina primària.

Per això es va utilitzar carbonildiimidazol, que reaccionà amb l'alcohol desitjat en el si de THF amb bons rendiments (70-80%), a continuació el producte format reaccionà selectivament amb l'amina del compost **18** o **23**, en presència de DMAP catalític en el primer cas, o sobreesteqüiomètric en el segon. En tots els casos la reacció va conduir al

producte desitjat, però els rendiments van ser majors (75-80%) en la formació dels compostos tipus **20** que quan es va sintetitzar un compost amb l'estructura de **24** (50%).

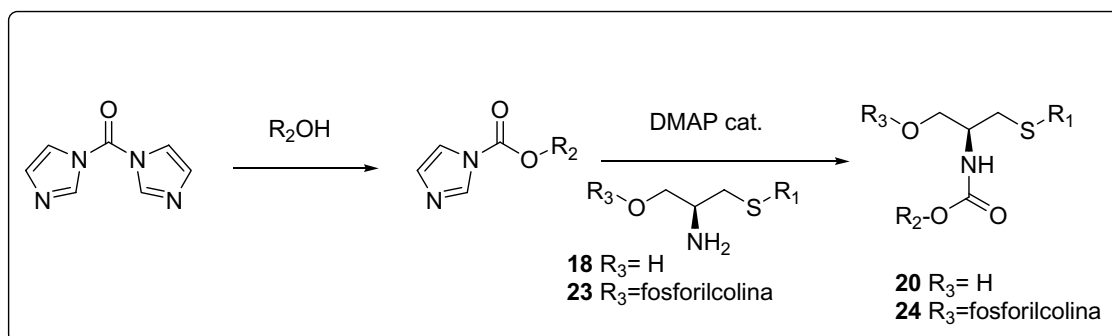


Figura 55. Síntesi dels carbamats en posició *sn*-2, a partir d'un carbamat d'imidazol preparat anteriorment. Via sintètica 1 ($R_3:H$) i via sintètica 2 ($R_3:\text{fosforilcolina}$).

Per tal de preparar els anàlegs amb un grup sulfonamida es va seguir la metodologia de Qin i col·laboradors⁸³ que consisteix en fer reaccionar una mescla de l'aminoalcohol i Na_2CO_3 en THF aquós amb el clorur de sulfonil corresponent a $0^\circ C$. Amb el medi bàsic feble utilitzat, els alcohol no reaccionen, fet que evita la seva protecció i la posterior desprotecció. En aquesta reacció també es va obtenir un millor rendiment utilitzat la primera ruta sintètica (80%) que en la segona (55-60%).

També es va preparar un anàleg amb un grup amino. En primera aproximació es va intentar preparar-lo mitjançant una reducció del grup amida d'un anàleg tipus **24**, no obtenint-se el producte desitjat. Així es va procedir a la seva síntesi a través d'una aminació reductora amb octanal. Després de la desprotecció del grup *tert*-butoxicarbonil amb TFA, es va dissoldre el trifluoroacetat en MeOH, es va addicionar $NaBH_3CN$ i octanal i es va deixar reaccionant 36 hores⁸⁴ conduint al producte desitjat amb un rendiment moderat (66%).

També es va preparar un altre anàleg amb un grup *N*-2-hidroxiocetil, en analogia als isòsters peptídics de tipus *N*-hidroxietil que són inhibidors de diferents proteases (veure figura 44). Per a dur a terme aquesta reacció es va utilitzar $LiClO_4$ com a àcid de Lewis per a promoure la reacció de **23TFA** i 1-hexiloxirà.⁸⁴ Es va obtenir el producte desitjat amb un rendiment molt baix, que podia ser causat perquè l'amina no era prou nucleòfila o també per la elevada polaritat del producte final que va dificultar la purificació cromatogràfica. Aquest rendiment no correspon a una reacció optimitzada.

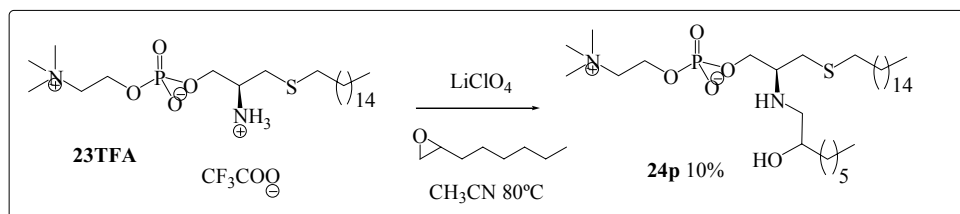


Figura 56. Reacció de formació del compost **24p**.

3.2.5. Valoració de les dues vies sintètiques utilitzades per la síntesis dels compostos **24**.

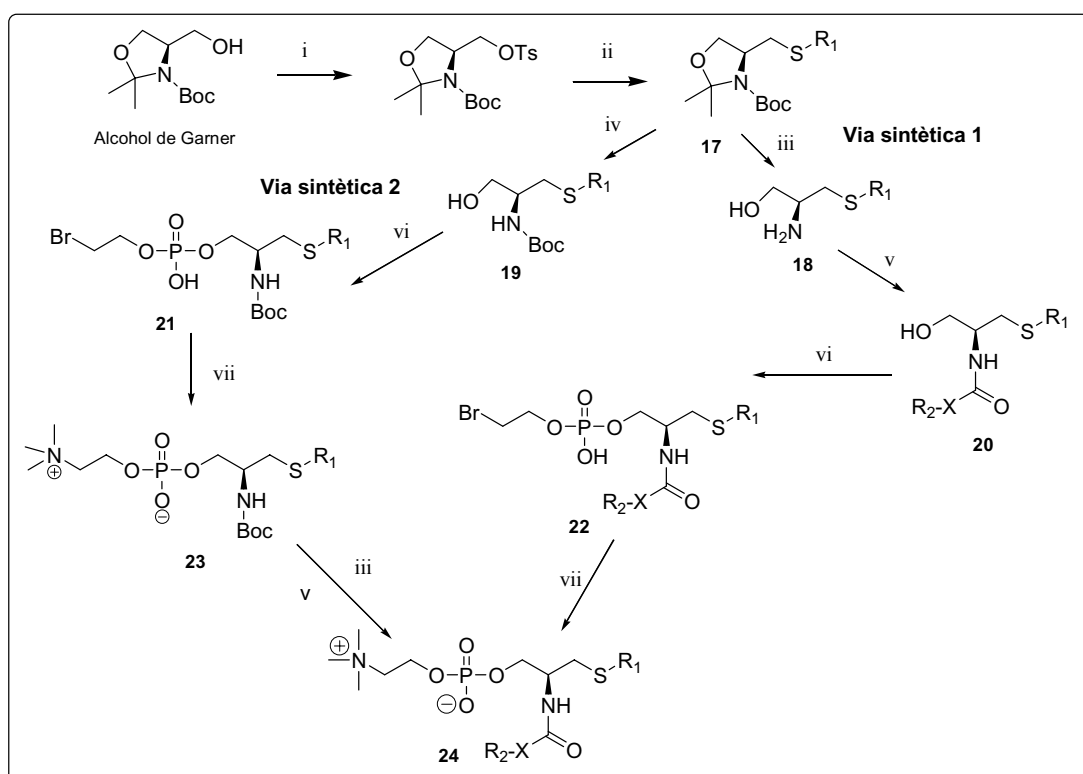


Figura 57. Esquema de les dues vies sintètiques possibles per tal d'obtenir anàlegs de fosfolípid. i) Et₃N, TsCl, DMAP, CH₂Cl₂; ii) R₁SH, NaH, DMF 40°C; iii) TFA, CH₂Cl₂; iv) pTsOH·H₂O, MeOH; v) veure apartat 3.2.4; vi) BrCH₂CH₂OP(O)Cl₂, CH₂Cl₂, N-metilimidazol; vii) Me₃N_{aq}, DMF, iPrOH, CHCl₃, 80°C.

Anteriorment ja s'havien utilitzats rutes sintètiques similars a la via sintètica 1, en la qual el darrer pas de síntesi consisteix en la fosforilació amb diversos agents fosforilants i finalment la formació del grup amoni quaternari.^{74,85,86} Per això primer es va pensar en aquesta ruta sintètica, la qual a més a més ens permetia la obtenció dels compostos **18** i **20**, els quals són anàlegs de esfinganina i ceramida, respectivament, fet que els feia molt interessants en el nostre grup, per tal de ser estudiats com a potencials moduladors de la biosíntesi de ceramides o altres esfingolípids (esfingomièlina, glucosilceramida...),

inhibint els enzims ceramidasa, dihidroceramida dessaturasa, esfingomielina sintasa, glucosil ceramida sintasa o altres⁸⁷⁻⁸⁹ com veurem més endavant.

No obstant quan en el nostre grup es va utilitzar aquesta ruta sintètica es van obtenir els productes desitjats en tots el casos, si bé amb uns rendiments molt baixos quan s'introduïa el grup fosforilcolina, sobretot amb la funció amida a la posició *sn*-2 (veure figura 51). Això està d'acord amb l'article de García i col·laboradors en el que afirmen, per una banda que la fosforilació utilitzant un fòsfor pentacoordinat és molt més difícil que amb un de tricoordinat, i per altra banda, que la reacció és més eficient si l'amina està protegida amb un grup electronatracent;⁷² probablement per això la reacció va funcionar millor amb carbamats i sulfonamides que amb amides.

L'observació que aquesta etapa donava millors rendiments, encara que no molt elevats, quan es treballava amb l'amina protegida amb *tert*-butiloxicarbonil que la mateixa reacció amb diferents grup amido, ens va conduir a proposar la via 2 com a alternativa.

A la literatura ja es troben altres procediments en que les diferents cadenes o funcionalitats de la posició *sn*-2 s'introdueixen al final de la síntesi, però utilitzant altres grups protectors, principalment el tritil,^{69,72} i només per introduir amides, algun carbamat i una sulfonamida. En el nostre laboratori es va aconseguir introduir una cetoamida, que sol presentar problemes de formació per baixa reactivitat, una amina utilitzant una aminació reductora i un aminoalcohol a través d'una obertura d'epòxid, ampliant el marge d'aplicació d'aquesta seqüència sintètica.

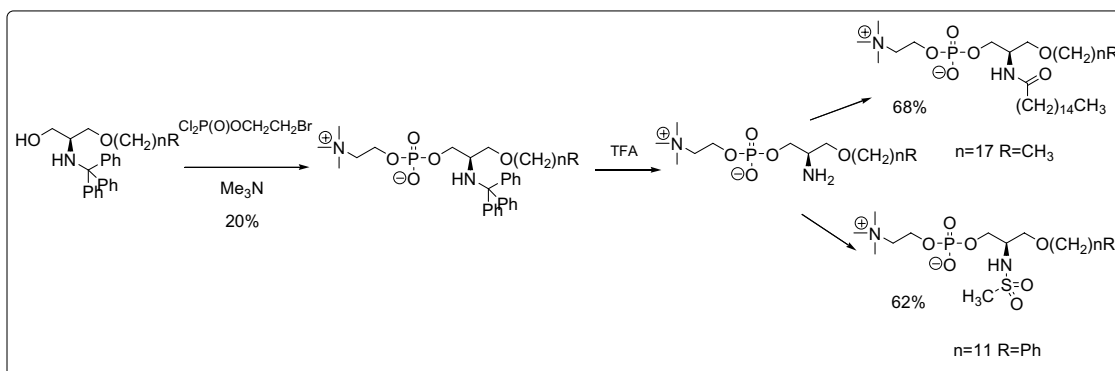


Figura 58. Esquema de síntesi d'anàlegs de fosfolípid en que s'introdueix la funcionalitat de la posició *sn*-2 al final de la síntesi.⁷²

Utilitzant la via sintètica 2 es van obtenir millors rendiments globals en la síntesi d'anàlegs amb la funcionalitat amida en la posició *sn*-2 (**24f** i **24g** 22 i 28% en la segona via per un 5% en la primera) i a més a més es va poder introduir altres funcionalitats (amino, *N*-2-hidroxiocetil, α -hidroxiamido) que difícilment es podrien preparar a través

de la ruta sintètica 1. No obstant, en la síntesi de fosfolípids amb la funcionalitat carbamat o sulfonamida en la posició *sn*-2, es van obtenir millors rendiments utilitzant la primera ruta sintètica (ruta 1: **24j** 30% i ruta 2: **24n** 16%).

Per tant, podem concloure que les dues vies sintètiques utilitzades són complementaries, essent la primera millor en el cas de preparar carbamats o sulfonamides i la segona essent millors en els altres casos.

3.2.6. Substitució de Fosfololina per un grup Carbamat.

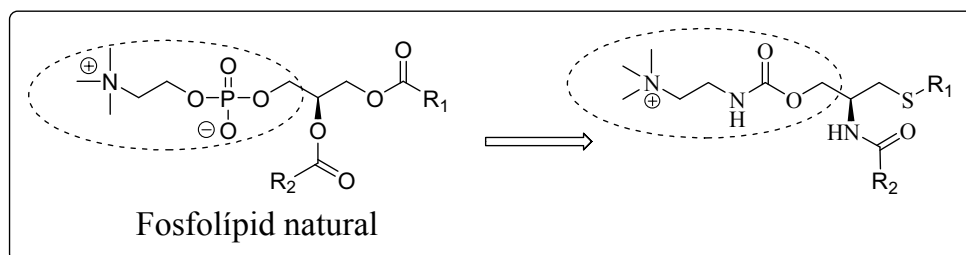


Figura 59. Fosfolípid natural i un potencial anàleg amb un carbamat substituint el grup fosfat.

A causa de la complexitat de la síntesi de fosfolípids, provocada per les dificultats en la introducció del grup fosfat i després el grup trimetilamoni, es va pensar en la síntesi d'un anàleg de fosfolípid substituint el grup fosforilcolina per un carbamat, que s'ha utilitzat en alguns estudis anteriors per tal de preparar inhibidors d'esfingomielinasa,⁹⁰ per provar si es podien obtenir uns compostos amb les mateixes o millors propietats inhibidores que els anàlegs sintetitzats prèviament i que fossin més assequibles sintèticament.

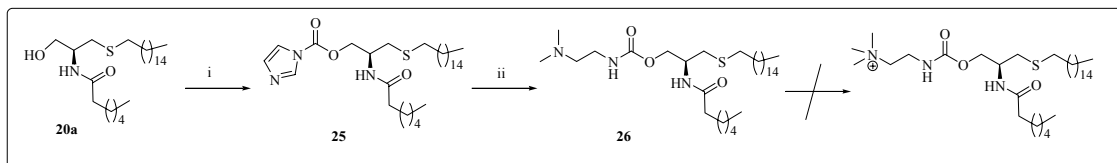


Figura 60. Síntesi d'un anàleg al grup fosforilcolina. i) THF, carbonil diimidazol; ii) THF, *N,N*-dimetiletilendiamina, DMAP catalític.

Es va partir del compost **20a**, ja que era el precursor de l'anàleg fosforilat que fins al moment ens havia donat millors resultats en estudis d'inhibició de la iPLA₂, i es va fer reaccionar amb carbonildiimidazol conduint quantitativament al carbamat intermedi **25**, que va reaccionar amb una amina primària, en el nostre cas *N,N*-dimetiletilendiamina

formant al producte desitjat **26** amb un elevada puresa del cru amb rendiment global del 86%. Els intents de *N*-metilació de **26** van ésser infructuosos.

3.3. Àcids borònics com a inhibidors de fosfolipases

Els àcids borònics són uns bons inhibidors de diferents proteases de serina,^{91,92} això es degut a que la seva estructura mimetitza molt bé el cetall intermedi del procés catalític d'aquests enzims.

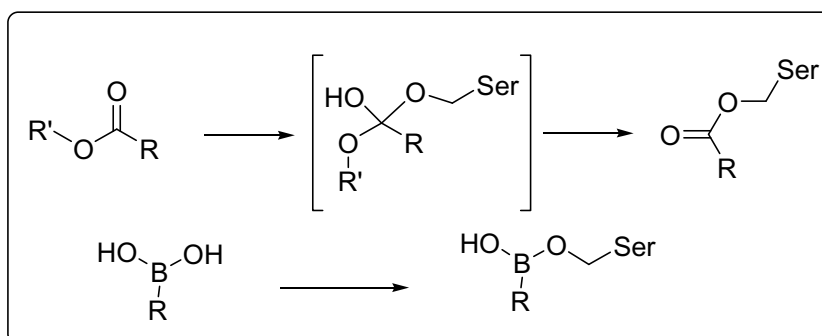


Figura 61. A dalt, primeres etapes del mecanisme d'hidròlisi d'un ester per una lipasa o proteasa de serina; a baix, interacció entre un àcid borònic i la serina del centre actiu del mateix enzim, s'observa que aquest compost és molt similar a un dels intermedis del mecanisme d'hidròlisi.

Degut a aquestes propietats dels àcids borònics i que les proteases de serina sembla que actuen molt igual a les fosfolipases i altres lipases de serina i tenen alguns inhibidors comuns (per exemple, podem recordar que BEL inhibeix iPLA₂ però que es va desenvolupar com un inhibidor de l' α -quimotripsina, una proteasa de serina) es va pensar que aquests compostos podrien ser uns bons candidats com a inhibidors d'aquest enzim.

Així doncs es van provar les propietats inhibidores enfront la fosfolipasa independent de calci de diferents àcids borònics comercials que presentessin grups aromàtics que es poguessin introduir en la butxaca hidrofòbica de l'enzim, igual com té lloc en BEL.

3.4. Síntesi d'altres anàlegs de ceramida.

3.4.1. Introducció.

Els esfingolípids, igual com els fosfolípids, també són components estructurals de les bicapes lipídiques, tot i que menys abundants. Aquests lípids tenen un paper molt important en el creixement, la supervivència i la mort cel·lular.⁹³

La molècula central en la biosíntesi dels esfingolípids és la ceramida. La ceramida es sintetitza intracel·lularment mitjançant la biosíntesi *de novo*, la qual s'inicia amb la condensació entre la serina i palmitoïl-CoA, i l'última etapa és la formació del doble enllaç catalitzada per la dihidroceramida dessaturasa. A continuació la ceramida es pot metabolitzar cap a diferents esfingolípids per glicosilació o fosforilació del grup hidroxil primari. A més la ceramida també es pot obtenir a partir d'esfingolípids més complexos, principalment per la degradació de l'esfingomielina en una reacció catalitzada per diferents esfingomielinases (veure figura 62).

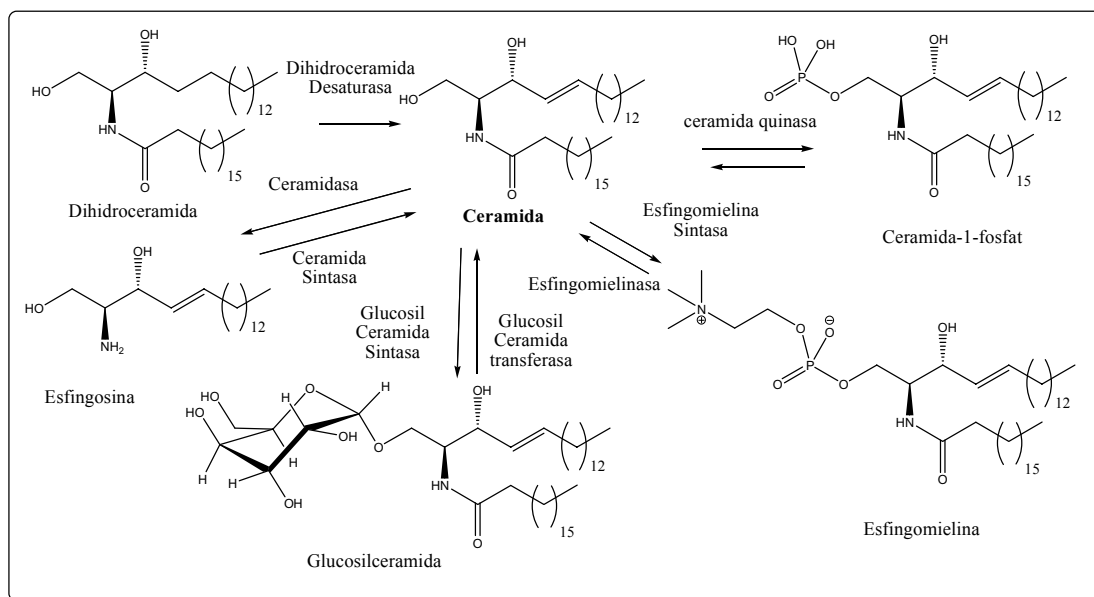


Figura 62. Metabolisme de la Ceramida.

3.4.2. Síntesi d'anàlegs de ceramida.

En els primers estudis d'inhibició dels compostos tipus **20** sobre la ceramidasa àcida no es van obtenir bons resultats d'inhibició, això ens va fer pensar que aquests compostos no eren bons mimètics del substrat, probablement, perquè els faltava l'alcohol de la

posició C3 de la ceramida, per això es va pensar en la síntesi d'una nova família d'estructura general **30**.

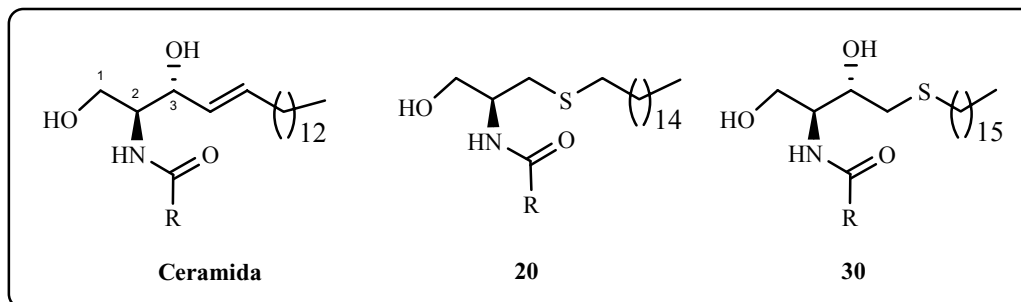


Figura 63. Estructura de la ceramida, els compostos tipus **20**, i els nous anàlegs de ceramida **30**. En ceramida R és una cadena lineal saturada amb un nombre imparell d'àtoms de carboni.

Per això es va pensar en reemplaçar el tosilat de l'alcohol de Garner per l'epòxid de la figura 64, sintetitzat per Carme Bedia en els nostres laboratoris seguint la metodologia de Moore i col·laboradors.⁹⁴

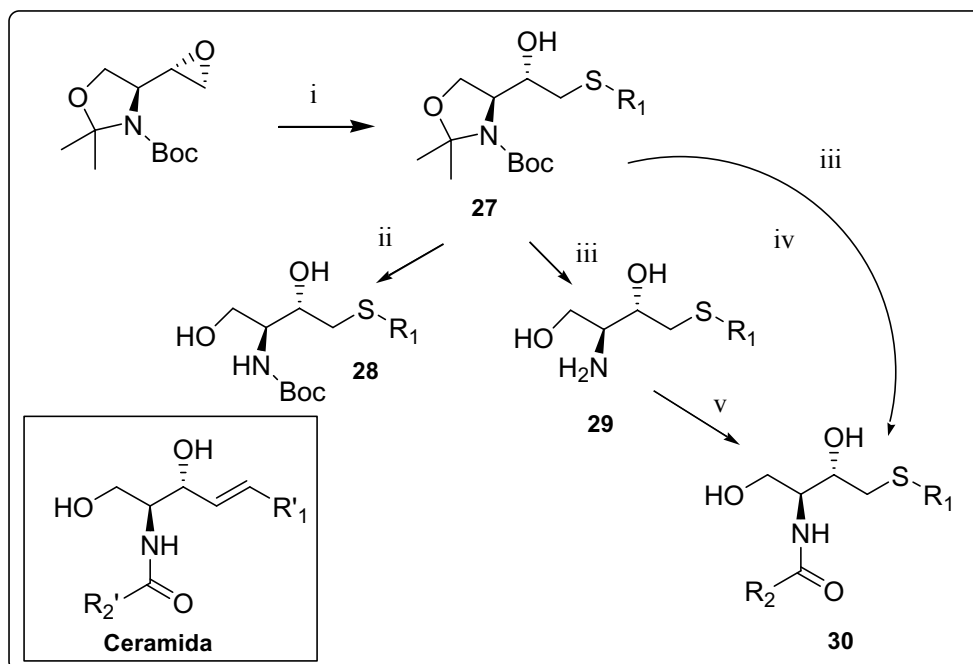


Figura 64. Síntesi dels anàlegs de ceramida tipus **30**. i) RSH, NaH, DMF 40°C; ii) MeOH, pTsOH; iii) TFA, CH₂Cl₂; iv) AcONa 50%, THF, R₂COOH; v) EDC, HOBt, R₂COOH.

A les cadenes laterals es van col·locar tres grups acil R₂ diferents; una cadena de set àtoms de carboni, amb analogia a GT11,⁸⁹ el grup pivaloïl, perquè en altres estudis d'anàlegs de ceramida del nostre grup havia donat bons resultats i una α-cetoamida de 8 àtoms de carboni.

Aquestes molècules es van provar sobre ceramidasa àcida, dihidroceramida dessaturasa i en apoptosi (cèl·lules A549) i en tots els assaigs enzimàtics es van obtenir els millors resultats amb el grup pivaloïl. Així per conèixer si l'activitat era deguda a aquest grup o a la presència de l'àtom de sofre, es va decidir introduir aquesta cadena lateral als compostos naturals, esfinganina i esfingosina. Aquests productes es van preparar mitjançant una acilació de Schotten-Baumann utilitzant clorur de pivaloïl sobre els compostos naturals assequibles comercialment, conduint als productes **31** i **32** respectivament.

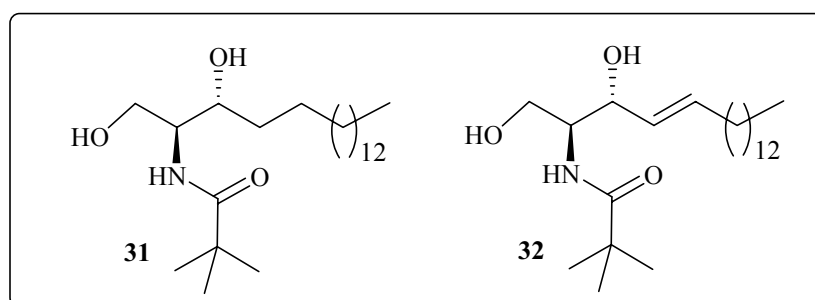


Figura 65. Estructura dels compostos **31** i **32**.

Finalment, degut als bons resultats obtinguts amb **30a** en l'assaig enzimàtic de la dihidroceramida dessaturasa, es va procedir a l'oxidació de l'àtom de sofre a sulfòxid, ja que en diversos inhibidors de dessaturases s'ha observat que quan el sofre es troba en el carboni que s'oxida a doble enllaç, aquest sofre pot en el centre actiu oxidar-se a sulfòxid, existint la probabilitat de que aquest compost fos responsable de les propietats inhibidores observades sobre l'enzim.^{95,96}

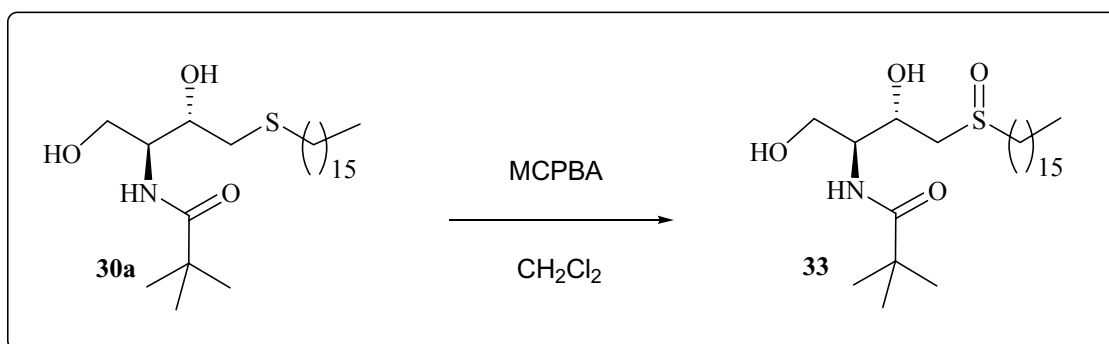


Figura 66. Oxidació del compost **30a** amb àcid m-cloroperbenzoic que condueix al sulfòxid **33**.

Quan es va realitzar aquesta reacció es va obtenir una mescla de diastereòmers, en proporció 1:1, que no es van poder separar.

3.5. Expressió del centre catalític de iPLA₂

Fins aquest moment s'han dissenyat potencials inhibidors de la iPLA₂ utilitzant com a model un inhibidor conegut de l'enzim i el substrat natural; no obstant és més eficaç dissenyar les molècules que encaixin millor en l'estructura del centre actiu de la proteïna. A diferència d'altres fosfolipases^{97,98} no s'ha pogut cristal·litzar la fosfolipasa independent de calci (grup VIA) sencera ni el seu centre catalític. Així es va decidir intentar obtenir la proteïna per poder estudiar-la mitjançant difracció de raigs X o altres tècniques. L'obtenció d'una gran quantitat de proteïna amb una elevada puresa és inviable mitjançant l'extracció de la mateixa de qualsevol teixit; per això es va proposar utilitzar tècniques de biologia molecular i expressar-la en un sistema procariota.

Aquest treball va ser realitzat al departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona sota la supervisió dels Drs. Pedro Marrero i Diego Haro.

Per tal de facilitar la purificació de la proteïna es decidí expressar una proteïna de fusió que contingués el centre actiu de la fosfolipasa unit a una etiqueta. Aquesta etiqueta ens havia de permetre purificar la proteïna de fusió mitjançant una columna d'afinitat.

La fosfolipasa conté 752 aminoàcids, no obstant, es creu que el centre actiu de la mateixa es troba en l'extrem C-terminal. L'extrem N-terminal conté una seqüència de 8 *ankyrin repeats* que es creu que intervenen en l'oligomerització de la proteïna que és activa en forma de tetràmer.

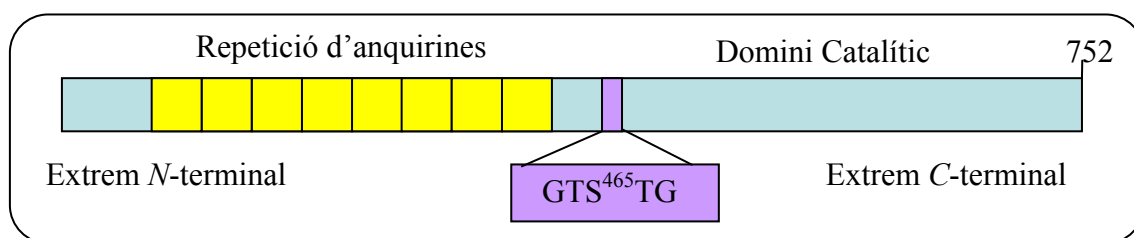


Figura 67. Esquema de la seqüència de la fosfolipasa (grup VIA). L'extrem N-terminal conté els ankyrin repeats, i a l'extrem C-terminal el domini catalític amb el domini de lipasa GTSTG, a on S⁴⁶⁵ és la serina que actua com a nucleòfila en el centre catalític de l'enzim.

Poc abans dels nostres estudis en cèl·lules que presentaven apoptosi es van observar fragments de proteïna que només presentaven l'extrem C-terminal i eren més actives que la proteïna nativa, confirmant que l'extrem N-terminal no forma part del centre actiu.⁹⁹

Per això es va decidir fusionar aquests dos fragments a una etiqueta. Aquests dos fragments s'anomenaren LiPLA i siPLA.

Per expressar la proteïna es va partir de la seqüència de DNA de fosfolipasa de ratolí (*mus musculus*, numero d'accés al genBank U88624).

3.5.1. Amplificació del DNA motlle amb les dianes de restricció:

A partir de DNA motlle de iPLA₂ de ratolí (*mus musculus*) i amb els encebadors indicats en l'apartat 6.2.3, es va amplificar mitjançant reacció de PCR la seqüència d'àcids nucleics dels dos fragments (siPLA i LiPLA) introduint les dianes de restricció que ens van permetre el clonatge amb el vector utilitzat.

3.5.2. Clonatge amb el vector pRSET-B:

Els dos fragments obtinguts mitjançant reacció de PCR es clonaren en un vector d'expressió en procariota (pRSET-B); el qual incorpora un pèptid d'uns 30 aminoàcids en l'extrem aminoterminal. Aquest pèptid, a més del codó d'inici presenta un epítop de sis histidines, que ens permetria purificar la proteïna recombinant expressada mitjançant cromatografia d'afinitat amb cations metàl·lics immobilitzats (IMAC), un epítop XpressTM, a través del qual es podia detectar la proteïna expressada amb la tècnica Western-Blot utilitzant l'anticòs comercial Anti-XpressTM, i una seqüència de DNA que codifica per un pèptid que es capaç d'hidrolitzar-se selectivament mitjançant l'acció d'una entereoquinasa, que ens permetria separar la nostra proteïna de l'etiqueta utilitzada.

Les construccions obtingudes s'anomenaren pRSETsiPLA i pRSETLiPLA i les proteïnes de fusió expressades tenien uns pesos de 29 i 37 kDa respectivament.

3.5.3. Expressió de les proteïnes de fusió:

S'utilitzaren les cèl·lules competents DH5 α per tal d'obtenir DNA utilitzant un kit comercial.

A continuació es transformaren les dues construccions en una altra soca bacteriana BL21(DE3), es va seguir el protocol d'expressió (veure apartat 6.2.9) i se separaren les proteïnes del cultiu utilitzant un gel d'acrilamida 12%. La tinció amb blau de Comassie ens va indicar que la proteïna no s'expressava o s'expressava en uns nivells molt baixos ja que no s'observà cap proteïna sobreexpressada amb el pes molecular esperat (dades no mostrades).

Es va utilitzar una altra soca bacteriana BL21(DE3)pLysS, la qual contenia un vector de resistència a cloramfenicol que impedia l'expressió en absència d'inductor, això es va fer per si s'expressava la proteïna mentre anava creixent el cultiu fos tòxica i per això el bacteri expulsés el vector que conté la proteïna que es volia expressar.

Amb les mateixes condicions d'expressió tampoc es van observar les proteïnes desitjades quan es va tenyir el gel amb blau de Comassie.

Es va repetir l'expressió amb les construccions en les cèl·lules BL21(DE3) però en aquest cas es va utilitzar la tècnica de Western-Blot per manifestar la presència o absència de les proteïnes de fusió (veure apartat 6.2.10). En aquest cas si es van observar les bandes esperades, tal com es pot veure en la figura 68.

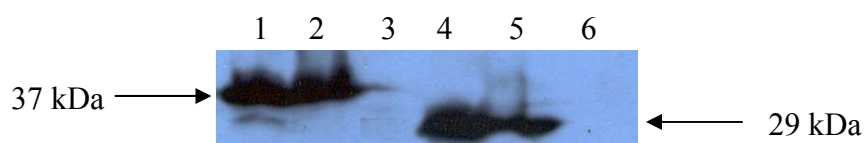


Figura 68. Expressió de pRSETLiPLA (1: proteïna total, 2: residu, 3 : sobrenedant) i pRSETsiPLA (4:proteïna total, 5: residu, 6 : sobrenedant). Detecció mitjançant Western-Blot amb l'anticòs Anti-XpressTM.

Aquest experiment ens va demostrar que teníem expressió de les proteïnes de fusió, però que s'expressaven en poca quantitat i a més en el residu fet que impossibilitava la seva purificació.

Es va pensar que els baixos nivells d'expressió podien estar causats per una diferència en els codons utilitzats pels mamífers per expressar la fosfolipasa i els codons que utilitza i és capaç de reconèixer *E. coli*, així per tal de millorar els nivells d'expressió es va transformar en les cèl·lules BL21(DE3) RosettaTM 2, que contenen un plasmidi (amb resistència a cloramfenicol) que proporciona els tRNA poc freqüents en bacteri (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC i CGG).

Es va expressar amb les mateixes condicions, però amb tinció amb blau de Comassie tampoc es va veure l'expressió de la proteïna (dades no mostrades).

Una altra possibilitat era que l'activitat fosfolipasa de la proteïna de fusió expressada fos tòxica per la cèl·lula i dificultés la seva expressió, per això es va expressar la siPLA en presència de diferents concentracions de BEL (inhibidor de la iPLA₂)⁴⁵ per tal de veure si així augmentaven els nivells d'expressió (veure apartat 6.2.11). En aquest cas no es va separar el residu del sobrenedant ja que només es volien veure si augmentava l'expressió o no. Com es pot veure en la figura 66, no es veu expressió de la siPLA amb tinció amb Blau de Comassie. Mitjançant anàlisi per Western-Blot si es veu la presència

de la proteïna de fusió, però no s'observa augment en el nivell d'expressió de la proteïna, a l'augmentar la concentració d'inhibidor.

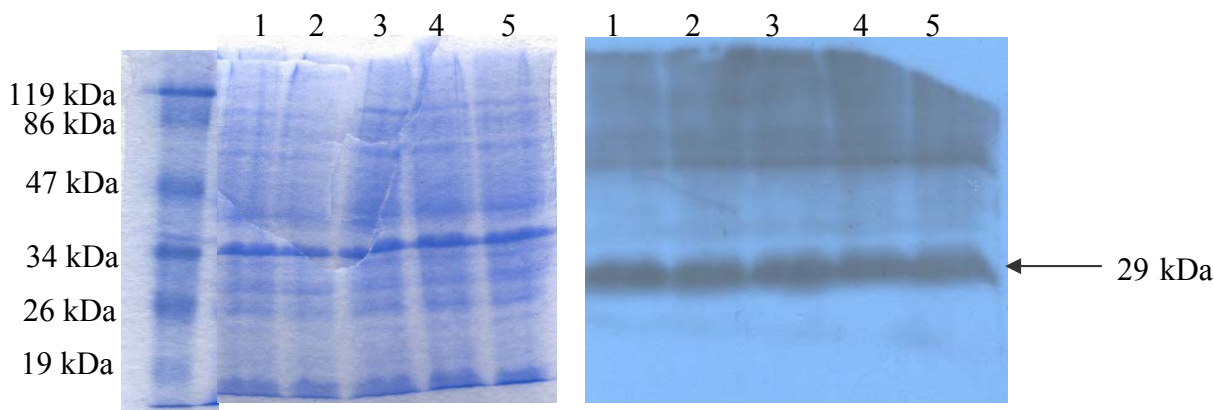


Figura 69. Expressió de pRSETsiPLA una concentració de BEL de 1, 10 i 100 nM en els carrils 3, 4 i 5 respectivament. Es carril 1 és un control i en el carril 2 només s'ha addicionat DMSO. A la Figura A s'observa la tinció amb Blau de Comassie, mentre que a la figura B podem veure el revelat mitjançant Western-Blot.

A part d'intentar millorar els nivells d'expressió també s'havien d'optimitzar les condicions per tal de solubilitzar la proteïna. Aquests experiments només es van dur a terme amb la construcció pRSETsiPLA, pel fet que es va creure més fàcil de solubilitzar una proteïna de mida menor. Es van utilitzar les construccions en les cèl·lules BL21(DE3)Rosetta™ 2.

Per tal de solubilitzar la proteïna es va treballar a 30°C i a 37°C, i un cop centrifugat el cultiu es va addicionar un detergent (Triton X-100) i es va sonicar.

En la figura 70 es pot veure que tant a 30°C com a 37°C la siPLA es troba en el residu.

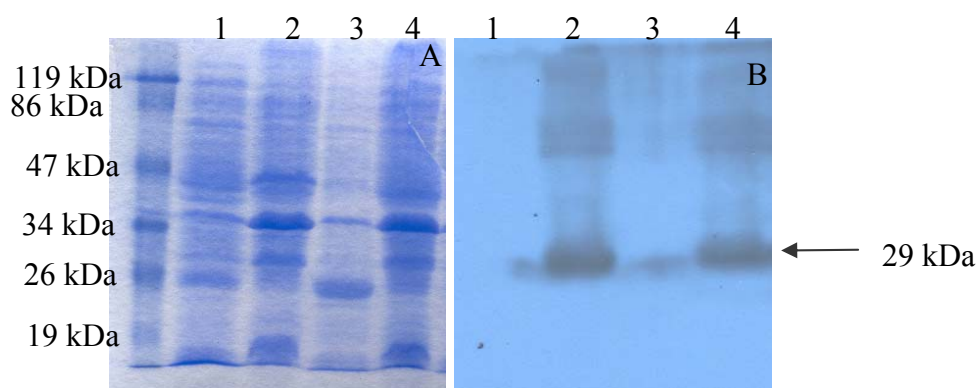


Figura 70. Expressió de pRSETsiPLA a 30°C en sobrenedant (1) i residu (2) i de pRSETsiPLA a 37°C en sobrenedant (3) i residu (4). A la figura A s'observa la tinció amb blau de Comassie i a la figura B podem veure el revelat mitjançant Western-Blot.

Després de tots aquests resultats es va arribar a la conclusió que la proteïna quedava irremeiablement en la fracció insoluble dels extractes proteics i es va abandonar aquest abordatge per a l'estudi dels seus possibles inhibidors.

4. Discussió

4.1. Assaig d'inhibició de fosfolipasa A₂

Per mesurar l'activitat de la iPLA₂ es van utilitzar homogenats de cèl·lules Jurkat (limfòcits T) com a font de la fosfolipasa i 1-palmitoil-2-[³H]palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (100 μM) com a substrat radioactiu. Els potencials inhibidors es van dissoldre, generalment, en DMSO a un concentració final de 25 μM, i en cada assaig es va mesurar l'activitat de la proteïna quan s'addiciona BEL a aquesta concentració com a control de l'assaig i com a blanc s'utilitza l'activitat de la proteïna quan s'addiciona el dissolvent que s'utilitza per dissoldre els compostos.

Al final de l'assaig es mesurà l'àcid palmític radioactiu lliure mitjançant cromatografia en capa fina utilitzant una mescla d'eluent (*n*-hexà/dietil èter/àcid acètic 70:30:1). (veure apartat 6.3 per un procediment més detallat dels assaigs biològics.)

Els compostos que van modificar més l'activitat de iPLA₂ es van assajar sobre la cPLA₂ per tal d'observar si eren o no selectius.

Pels assaigs d'inhibició de cPLA₂ es va canviar una mica el procediment ja que calia un substrat amb àcid araquidònic a la posició *sn*-2, per això s'utilitzà com a substrat una membrana citoplasmàtica amb àcid araquidònic radioactiu.

Mencionar que els assajos de fosfolipasa A₂ els va realitzar la Dra. Rebeca Pérez a l'Institut de Biologia y Genética Molecular de Valladolid sota la supervisió del Dr. Jesús Balsinde.

4.1.1. Anàlegs fluorats

A la figura 71 es representa l'activitat d'iPLA₂ quan s'addicionen els diferents anàlegs fluorats de BEL. També per comparació es mostra l'activitat quan s'addiciona l'inhibidor irreversible BEL.

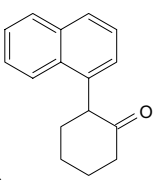
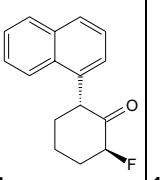
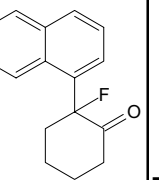
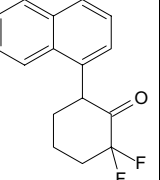
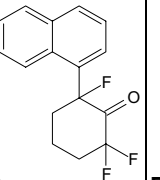
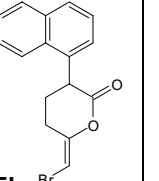
					
2	5	10	7	9	BEL
95±7%	106±14%	77±1%	75±1%	114±11%	30±4%

Figura 71. Percentatge d'activitat de la iPLA₂ quan s'addicionen els diferents productes fluorats, respecte l'activitat de la proteïna amb l'addició del vehicle.

En principi sembla que al augmentar el nombre d'àtoms de fluor, convertint la cetona en més electrofílica, augmenta la inhibició sobre iPLA₂, malauradament el compost que presenta tres àtoms de fluor no presenta gens d'activitat.

Les trifluorometilcetones presenten *slow binding* (reaccionen molt lentament) per tant podria ser que aquesta baixa reactivitat fos deguda a aquest factor, malauradament s'ha observat que només presenten *slow binding* en la inhibició sobre cPLA₂, però no té lloc el mateix procés quan aquestes interaccionen amb iPLA₂.^{28,44}

4.1.2. α,α' -ariloxiciclohexanones (14 i 15)

A la figura 72 es mostren les activitats obtingudes de diferents α,α' -diariloxiciclohexanones que presenten totes elles el grup naftil, igual que en BEL i un altre anell aromàtic més o menys polar. Es va pensar que al augmentar la polaritat del segon anell aromàtic fins a col·locar-hi un grup àcid carboxílic, igual que en els inhibidors de Connolly,^{32,33} en el qual aquest grup àcid mimetitzava el grup fosfat, llavors la inhibició dels productes augmentaria. Desafortunadament, això no va ser així i cap dels productes va disminuir l'activitat de la fosfolipasa en estudi.

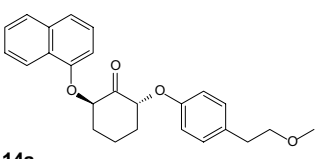
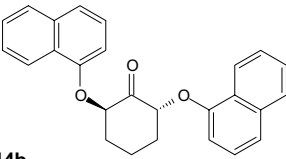
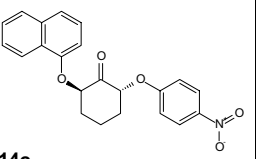
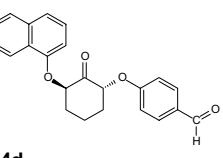
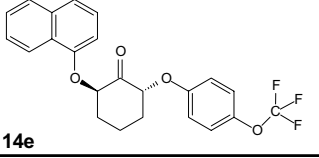
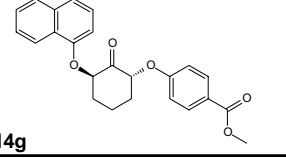
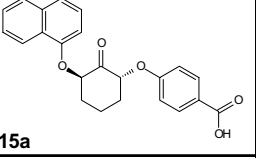
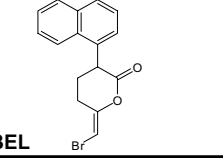
 14a	 14b	 14c	 14d
102±1	101±15	106±8	91±2
 14e	 14g	 15a	 BEL
93±7	114±8	112±12	40±4

Figura 72. Comparació de l'activitat de la iPLA₂ quan s'addicionen diferents α,α' -diariloxiciclohexanones, en que totes tenen un grup naftol.

A continuació es van provar altres anells aromàtics per observar si n'hi havia algun que encaixava millor en el centre actiu de l'enzim. A la figura 73 es representa l'activitat de iPLA₂ quan s'addicionen diferents α,α' -diariloxiciclohexanones que presenten totes elles l'anell aromàtic derivat de l'àcid benzoic. Tampoc es va poder obtenir un bon inhibidor en aquest cas, no obstant hi ha diferents fets remarcables.

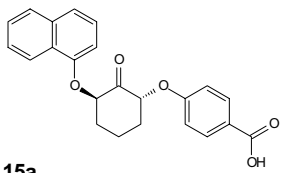
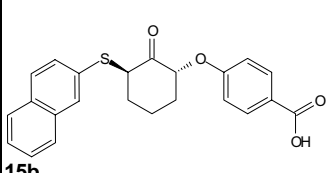
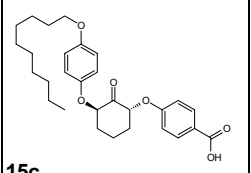
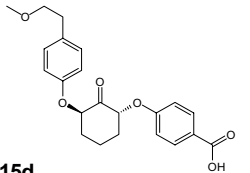
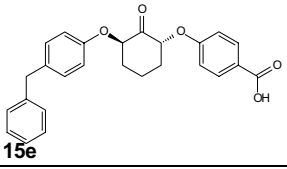
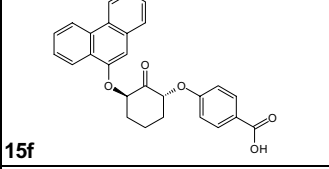
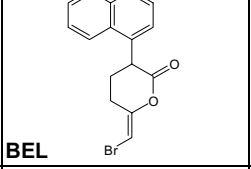
 15a	 15b	 15c	 15d
112±12%	79±8%	102±5%	108±8%
 15e	 15f	 BEL	
206±24%	144±15%	37±1%	

Figura 73. Comparació de l'activitat de la iPLA₂ quan s'addicionen diferents α,α' -diariloxiciclohexanones, en que totes tenen un grup àcid carboxílic.

A diferència del compost **15a**, que conté un grup 1-naftiloxi, i no disminueix l'activitat de la proteïna, el compost **15b**, que presenta un grup 2-tionaftil, disminueix lleugerament l'activitat de iPLA₂. La diferència entre els dos compostos podria ser deguda a la diferència en la disposició tridimensional dels anells de naftalè que només permetria en un cas encaixar amb la butxaca hidrofòbica del centre actiu, i estaria agreujada per la presència del segon anell aromàtic que també condiciona la posició de l'anell de ciclohexanona en el centre actiu de l'enzim (veure figura 74).

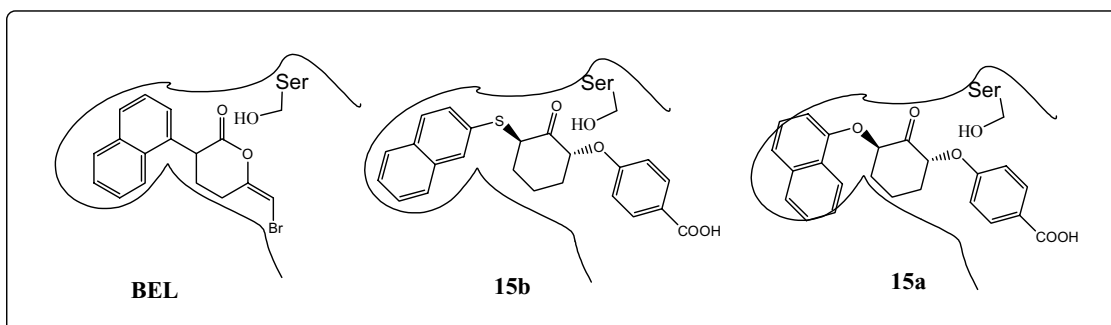


Figura 74. Representació de BEL, **15b** i **15a** en el centre actiu de iPLA₂. Mentre que els anells de naftalè de BEL de **15b** encaixen perfectament en la butxaca hidrofòbica, l'anell de naftalè del compost **15a** no pot entrar en aquesta cavitat. Aquesta podria ser una possible explicació de la diferència d'inhibició dels dos compostos.

També s'observen dos compostos **15e** i **15f** amb els quals s'obté una major activitat de l'enzim que en el cas de **15e** és el doble. Considerant que totes aquestes molècules (**15**) tenen una estructura molt similar es possible pensar que això no pot ser degut a una activació inespecífica (per exemple per formació de micel·les) i per tant hauria de ser provocat per una interacció amb la proteïna ja sigui en el centre actiu o en una altra localització.

A la figura 75 es representen les activitats de iPLA₂ enfront altres α,α' -diariloxiciclohexanones preparades. Cap d'aquests compostos modifica l'activitat de la proteïna en qüestió. El més remarcable d'aquesta taula és el compost **14i**, que és el precursor del compost **15b** en que el grup àcid està protegit en forma de ester al·lílic. En aquest cas la petita inhibició del compost **15b** es perd completament demostrant que el grup àcid carboxílic, que es pot pensar mimetitza el grup fosfat, és important per aquesta inhibició, seguint la hipòtesi de Connolly³³.

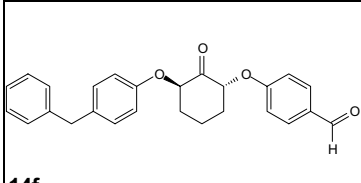
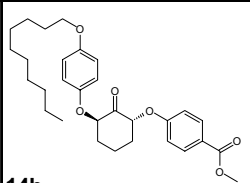
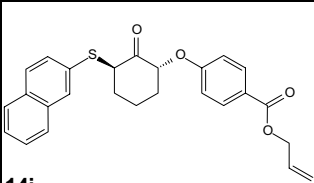
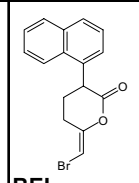
			
14f	14h	14i	BEL
94±11%	119±1%	103±7%	40±4%

Figura 75. Percentatge d'activitat de la fosfolipasa iPLA₂ quan s'addicionen diferents α,α' -diariloxiciclohexanones.

Després d'obtenir aquests resultats es va publicar un treball que descrivia l'activitat de α -cetoamides de cadena llarga, com a inhibidors de iPLA₂ i cPLA₂.³¹ (veure figura 76) Alguns d'aquests compostos que presenten un grup àcid inhibeixen cPLA₂ i alguns dels que presenten l'àcid en forma d'ester metílic inhibeixen cPLA₂ i iPLA₂. Desafortunadament en el nostre cas no va tenir lloc el mateix efecte ja que els compostos **14g** i **14h** no van modificar l'activitat de la fosfolipasa en estudi, i com hem vist abans el compost **15b** perd tota l'activitat quan es substitueix el grup àcid per un ester.

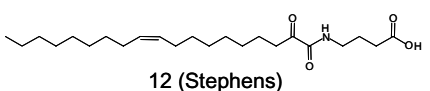
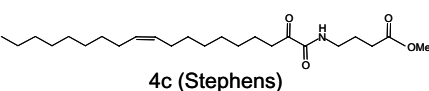
		
	12 (Stephens)	4c (Stephens)
iPLA	no hi ha inhibició	X(50)= 0.067 ± 0.003
cPLA	X(50)= 0.011 ± 0.003	X(50)= 0.012 ± 0.014

Figura 76. Activitat de la fosfolipasa iPLA₂ i cPLA₂ quan s'addicionen dos compostos que només difereixen en el grup funcional terminal. Mentre que el compost que presenta un ester metílic inhibeix els dos enzims, el compost que presenta un àcid carboxílic només inhibeix cPLA₂.³¹

4.1.3. α -ariloxiciclohexanones (16)

Tots els compostos preparats anteriorment (**14** i **15**) presentaven dos anells aromàtics i cap d'ells no va mostrar resultats d'inhibició remarcables. Per tant es va decidir preparar

uns altres anàlegs de BEL que només posseïssin un únic anell aromàtic, ja que podia ser que la presència de dos substituents en posició α a la cetona impedis que aquesta interactués amb el centre actiu. Per tant es va preparar la sèrie de α -ariloxiciclohexanones **16**.

A la figura 77 es mostren les activitats de la iPLA₂ quan s'addicionen diferents molècules de la sèrie **16**, les quals són més semblants a BEL que les de les sèries **14** i **15**.

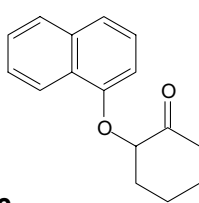
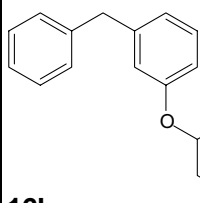
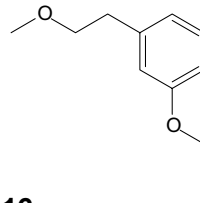
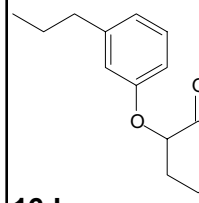
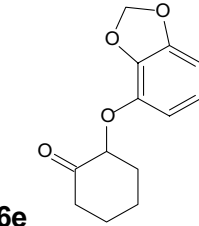
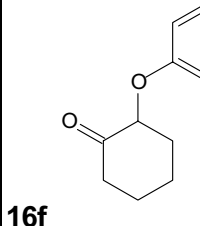
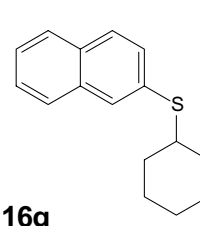
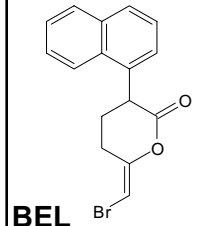
 <p>16a</p>	 <p>16b</p>	 <p>16c</p>	 <p>16d</p>
81±1%	139±20%	203±11%	125±5%
 <p>16e</p>	 <p>16f</p>	 <p>16g</p>	 <p>BEL</p>
118±4%	99±1%	86±6%	51±5%

Figura 77. Activitat de la fosfolipasa iPLA₂ quan s'addicionen les diferents α -ariloxiciclohexanones.

Tal com ja passava en els compostos de la sèrie **15**, en aquest cas també els únics compostos que presenten una certa activitat inhibidora són els que presenten un grup naftalè, **16a** i **16g**. No obstant, en aquest cas, tot i la diferent connectivitat dels anells aromàtics, un d'ells està unit per la posició 1 (**16a**) i l'altre per la posició 2 (**16b**), no hi ha diferències en la inhibició, fet que si tenia lloc en els compostos **15a** i **15b**.

En aquest cas també es van obtenir compostos que proporcionaven una major activitat de la proteïna, el més destacat era el compost **16c**, que duplicava l'activitat de la fosfolipasa. Seguint el raonament fet anteriorment sembla que aquest fet no pot ser degut a interaccions inespecífiques.

Després d'observar que no hi havia cap molècula que pugues disminuir l'activitat de la iPLA₂ de manera comparable a BEL es va abandonar aquesta aproximació, però abans es va comprovar si l'activació de les molècules **15e** i **16c** era exclusiva de la fosfolipasa VIA (iPLA₂) o també modificava l'activitat de la fosfolipasa IVA (cPLA₂). A la figura

78 es pot observar que aquestes molècules presenten diferents resultats en les dues PLA₂. La molècula **16c** provoca un augment en l'activitat de les dues fosfolipases, però en la cPLA₂ aquest augment és molt menor. Més interessant és la molècula **15e** la qual provoca que l'activitat en iPLA₂ sigui el doble, i en canvi sigui quasi la meitat en cPLA₂; aquest fet fa pensar que aquesta molècula es podria utilitzar per distingir entre aquestes dues fosfolipases.

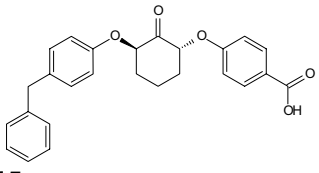
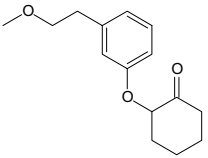
	% Activitat iPLA ₂	% Activitat cPLA ₂
 <p>15e</p>	206±24%	66±7%
 <p>16c</p>	203±11%	125±7%

Figura 78. Comparació de l'activitat de la fosfolipasa VIA i IVA quan s'addicionen els diferents compostos que augmenten l'activitat de iPLA₂.

Quan es van dissenyar aquestes molècules es pensava que l'estructura de BEL, un anell de sis membres i un anell aromàtic de tipus naftalènic proporcionaria molècules capaces d'inhibir selectivament iPLA₂. No obstant, cap dels anàlegs de BEL sintetitzats en el nostre grup presenta propietats inhibidores sobre la iPLA₂ de potència similar a BEL en les condicions utilitzades. Cal recordar que es va treballar amb una relació entre el substrat i el potencial inhibidor de 4:1, ja que en aquestes condicions ja hi ha una gran inhibició mitjançant BEL, però aquest és un inhibidor irreversible molt potent. En el millor dels casos es va obtenir una molècula que interaccionava diferent amb les dues fosfolipases amb un factor de 4; en canvi BEL reacciona mil vegades més amb iPLA₂ que no amb cPLA₂.

4.1.4. Anàlegs de Substrat

Els anàlegs de BEL sintetitzats fins al moment no havien proporcionat inhibicions remarcables, per això es va preparar una sèrie d'anàlegs de substrat per estudiar si

aquests podien modificar l'activitat de la iPLA₂ i si això es produís, estudiar la seva selectivitat respecte cPLA₂.

Aquests compostos presentaven un esquelet de glicerol amb un tioèter de setze àtoms de carboni a la posició *sn*-1, el grup fosfocolina a la posició *sn*-3 i diferents grups funcionals i cadenes laterals a la posició *sn*-2.

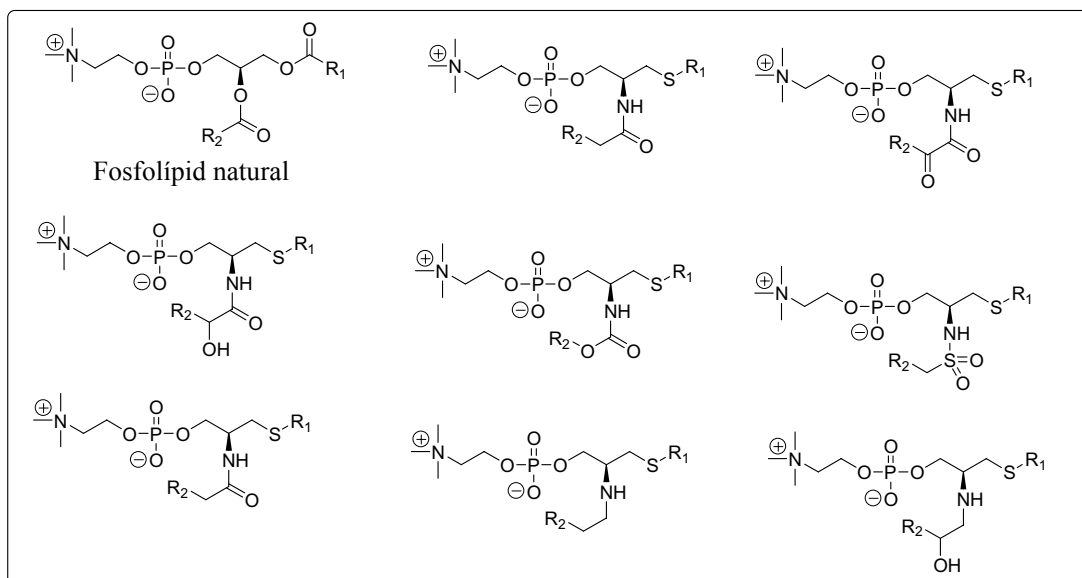


Figura 79. Estructura d'un fosfolípid natural i estructura dels anàlegs amb diferent funcionalitat en la posició *sn*-2 que es sintetitzen en aquest treball. R₁: cadena saturada de 16 àtoms de carboni, R₂: diferents cadenes laterals (cadenes lineals, ramificades o cadenes amb grups aromàtics).

S'havien preparat els anàlegs amb un grup amida (**24a-24f**), amb un carbamat (**24i**), i amb una sulfonamida (**24j**); quan es van obtenir els resultats d'inhibició es va observar que els compostos amb grups aromàtics propers a l'enllaç amida no provocaven cap disminució de l'activitat de la proteïna. El compost **24a**, amb una cadena lateral de 6 àtoms de carboni, va ser el compost que va inhibir de manera més potent l'enzim. Quan la cadena era més llarga o ramificada (**24f** i **24c**), llavors la inhibició era lleugerament més petita (veure figura 80).

El carbamat **24i** i la sulfonamida **24j**, tot i tenir unes llargades de cadena molt diferent al compost **24a**, també van mostrar força capacitat per inhibir a la iPLA₂.

Després d'aquests resultats es va decidir preparar altres carbamats i sulfonamides amb una cadena lateral similar a **24a**, per intentar millorar l'activitat. A part també es van preparar altres anàlegs amb diferents grups funcionals amb una cadena lateral similar a **24a** (**24g**, **24l**, **24p**, i **24q**).

Encara que els compostos aromàtics no havien mostrat cap mena d'activitat es va decidir preparar **24h** i **24k**, que contenen un grup aromàtic més llunyà al grup funcional amida.

Els compostos van ésser assajats en les condicions descrites anteriorment però en aquest cas els compostos es van dissoldre en cloroform i es van obtenir els resultats que es mostren a la figura 80.

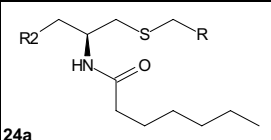
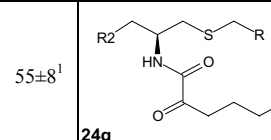
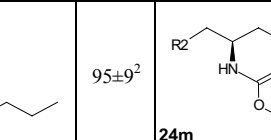
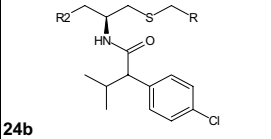
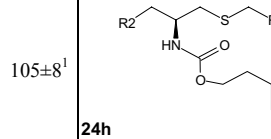
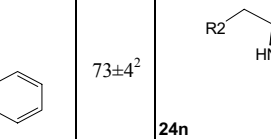
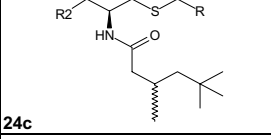
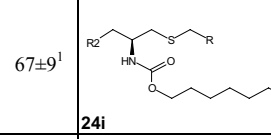
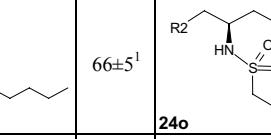
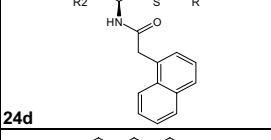
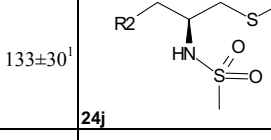
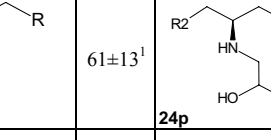
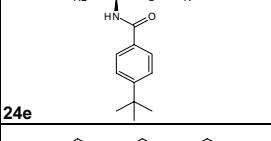
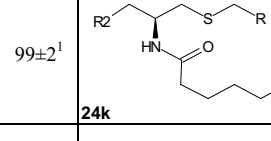
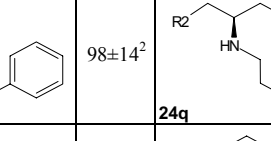
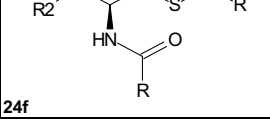
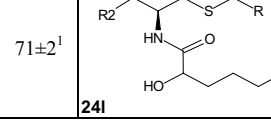
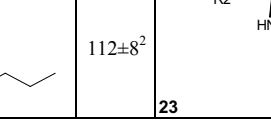
 24a	55±8 ¹	 24g	95±9 ²	 24m	104±3 ²
 24b	105±8 ¹	 24h	73±4 ²	 24n	80±4 ²
 24c	67±9 ¹	 24i	66±5 ¹	 24o	106±13 ²
 24d	133±30 ¹	 24j	61±13 ¹	 24p	53±11 ²
 24e	99±2 ¹	 24k	98±14 ²	 24q	142±8 ²
 24f	71±2 ¹	 24l	112±8 ²	 23	80±10 ²

Figura 80. Percentatge d'activitat de iPLA₂ quan s'addicionen diferents anàlegs de substrat respecte l'activitat sense inhibidor en les mateixes condicions d'assaig que s'han utilitzat anteriorment. ¹En aquest cas amb l'addició de BEL hi havia una activitat de 20±1%, mentre que en ² aquesta era de 42±14%. R: (CH₂)₁₄CH₃; R₂: O-fosfocolina.

Entre tots els compostos amb diferents grup funcionals amb una cadena lateral de 6-8 àtoms de carboni, els millors són els que presenten les funcionalitats amida (**24a**), i aminoalcohol (**24p**), de fet comparant amb la inhibició de BEL en cada assaig, el compost **24p** és bastant millor que **24a** ja que només inhibeix un 10% menys que el compost irreversible.

Es van preparar unes amides més electrofíliques i per tant a priori més reactives, aquestes foren la α -cetoamida (**24g**) i la α -hidroxiamida (**24l**) no obstant quan es va

realitzar l'assaig d'inhibició amb aquests compostos l'activitat enzimàtica no es va veure afectada.

Amb les sulfonamides es va observar que al augmentar la llargada de la cadena va disminuir la capacitat d'inhibir a la proteïna. Entre els compostos preparats la sulfonamida d'un sol àtom de carboni va ser el compost que va presentar millors propietats inhibidores. A la figura 81 es pot observar que les activitats de les tres sulfonamides que presenten la cadena lateral de 1, 4 i 8 àtoms de carboni correlacionen molt bé amb una recta.

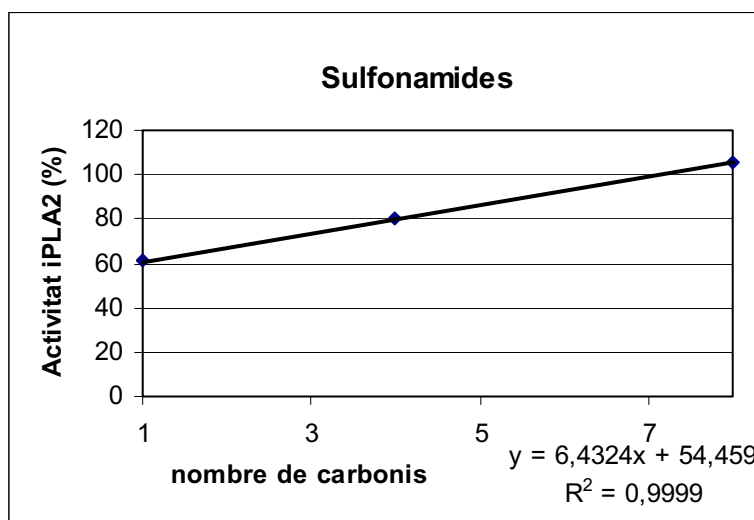


Figura 81. Activitat de iPLA₂ quan s'addicionen tres sulfonamides respecte el nombre de carbonis de la cadena lateral de les mateixes. Es pot observar que tot i que tenim pocs punts, aquests tres punts correlacionen molt bé amb una recta.

En canvi amb els carbamats va tenir lloc un efecte tot just el contrari, el carbamat de 10 àtoms de carboni (**24i**) va ésser el que major inhibició va mostrar, mentre el de 6 àtoms de carboni (**24m**) no va presentar gens d'inhibició. Segurament en aquest cas, els carbamats es comporten com les amides a l'inhibir sPLA₂, en que IC₅₀ disminueix al augmentar la cadena des de 6 fins a 10 àtoms de carboni.²² No obstant cal remarcar que el nombre de carbonis òptim no es coneix en aquest moment, ja que no s'ha preparat una sèrie completa.

El compost **23** amb el grup Boc es comporta de manera diferent als derivats lineals ja que aquest va presentar una petita inhibició (20%), i el carbamat (**24h**) que té una llargada similar al carbamat (**24m**) però presenta llavors el grup aromàtic va presentar un 27% d'inhibició, mentre que **24m** no inhibia gens.

Les amides sembla que es comporten com les sulfonamides ja que la inhibició de la cadena de 6 àtoms (**24a**) és major que la de 15 àtoms de carboni (**24f**).

Amb el carbamat **24h** s'havia observat com una addició d'un anell aromàtic a 4 enllaços del carbonil era positiva per la inhibició sobre iPLA₂, en canvi amb les amides sembla que no té lloc el mateix fenomen, ja que l'amida (**24k**) presenta un fenil a 5 enllaços del carbonil i no presenta gens d'activitat. Per tal d'establir una correlació estructura-activitat s'haurien de preparar altres amides amb l'anell aromàtic a diferents distàncies del grup carbonil. Aquest estudi ha quedat fora de l'abast de la present tesi doctoral.

L'anàleg de fosfolípid amb un grup carbamat enlloc del grup fosforilcolina (**26**) va presentar una activitat de la proteïna del 140%, per tant es va observar que en el cas de la iPLA₂ no es podia mimetitzar el grup fosfat per aquest carbamat.

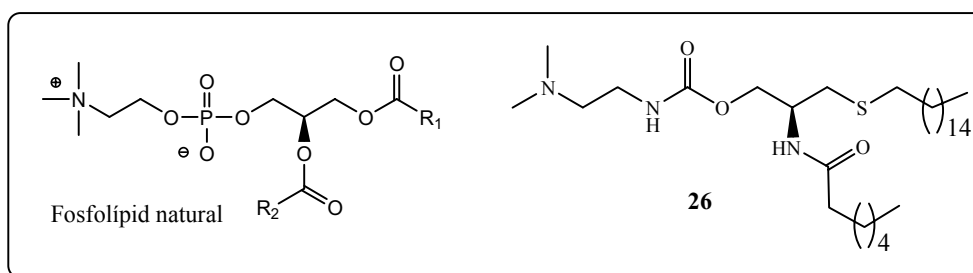


Figura 82. Comparativa entre el substrat natural, i un anàleg on es va substituir el grup fosforilcolina per un carbamat (**26**), a la posició *sn*-1 es va col·locar el mateix grup que en tots els anàlegs anteriors, i a la posició *sn*-2 es va utilitzar la mateixa cadena lateral que **24a**.

Després de tots aquests resultats es va creure convenient mesurar l'activitat cPLA₂ en presència de diferents compostos, per estudiar la selectivitat dels mateixos. Es va treballar amb els compostos **24a**, **24j** i **24p**, ja que eren els que havien mostrat major inhibició en els estudis sobre iPLA₂.

%inhibició cPLA ₂	97	88	86	88
% inhibició iPLA ₂	-	45	40	47

Figura 83. Percentatge d'inhibició de cPLA₂ i iPLA₂ de diferents inhibidors preparats en aquest treball comparant amb l'inhibidor de cPLA₂ comercial pirrofenona. R: (CH₂)₁₄CH₃; R₂ : O-fosfocolina.

Desafortunadament, els anàlegs de substrat **24a**, **24j** i **24p**, que inhibeixen iPLA₂ no són selectius i també inhibeixen cPLA₂. Al igual com s'observa a la bibliografia sembla que

no es possible preparar inhibidors selectius de iPLA₂, però si de cPLA₂.(veure figura 76)³¹

4.1.5. Àcids Borònics

A la figura 84 es mostren els resultats d'inhibició de diferents àcids borònics comercials que presentaven tots ells diferents grups aromàtics.

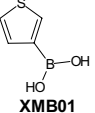
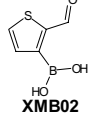
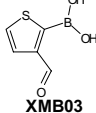
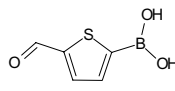
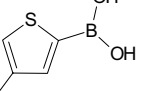
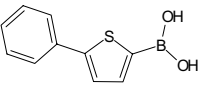
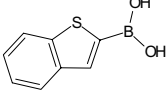
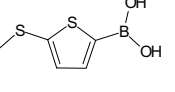
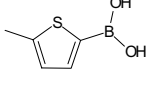
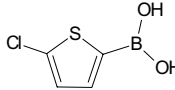
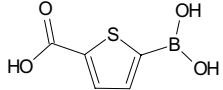
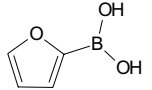
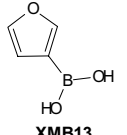
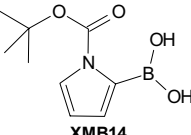
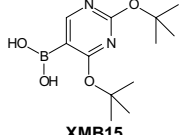
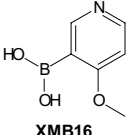
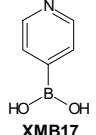
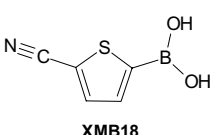
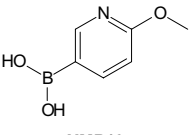
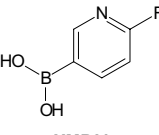
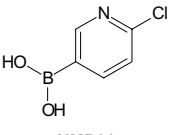
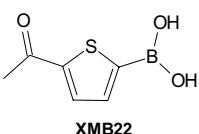
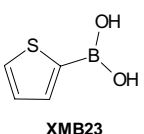
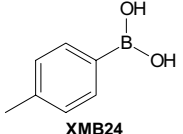
 XMB01	82 ± 14%	 XMB02	104 ± 20%	 XMB03	65 ± 8%
 XMB04	68 ± 18%	 XMB05	97 ± 7%	 XMB06	57 ± 18
 XMB07	± 13% i 45	 XMB08	84 ± 25%	 XMB09	114 ± 12%
 XMB10	93 ± 29%	 XMB11	130 ± 1%	 XMB12	165 ± 22%
 XMB13	120 ± 24%	 XMB14	94 ± 9%	 XMB15	101 ± 25%
 XMB16	102 ± 32%	 XMB17	127 ± 63%	 XMB18	87 ± 11%
 XMB19	82 ± 9%	 XMB20	139 ± 36%	 XMB21	86 ± 18
 XMB22	63 ± 8%	 XMB23	80 ± 20%	 XMB24	28 ± 3

Figura 84. Percentatge d'activitat de iPLA₂ quan s'addicionen diferents àcids borònics comercials.

Tot i que només es va assajar una petita biblioteca d'àcids borònics d'estructura bastant similar, es va observar que petits canvis en l'estructura provocaven grans canvis en

l'activitat, això fa pensar que aquests compostos poden ser bons candidats a definir inhibidors útils de la iPLA₂, de fet ja se'n va trobar un (**XMB24**) que inhibia un 70% de l'activitat; una inhibició semblant a la de BEL, malauradament aquest compost no presentava selectivitat respecte cPLA₂, ja que també l'inhibia un 60%. No obstant amb una família molt més gran es esperable que es puguin trobar compostos que inhibeixin iPLA₂ de manera potent i selectiva.

4.2. Enzims del metabolisme d'esfingolípid

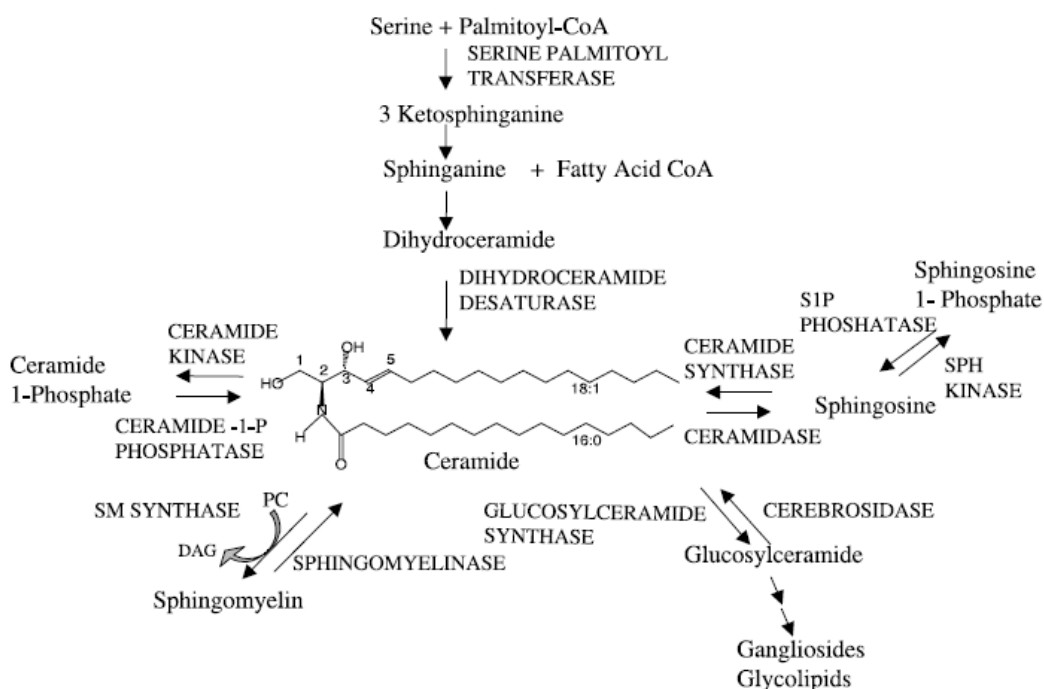


Figura 85. Metabolisme dels esfingolípid.

Com ja s'ha mencionat anteriorment, els esfingolípid, igual com els fosfolípid, també són components estructurals de les membranes cel·lulars. Tot i que són menys abundants, presenten un paper molt important en el creixement, la supervivència i la mort cel·lular. La ceramida és la molècula central en la biosíntesi dels esfingolípid.

Així anàlegs de ceramida que modulin la formació o degradació de la mateixa són compostos potencialment interessants terapèuticament. En aquest sentit, en el grup ja s'havien preparat compostos amb la mateixa estructura que **20** i s'havien estudiat com a inhibidors de la ceramidasa àcida, la qual degrada la ceramida a esfingosina.¹⁰⁰

Com en general els compostos d'estructura general **20** (figura 63) no es van mostrar molt potents en la inhibició d'aquest enzim, es van preparar uns nous anàlegs que

presentessin l'alcohol de la posició C3 (**30**) de la ceramida per estudiar les seves propietats inhibidores en diferents enzims del metabolisme d'esfingolípids i comparar-los amb els compostos tipus **20**.

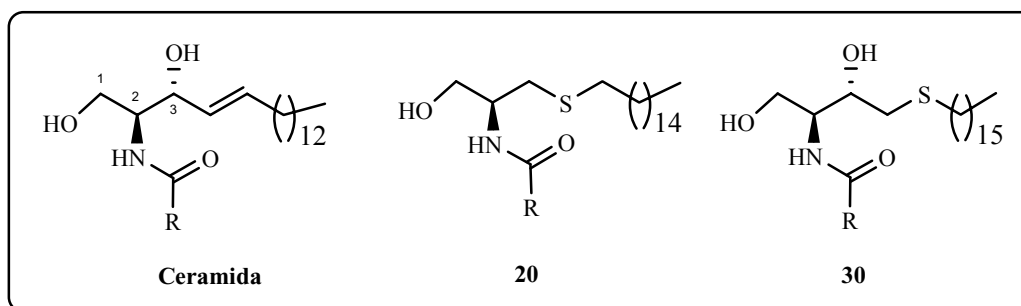


Figura 86. Estructura de la ceramida, els compostos tipus **20**, i els nous anàlegs de ceramida **30**. En ceramida R és una cadena lineal saturada amb un nombre imparell d'àtoms de carboni.

Els assaigs que es mostren a continuació han estat portats a terme per altres membres del mateix grup de recerca, i es descriuen aquí els resultats preliminars que permeten augurar que aquests nous anàlegs de ceramida obren una nova línia de recerca molt prometedora ja que poden actuar en diferents enzims clau en la síntesi d'esfingolípids i a més poden provocar apoptosi en diferents línies cel·lulars.

4.2.1. Ceramidasa

La ceramidasa és l'enzim que catalitza la hidròlisi de la ceramida a esfingosina alliberant un àcid gras. Hi ha tres tipus de ceramidases segons el pH òptim sigui àcid, bàsic o neutre.¹⁰¹ La ceramidasa àcida està involucrada en la malaltia de Faber¹⁰², així en tots els assaigs que s'han dut a terme s'ha utilitzat aquest enzim.

Aquest enzim és molt important en el cicle dels esfingolípids ja que produeix ceramida, la qual es pot acumular a la cèl·lula o pot proporcionar un ampli ventall de metabòlits, els quals participen en processos intracel·lulars com la proliferació o la mort cel·lular mitjançant apoptosi.

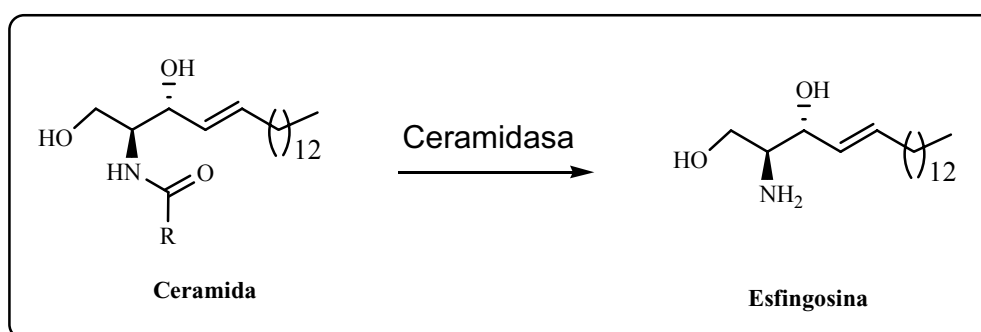


Figura 87. Hidròlisi de la ceramida catalitzat per la ceramidasa.

Les diferents molècules sintetitzades es van assajar sobre ceramidasa àcida utilitzant un substrat cumarínic, en cèl·lules Mohnsen AcCer 10X, amb unes concentracions de substrat i d'inhibidor de 16 μ M durant 4 hores. Aquest assaig va ser realitzat en els nostres laboratoris per Carme Bedia sota la supervisió de la Dra. Gemma Fabriàs.

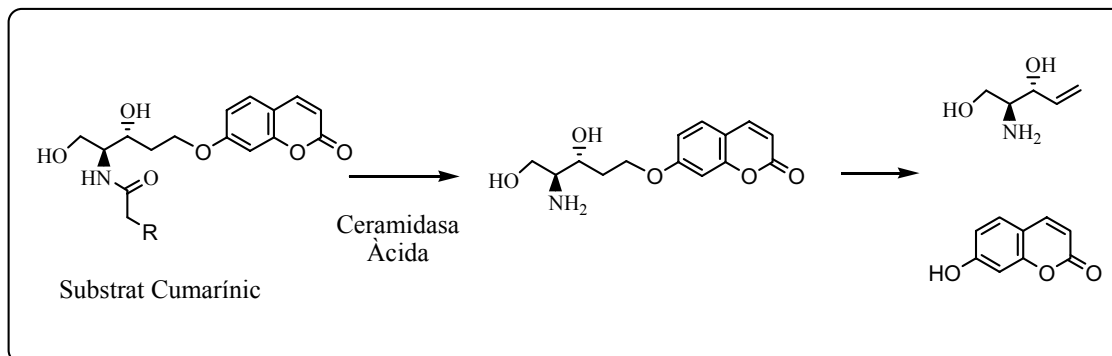


Figura 88. Hidròlisi del substrat cumarínic utilitzat en aquest assaig, el producte obtingut en les condicions d'assaig sofreix una β -eliminació i proporciona la coumarina que es pot detectar per fluorescència.

A la figura 89 es mostra el percentatge d'inhibició de diferents anàlegs de ceràmida. Es pot observar que el compost que presenta més inhibició (**30a**) conté un grup alcohol en la posició C3 de la ceràmida, però presenta en la cadena lateral el grup pivaloíl, i enlloc del doble enllaç presenta un grup tioèter.

20a	20k	28	30a
10 \pm 3	58 \pm 8	47 \pm 10	88 \pm 2
30b	30c	31	32
29 \pm 8	36 \pm 4	59 \pm 2	50 \pm 4

Figura 89. Percentatge d'inhibició de ceramidasa àcida per diferents anàlegs de ceràmida. R: $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$.

Abans d'interpretar aquests resultats cal tenir en compte que la ceràmida provoca apoptosi i mort cel·lular en diferents tipus cel·lulars,^{101,103} per tant podria ser que alguns d'aquests anàlegs també. Si això fos així els resultats no serien del tot fiables, ja que si es moren les cèl·lules que expressen la ceramidasa, llavors hi ha menys activitat enzimàtica i per tant la inhibició observada està provocada per la inhibició real més la mort cel·lular. Per això es va mesurar la mort cel·lular en aquestes condicions.

Cal mencionar que el compost (**30a**) provoca mort cel·lular en aquestes cèl·lules en les condicions d'assaig (veure figura 93), per tant el percentatge d'inhibició pot estar alterat per aquest fet; no obstant el compost que presenta el grup Boc (**28**) presenta la mateixa toxicitat, en canvi el percentatge d'inhibició és molt menor, per tant es pot concloure que el compost **30a** realment presenta inhibició sobre la ceramidasa àcida.

Amb els resultats dels diferents compostos amb un grup pivaloïl, heptil o 2-oxooctil es pot observar que el grup pivaloïl és imprescindible per l'activitat inhibidòria d'aquests compostos. També es pot observar que el grup alcohol en posició C3 és força important ja que comparant els compostos **20a** i **20k** amb els compostos **30b** i **30a** s'observa una diferència important en l'activitat.

Quan es va acilar amb el grup pivaloïl l'esfinganina i l'esfingosina es van obtenir els compostos **31** i **32** respectivament. L'assaig dels mateixos va mostrar que la inhibició respecte **30a** era notablement inferior però aquests compostos són més selectius ja que no van provocar mortalitat cel·lular.

4.2.2. Dihidroceramida Dessaturasa (DHCD)

La dihidroceramida dessaturasa és l'enzim responsable de la introducció del doble enllaç entre les posicions 4 i 5 de la dihidroceramida per formar la ceramida.

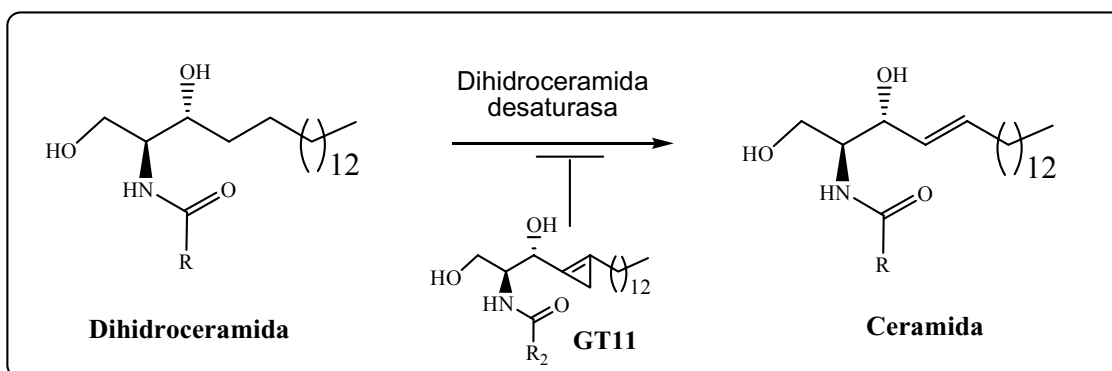


Figura 90. Introducció del doble enllaç entre C4 i C5 catalitzat per la dihidroceramida dessaturasa. Aquest procés està inhibit per GT11. R2: $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$.

La importància d'aquest enzim dins la biosíntesi *de novo* rau en el fet que el seu substrat, la dihidroceramida, no presenta cap dels efectes biològics observats per la ceramida i per tant pot ser una diana terapèutica molt atractiva sobre la qual actuar, ja que la inhibició d'aquest enzim (amb l'objectiu de disminuir la quantitat de ceramida)

ocasionaria una acumulació de dihidroceramida sense cap més activitat dins la cèl·lula. D'aquesta manera es podrien disminuir els importants efectes de la ceramida sobre diversos processos cel·lulars. Per això en el nostre grup s'havia desenvolupat un inhibidor d'aquest enzim (GT11). Aquest es va dissenyar coneixent que l'anell de ciclopropè inhibia les dessaturases d'àcids grassos.⁸⁹ Amb analogia a GT11, els compostos **30** també poden ser bons inhibidors ja que compostos que presenten grups tioèter en la posició de dessaturació dels àcids grassos també s'han descrit com a inhibidors de la reacció de dessaturació enzimàtica.⁹⁶

En l'assaig enzimàtic de la DHCD s'addiciona un substrat fluorescent (37μM) i el possible inhibidor a una suspensió de microsomes que contenen la dessaturasa, s'incuba 90 minuts a 37°C, s'extreuen els lípids i s'analitzen per HPLC amb un detector de fluorescència, i es detecta la relació entre el substrat que s'ha dessaturat i el substrat de partida, veure figura 91. Aquest assaig va ser realitzat en els nostres laboratoris per José Muñoz-Olaya sota la supervisió de la Dra. Gemma Fabriàs.

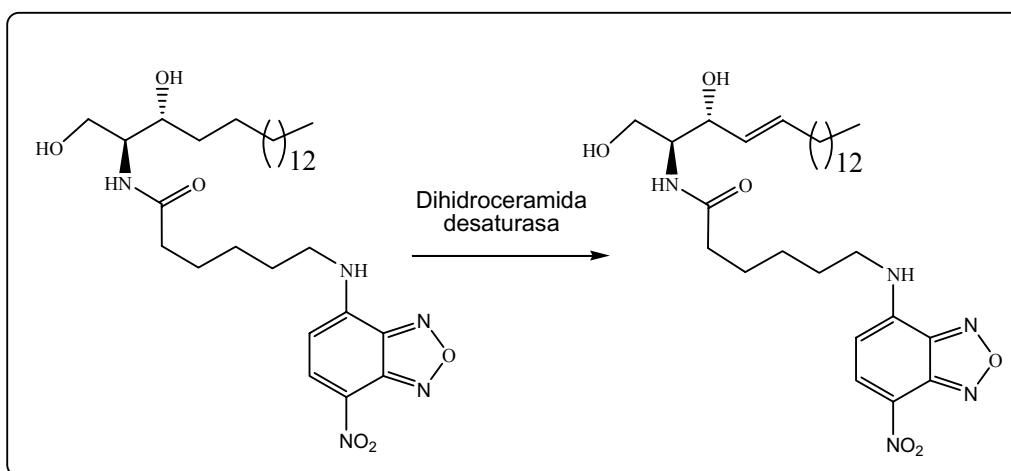


Figura 91. Procés de dessaturació del substrat utilitzat. La relació entre aquestes dues espècies detectades en HPLC mitjançant fluorescència determina l'activitat de l'enzim.

En estudis preliminars sembla ser que **30b**, que presenta la mateixa cadena lateral N-acil que GT11 no presenta inhibició. En canvi, el compost **30a** amb un grup N-pivaloil presenta inhibició de la dessaturasa a concentracions micromolars amb una IC₅₀ de 28.2μM (figura 92).

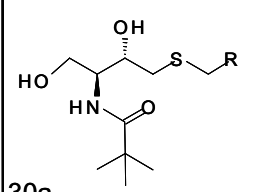
	Concentració (µM)	% Activitat
 30a	0	100
	20	59,6
	35	42,6
	70	28,7
	100	21,0
	140	9,3

Figura 92. Inhibició de DHCD mitjançant el compost 30a.

Després d'aquests resultats s'estan preparant i estudiant altres molècules de la sèrie per estudiar la seva interacció amb la DHCD.

4.2.3. Mort Cel·lular

Considerant que la ceramida i alguns anàlegs sintetitzats a la literatura provoquen apoptosi i mort cel·lular en diferents tipus cel·lulars,^{101,103} es van estudiar els anàlegs de ceramida obtinguts (famílies **20** i **30**) per tal d'avaluar el seu poder apoptòtic sobre diferents línies cel·lulars.

Es va calcular el percentatge de cèl·lules vives després de 4 hores i la LD₅₀ després de 22 hores dels compostos que presenten activitat ceramidasa en les cèl·lules Mohsen AcCer 10X, per tal de comprovar que l'activitat inhibidora de ceramidasa no era deguda a la mortalitat cel·lular. Es mostren els resultats a la figura 93. Aquest assaig va ser realitzat en els nostres laboratoris per Carme Bedia sota la supervisió de la Dra. Gemma Fabriàs.

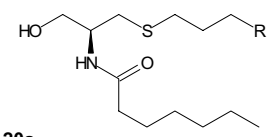
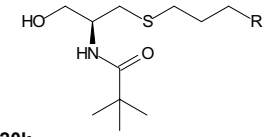
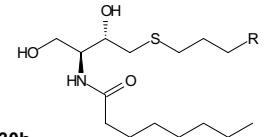
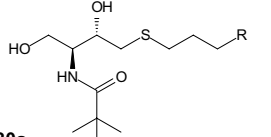
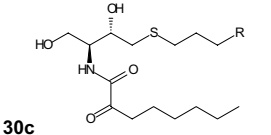
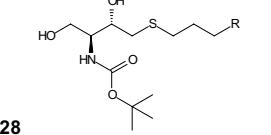
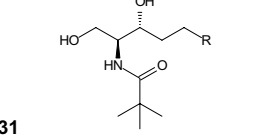
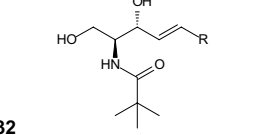
 20a	 20k	 30b	 30a
-	-	85±3	73±6 (27.5µM)
 30c	 28	 31	 32
86±2	74±3 (26.5µM)	-	-

Figura 93. Percentatge de cèl·lules vives després de 4 hores de l'addició de diferents anàlegs de ceramida (condicions de l'assaig d'activitat ceramidasa), i entre parèntesi LD₅₀ després de 22 hores. Els compostos que no presenten cap valor no van provocar diferències significatives en el nombre de cèl·lules vives. R: (CH₂)₁₂CH₃.

La majoria d'aquestes molècules no afecten (**20a**, **20k**, **31** i **32**) o afecten molt poc (**30b** i **30c**) al creixement cel·lular en les condicions de l'assaig de ceramidasa àcida, per tant, es pot concloure que l'activitat que es va observar en l'assaig ceramidasa era provocada només per la inhibició de l'enzim i no per un efecte tòxic sobre les cèl·lules. En canvi els compostos **30a** i **28** provoquen en aquestes condicions la mort d'un 25% de les cèl·lules. En aquest cas la inhibició de la ceramidasa observada era una combinació de dos factors, la mort de les cèl·lules que expressen ceramidasa àcida i la inhibició de la mateixa pels dos compostos. No obstant es pot observar que **30a** i **28** provoquen la mateixa mort cel·lular, però en canvi presenten diferents valors en la inhibició de ceramidasa, per tant sembla que **30a** inhibeix efectivament aquest enzim (veure figura 89).

Valorant el poder apoptòtic d'aquests compostos en aquestes condicions es pot observar que només provoquen mort cel·lular les molècules que presenten l'alcohol en posició C3 i un tioèter a la posició C5 de la cadena (**28**, **30a**, **30b** i **30c**). També s'observa que els compostos que provoquen més mort cel·lular contenen un grup voluminós en la cadena lateral del grup acil, això està d'acord amb diferents estudis amb altres anàlegs de ceramida, en que també s'observa aquest fet.^{103,104}

Al observar que diferents compostos provocaven mort cel·lular es van provar diferents molècules en les cèl·lules A549, perquè en aquestes cèl·lules està descrit que la ceramida promou l'apoptosi per mecanismes que impliquen la proteïna c-Jun quinasa terminal i l'activació de caspases,^{105,106} i, per tant, els anàlegs de ceramida es podrien, en principi, utilitzar en teràpies anticanceroses.

També es van provar dos anàlegs de esfingosina (**18** i **29**), perquè en altres series de compostos del nostre grup de recerca o de la literatura s'havia observat que compostos amb aquest esquelet havien presentat certa toxicitat.¹⁰³

Es van fer créixer cèl·lules A549 24h a 37°C, i llavors es van aplicar els potencials inhibidors en EtOH o DMSO a diferents concentracions, i es van deixar durant 3 dies a 37°C. Llavors es va addicionar el reactiu de MTT i s'incubà a 37°C durant 3 hores. Durant aquest temps el MTT es va reduir per les mitocòndries formant un cristall insoluble violeta. Passades les 3 hores es retirà el medi amb MTT i es solubilitzaren els cristalls violetes amb DMSO i es va llegir l'absorbància a 570 nm. Llavors amb les

dades obtingudes es calculà LD₅₀. Aquest assaig va ser realitzat en els nostres laboratoris pel Dr. Dani Canals sota la supervisió de la Dra. Josefina Casas.

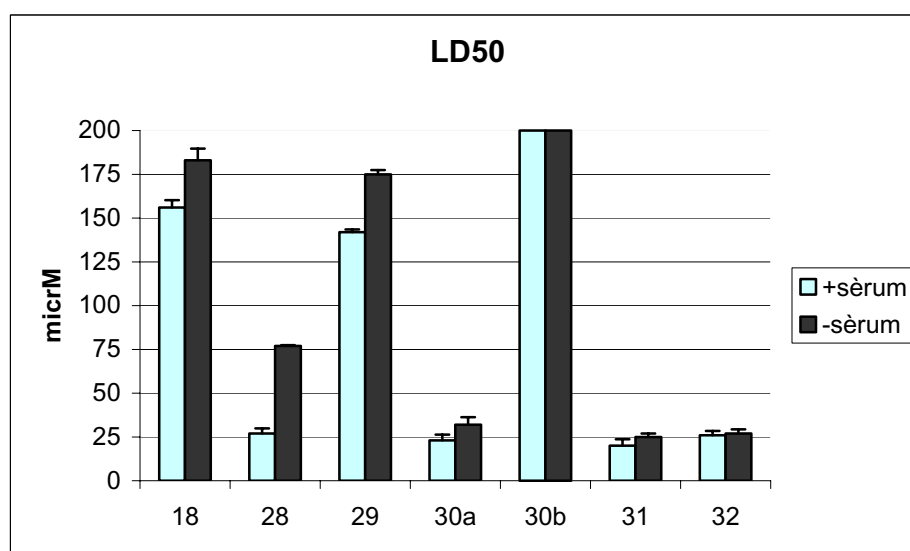
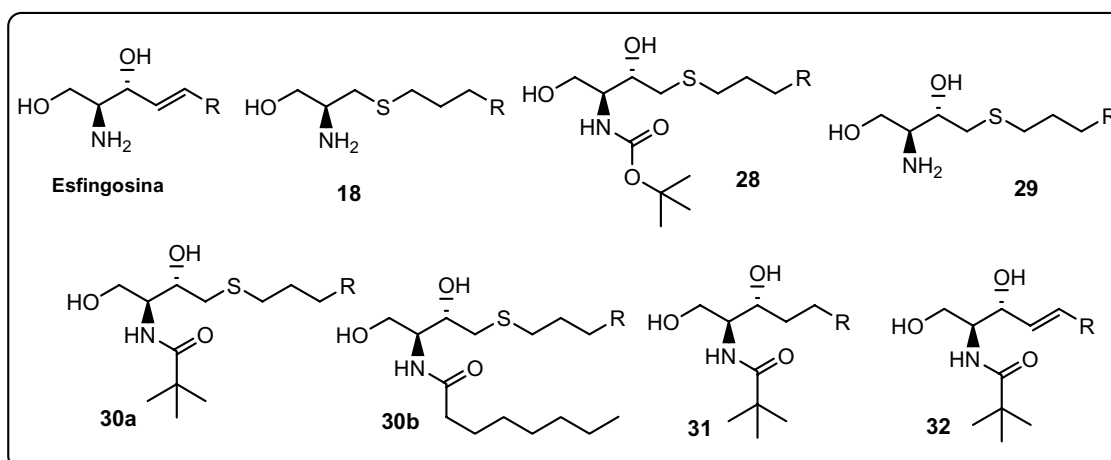


Figura 94. LD₅₀ de diferents anàlegs de ceràmida després de 3 dies sobre cèl·lules A549.

A la figura 94 es pot veure la LD₅₀ de diferents anàlegs de ceràmida sobre les cèl·lules A549 en dos assaigs diferents, amb o sense l'addició de sèrum. Es realitza un assaig amb sèrum i un altre sense sèrum, perquè en molts casos el sèrum modifica l'entrada dels compostos a dins la cèl·lula, a vegades afavorint i a vegades impeding l'entrada, tot i que en general hi ha molt poca diferència entre els dos casos, sembla ser que el sèrum afavoreix l'entrada d'aquests compostos a la cèl·lula.

Es pot observar que tots els compostos que presenten un alcohol en la posició C3 de la ceràmida i que la cadena lateral contenen el grup pivaloïl, presenten mortalitat cel·lular a concentracions molt baixes. En aquest cas no sembla important si la cadena principal conté un tioèter (**30a**), una cadena saturada (**31**) o un doble enllaç (**32**) ja que tots ells

presenten una mortalitat molt similar a diferència del que tenia lloc en les cèl·lules Mohnsen, en les quals els compostos **31** i **32** no provocaven mort cel·lular.

El grup *tert*butoxicarbonil, també presenta mort cel·lular, en canvi el compost que presenta una cadena lineal de 7 àtoms de carboni (**30b**) no presenta gens de toxicitat a aquestes concentracions, això també està d'acord amb una hipòtesi de treball que estableix que a major volum en el grup *N*-acil, major mortalitat cel·lular.¹⁰³

En el nostre cas els compostos que presenten l'amina lliure no presenten toxicitat, posseeixin o no un alcohol en posició C3 (**18** i **29**).

4.2.4. Esfingomielina Sintasa

L'esfingomielina és l'esfingofosfolípid més abundant en les cèl·lules dels mamífers. Es localitza principalment a la membrana plasmàtica, on juga un paper estructural i funcional molt important. Es sintetitza a través de l'esfingomielina sintasa (SMS), la qual transfereix el grup fosfocolina de la fosfatidilcolina a la ceramida, formant l'esfingomielina i diacilglicerol. Aquest enzim és important degut a la seva capacitat per regular els nivells de ceramida i diacilglicerol, els quals modulen la proliferació cel·lular i l'apoptosi. Actualment, a la bibliografia, només es troben dos inhibidors d'aquest enzim, MS-209 i D609, no obstant aquesta inhibició no és selectiva, ja que aquests compostos estan descrits com a inhibidors de P-glicoproteïna¹⁰⁷ i de la fosfolipasa C de *Bacillus cereus*,^{108,109} respectivament.

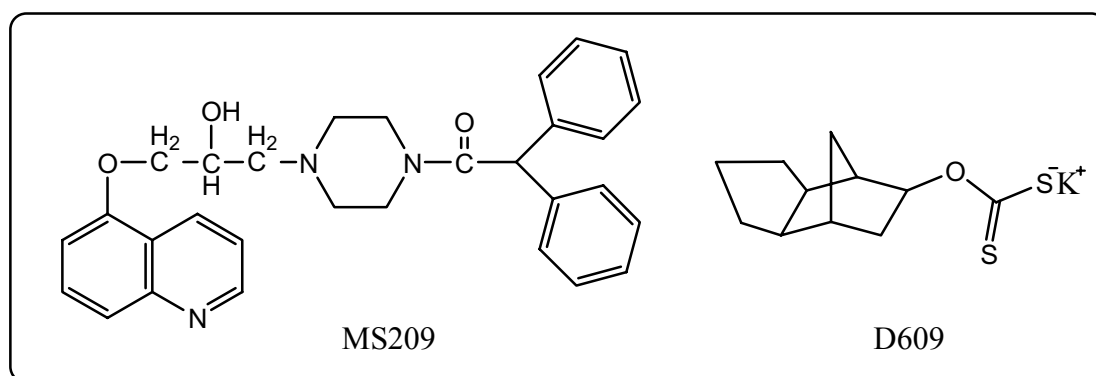


Figura 95. Inhibidors d'esfingomielina sintasa.

Es va mesurar l'activitat enzimàtica en microsomes utilitzant HPLC i un substrat fluorescent (ceramida-C6-NBD).

Cal mencionar que en aquestes condicions el compost D609 presenta una inhibició del 20%. Aquest assaig va ser realitzat en els nostres laboratoris per la Dra. Meritxell Egido sota la supervisió de la Dra. Josefina Casas.

A les taules de la figura 96 i de la figura 97 es pot observar que entre tots els compostos preparats, el compost que inhibeix millor la formació d'esfingomielina és l'anàleg de fosfolípid **24e**. Entre els anàlegs de fosfolípid, també cal observar la inhibició mostrada per els compostos **24a** i **24m**.

L'anàleg de ceramida **31** també presenta una alta capacitat per inhibir la síntesi d'esfingomielina; es pot observar amb comparació amb els productes **30a** i **32**, que petites modificacions en la cadena principal provoquen grans canvis en l'activitat dels compostos.

A la figura 96 es pot observar que no hi ha una relació directa entre les inhibicions dels anàlegs de ceramida tipus **20** i els anàlegs de fosfolípid **24**, això podria ser degut a que aquests compostos actuessin en diferents punts unió; així els anàlegs de fosfolípid s'unirien amb el punt d'unió a fosfatidilcolina, mentre els anàlegs de ceramida s'unirien al punt unió a ceramida, això també estaria d'acord amb que en els anàlegs de ceramida és important l'estructura de la base esfingoide.

Cal remarcar que a falta de un estudi més en profunditat, que inclouria la selectivitat sobre altres enzims, els compostos descrits són prometedors per a obtenir els primers inhibidors potents i selectius de la SMS.

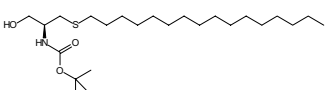
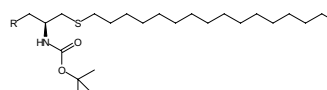
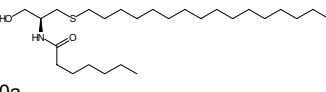
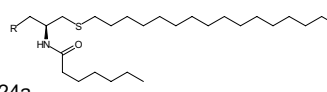
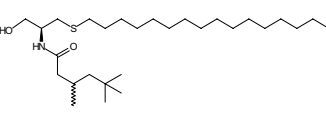
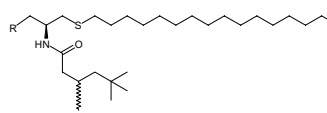
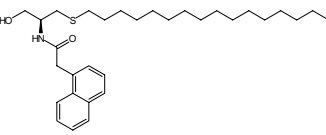
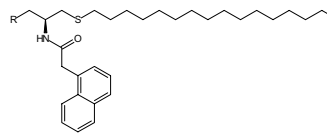
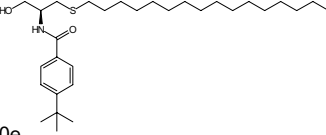
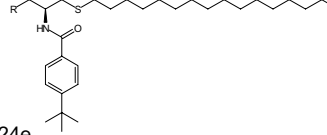
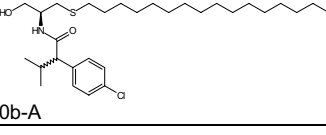
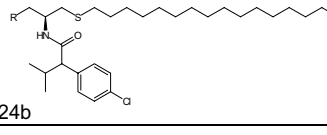
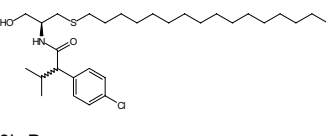
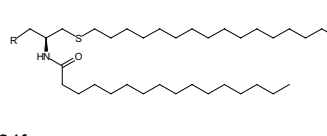
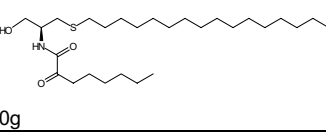
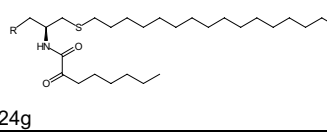
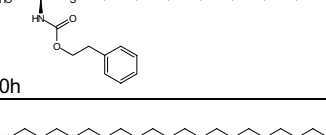
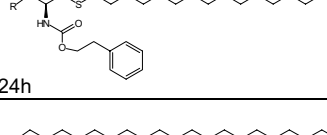
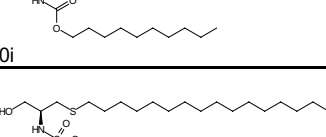
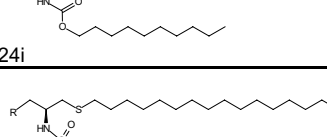
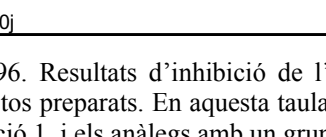
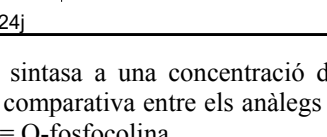
Analog tipus Ceramida	%Inh(15µM)	Analog fosfolípid (esfingomielina)	%Inh(15µM)
 19	5,17%	 23	2,68%
 20a	4,50%	 24a	45,45%
 20c (mescla diastereomers)	13,20%	 24c	1,38%
 20d	4,53%	 24d	9,78%
 20e	6,79%	 24e	84,46%
 20b-A	7,67%	 24b	12,16%
 20b-B	8,93%	 24f	3,04%
 20g	11,28%	 24g	0,84%
 20h	6,44%	 24h	5,46%
 20i	5,30%	 24i	11,20%
 20j	6,28%	 24j	7,30%

Figura 96. Resultats d'inhibició de l'esfingomielina sintasa a una concentració de 15µM de diferents compostos preparats. En aquesta taula es mostra una comparativa entre els anàlegs amb un alcohol lliure en posició 1, i els anàlegs amb un grup fosfocolina. R= O-fosfocolina

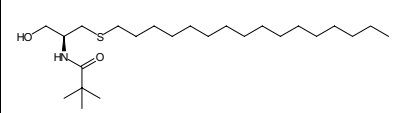
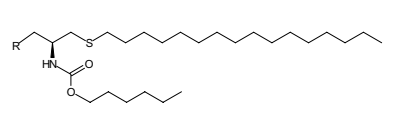
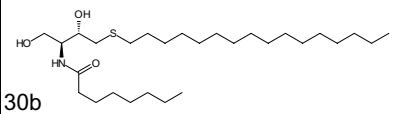
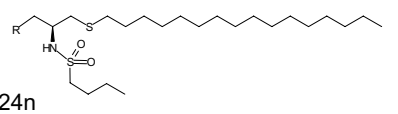
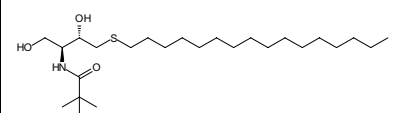
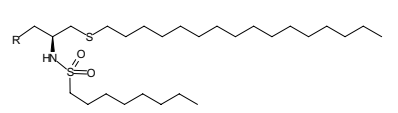
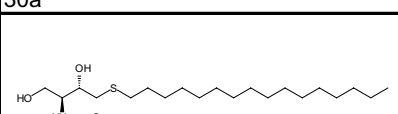
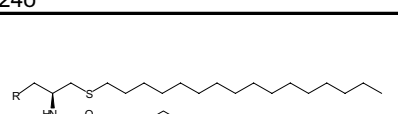
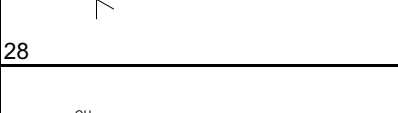
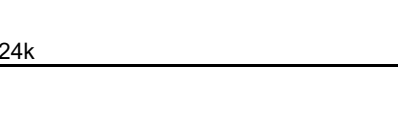
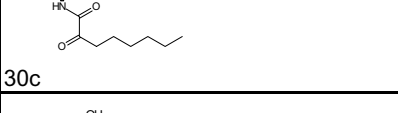
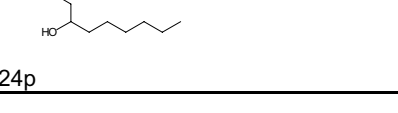
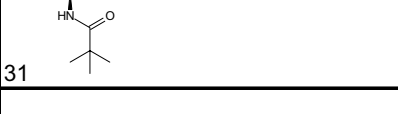
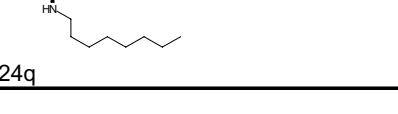
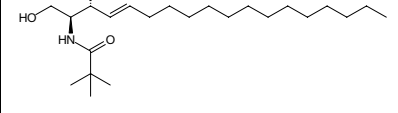
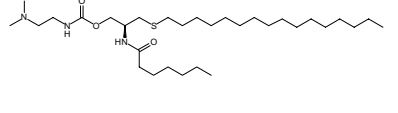
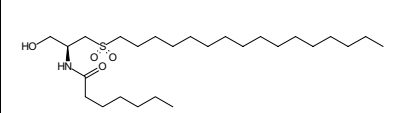
Analog tipus Ceramida	%Inh(15µM)	Analog fosfolípid (esfingomielina)	%Inh(15µM)
 20k	20,25%	 24m	46,67%
 30b	13,17%	 24n	7,77%
 30a	28,87%	 24o	15,66%
 28	17,80%	 24k	15,79%
 30c	20,72%	 24p	17,48%
 31	45,76%	 24q	21,05%
 32	69,60%	 26	18,38%
 35	8,57%	 24l	20,15%
 34 (mescla diastereomers)	7,10%		

Figura 97. Resultats d'inhibició de l'esfingomielina sintasa a una concentració de 15µM de diferents compostos preparats. En aquesta taula es mostren altres anàlegs de ceramida i fosfocolina amb diferents substituents a la posició 2. R= O-fosfocolina

5. Conclusions

- S'ha posat a punt la introducció selectiva i gradual d'àtoms de fluor sobre un anell de 2-naftilciclohexanona mitjançant l'agent fluorant Selectfluor™. Això ens permet la síntesi de mono-, di- i trifluorocetones per fer un estudi de com els diferents àtoms de fluor influeixen en l'activitat d'aquests compostos.
- S'han sintetitzat uns nous potencials inhibidors de iPLA₂ amb l'estructura general de α,α' -diariloxiciclohexanona seguint un esquema de síntesi de 1,3-diariloxi-2-propanones,³³ les quals són inhibidores de cPLA₂.
- Modificant lleugerament diferents síntesis d'anàlegs de fosfolípids s'han preparat diferents compostos (**23**, **24a-24q**) amb funcionalitats diverses (amida, cetoamida, carbamat, sulfonamida, amina i α -hidroxiamina) i diferents cadenes laterals per fer estudis de selectivitat entre iPLA₂ i cPLA₂.
- Entre els diferents anàlegs fluorats (**5**, **7**, **9** i **10**) i les α,α' -diariloxiciclohexanones no s'ha observat cap producte que presenti una inhibició sobre iPLA₂ comparable amb l'inhibidor comercial BEL.
- Les α -ariloxiciclohexanones tampoc presenten resultats d'inhibició significatius sobre iPLA₂ en les condicions estudiades; no obstant els millors resultats es van obtenir quan el grup aromàtic era un anell de naftalè ja sigui unit a la posició 1 o 2 (compostos **16a** i **16g**).
- Els compostos (**15e** i **16c**) provoquen un augment notable en l'activitat de iPLA₂. Aquest efecte és selectiu respecte a la cPLA₂, ja que **15e** provoca una disminució en l'activitat de l'enzim i **16c** provoca un augment molt lleuger de l'activitat de cPLA₂.
- Els anàlegs de fosfolípids (**24a**, **24c**, **24i**, **24j** i **24p**) presenten un elevat nivell d'inhibició sobre iPLA₂ (50-70% inhibició) que és similar a la inhibició del patró comercial BEL (60-80%). Malauradament aquesta inhibició no és selectiva respecte cPLA₂.

- En general els àcids borònics estudiats no presenten resultats d'inhibició remarcables, exceptuant els compostos **XMB06** i **XMB07** que presenten una inhibició moderada (40-50%) i el compost **XMB24** que inhibeix potentment (70%) en les condicions estudiades d'assaig de iPLA₂.
- S'ha preparat una nova sèrie d'anàlegs de ceramida amb un grup tioèter en posició C5 substituint el doble enllaç, a partir de l'aldehid de Garner.
- Els nous anàlegs de ceramida sintetitzats provoquen diferents alteracions en el metabolisme d'esfingolípids, principalment el compost **30a** que inhibeix fortament la ceramidasa àcida, així com la ceramida dessaturasa. A més a més aquests compostos també provoquen mort cel·lular en diferents línies cel·lulars.
- S'han sintetitzat nous inhibidors de l'esfingomieline sintasa, entre ells és remarcable el compost **24e**, que en les condicions estudiades inhibeix un 84% de l'activitat d'aquest enzim.
- S'han clonat els cDNA de dos fragments del domini catalític de la fosfolipasa A₂ independent de calci (grup VIA) en el vector d'expressió en bacteri (pRSET-B); i s'han expressat en bacteri, en aquest sistema presenten baixos nivells d'expressió i es localitzen en cossos d'inclusió, fet que no permet la seva purificació.
- La baixa expressió dels dominis de iPLA₂ no es pot atribuir a la diferència en els codons ja que en els experiments amb les cèl·lules BL21(DE3) RosettaTM 2 no augmenta l'expressió, ni tampoc es deguda a l'activitat fosfolipasa de la proteïna ja que amb un inhibidor de la mateixa tampoc s'observa un augment de l'expressió.

6. Materials i Mètodes:

Els dissolvents anhidres es van preparar de la següent manera: THF i Et₂O per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre sodi i benzofenona; MeOH, CH₂Cl₂, CH₃CN i trietilamina per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre CaH₂; DMF i piridina per destil·lació a pressió reduïda sobre CaH₂ i es van guardar sobre tamisos moleculars de 4Å.

Les reaccions es van seguir per cromatografia en capa fina, i els productes es van detectar amb llum UV de 254 nm i/o revelat amb àcid fosfomolibdic (5,7% en EtOH).

Els espectres d'infraroig es van enregistrar en un espectròmetre BOMEM MB-120 amb transformada de Fourier en una pel·lícula (film) de cloroform sobre una pastilla de NaCl o en una pastilla de KBr.

Els espectres de RMN es van enregistrar en dissolució de CDCl₃ o CD₃OD. S'han utilitzat els desplaçaments químics de ¹H i ¹³C del dissolvent com a referència interna. En els espectres de ¹⁹F s'ha afegit com a referència CFC₃, i en els de ³¹P s'ha utilitzat com a referència un capil·lar d'àcid fosfòric.

Els espectres s'han enregistrat en els següents parells:

Varian Unity 300 (¹H-RMN a 299.94 MHz, ¹³C-RMN a 75.42 MHz, ¹⁹F a 282.23 MHz i ³¹P-RMN a 121.42 MHz)

Mercury 400 (¹³C-RMN a 100.62 MHz)

Inova 500 (¹H-RMN a 499.80 MHz)

Els desplaçaments químics s'expressen en parts per milió i les multiplicitats observades en l'assignació de senyals apareixen al text com: s (singlet), sa (singlet ample), d (doblet), t (triplet), q (quadruplet), quin (quintuplet), sext (sextuplet), m (multiplet), t_{ap} (triplet aparent) a més diferents combinacions entre ells com dt (doble triplet). Les constants d'acoblament (*J*) s'expressen en Hertz (Hz).

Per tal de purificar els productes s'han utilitzat columna de vidre i s'ha seguit la metodologia *flash*. La fase estacionària consistia en sílice 60Å (35-70 μm) Chromagel.

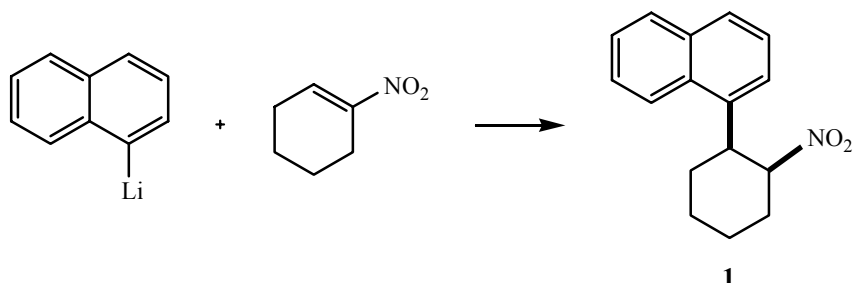
La rotació òptica dels productes s'ha mesurat amb un polarímetre digital Perkin-Elmer 34, utilitzant una cel·la de 10 cm de longitud i 1 mL de capacitat, emprant en totes les mesures una làmpada de sodi de 589 nm. El poder rotatori s'expressa en forma de [α]_D (concentració [g/100 mL], dissolent) i totes les mesures s'han realitzat a 20°C.

Les representacions tridimensionals mostrades a la tesi s'han realitzat amb el programa *Chem3D Ultra 8.0* minimitzant l'energia mitjançant MM2.

6.1. Descripció dels productes sintetitzats:

6.1.1. Síntesi d'anàlegs de BEL

6.1.1.1. 1-(2-nitrociclohexil)naftalè (1)



En un baló net i séc, i sota atmosfera d'argó s'addiciona 1 mL de bromur de naftil, i s'asseca amb diferents etapes de congelació al buit i descongelació.

Es dissolt en 3 mL de hexà anhidre i es refreda a 0°C; s'addicionen gota a gota 5 mL *n*Buli 5 N (0.95 eq).

Després d'una hora s'asseca a la bomba, obtenint el litiat en forma sòlida.

En un altre baló net i séc s'addiciona 1 equivalent de 1-nitro-1-ciclohexè i es dissolt en 4 mL de THF anhidre; es refreden els dos balons a -78°C i s'addiciona el naftil liti dissolt en THF sobre el nitroalquè.

Es deixa reaccionar tota la nit. Llavors s'addicionen 0.1 mL d'àcid acètic glacial, s'agita 10 minuts. Seguidament s'addiciona 20 mL aigua/HCl 1N (3/1) i s'extreu amb 3×20 mL de DCM. S'asseca amb MgSO₄ i es filtra, i es purifica per cromatografia flash, utilitzant hexà-AcOEt 20:1 com a eluent. S'obtenen 1.2 grams (70%) del producte desitjat.

¹H-RMN

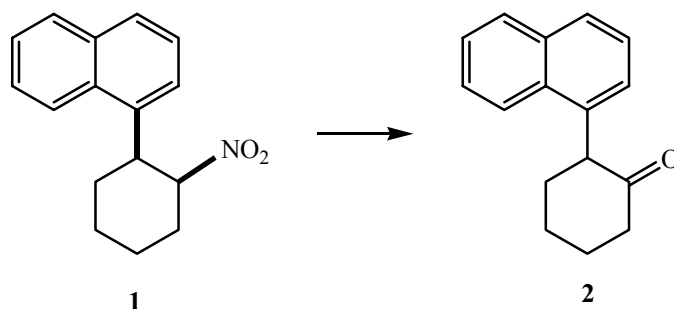
δ(ppm) = 1.55-1.65 (m, 1H), 1.72-1.78 (m, 1H), 1.82-1.88 (m, 1H), 2-2.09 (m, 2H), 2.1-2.18 (m, 1H), 2.38-2.44 (m, 1H), 2.72 (qd_{ap}, 1H, *J*¹= 13.0Hz, *J*²=3.5Hz), 3.85 (dt_{ap}, 1H, *J*¹= 12.5Hz, *J*²=3.5Hz), 5.15 (sa, 1H), 7.35-7.45 (m, 2H), 7.47-7.51 (m, 1H), 7.52-7.56 (m, 1H), 7.75 (d, 1H, *J*=8.0Hz), 7.88(d, 1H, *J*=8.5Hz), 7.91 (d, 1H, *J*=8.5Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm)= 20.1, 25.2, 25.8, 30.3, 40.5, 86.1, 121.6, 124.7, 125.5, 125.6, 126.4, 128.0, 129.6, 130.8, 133.9, 135.9.

IR (cm⁻¹) : 2936, 2858, 1546, 1513, 1225, 1203, 909, 782, 734.

Punt de fusió: 99-103°C.

6.1.1.2. 2-naftalen-1-ilciclohexanona (2)

Es pesen 2.7 grams de **1** i s'addicionen 25 mL de MeOH anhidre (no es dissol completament), es refreda a 0°C i s'addicionen 2.2 mL de MeONa/MeOH al 30% i s'agita durant 2 hores (es va dissolent el cru de reacció). Es refreda a -40°C i s'addicionen 1.9 mL H₂SO₄ diluïts en 8 mL de MeOH anhidre, es deixa arribar a -20°C. Després d'una hora s'addiciona 100 mL de CH₂Cl₂ i 100 mL d'aigua; es separa la fase orgànica, es renta la fase aquosa amb 2×80 mL CH₂Cl₂, s'assequen les fases orgàniques amb MgSO₄ es filtren i s'elimina el dissolvent al buit.

El producte obtingut es dissol en 300 mL de CH₂Cl₂ i 300 mL HCl 2N i es deixa agitant 8 hores, a continuació es separen les dues fases, i es renta la fase aquosa 3×100 mL CH₂Cl₂. Es renten les fases orgàniques amb NaCl saturat, s'assequen, es filtren i es purifiquen per columna de SiO₂ amb hexà-AcOEt 20:1 conduint a 1,4 grams (60%) de **2**.

¹H-RMN

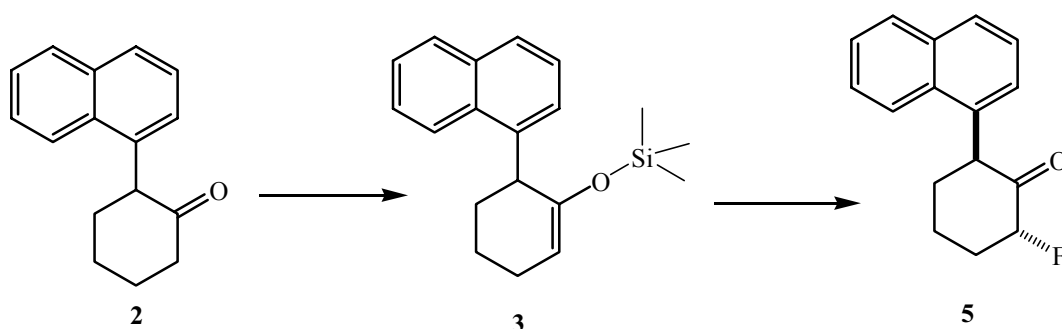
δ(ppm) = 1.86-2.0 (m, 2H), 2.06-2.16 (m, 1H), 2.2-2.32 (m, 2H), 2.38-2.44 (m, 1H), 2.6-2.68 (m, 2H), 4.37 (dd, 1H, $J^1=12.5\text{Hz}$, $J^2=5.0\text{Hz}$), 7.38 (d, 1H, $J=7\text{Hz}$), 7.45-7.52 (m, 3H), 7.72-7.76 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.86-7.92(m, 1H).

¹³C-RMN

δ (ppm)= 25.9, 27.9, 34.2, 42.6, 53.3, 123.2, 125.2, 125.3, 125.3, 125.8, 127.6, 129.0, 131.7, 133.8, 135.2, 210.0.

IR (cm⁻¹): 3046, 2935, 2859, 1712, 1598, 1511, 1448, 1398, 1125, 795, 777.

Punt de fusió: 72-75°C.

6.1.1.3. 2-fluoro-6-naftalen-1-ilciclohexanona (5)

En un baló en condicions anhidres s'addiciona 1.1 mL de DIPA (1.6 eq) i es dissolt en 20 mL de THF anhidre, es refreda a -20°C i s'addicionen gota a gota 5 mL de *n*BuLi 1.45 M (1.5eq). Després d'una hora es refreda a -78°C i s'addiciona 1,1 grams de **2** dissolts en 20 mL de THF anhidre.

Després de 2 hores s'addiciona 1 mL Me_3SiCl (1.6 eq). 5 hores més tard s'elimina el dissolvent al buit, s'addiciona 30 mL de Et_2O , es filtra, s'elimina el dissolvent i el producte obtingut (**3**) es dissolt en 20 mL de DMF anhidre, es refreda a 0°C , i s'addiciona una suspensió de 1.74 grams de SelectfluorTM en 10 mL de DMF.

Es deixa reaccionar durant 8 hores, s'addiciona aigua 30 mL i s'extreu en Et_2O (3×25 mL), es renta la fase orgànica amb 20 mL d'una solució saturada de NaCl, es filtra, s'elimina el dissolvent. El producte obtingut es purifica mitjançant columna cromatogràfica eluint amb hexà-AcOEt 60:1, i s'obtenen 0.8 grams del producte desitjat (70%).

¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.9\text{-}2.1$ (m, 2H), $2.2\text{-}2.35$ (m, 2H), $2.4\text{-}2.6$ (m, 2H), 4.99 (ddd, 1H, $J^1 = 51.5\text{Hz}$, $J^2 = 5.0\text{Hz}$, $J^3 = 2.0\text{Hz}$), 5.0 (dd, 1H, $J^1 = 11.0\text{Hz}$, $J^2 = 5.3\text{Hz}$), 7.42 (d, 1H, $J = 7.0\text{Hz}$), 7.5-7.57 (m, 3H), 7.85 (d, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$), 7.9-7.94 (m, 1H).

¹³C-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 20.0$ (d, $J = 2.5\text{Hz}$), 33.6, 34.2 (d, $J = 22.0\text{Hz}$), 48.8 (d, $J = 2.0\text{Hz}$), 93.9 (d, $J = 107.9\text{Hz}$), 122.8, 124.7, 125.2, 125.5, 126.2, 127.8, 128.8, 131.6, 133.2, 133.6, 206.6 (d, $J = 21.0\text{Hz}$)

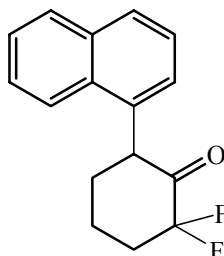
¹⁹F-RMN

$\delta(\text{ppm}) = -187.5$ (td, $J^1 = 47.7\text{Hz}$, $J^2 = 11.8\text{Hz}$, $J^3 = 5.9\text{Hz}$).

IR (cm⁻¹) : 3061, 2949, 1724, 1599, 1510, 1449, 1403, 1296, 1106, 1069, 980, 963, 929, 803, 788, 768, 739, 667.

Punt de fusió: 131-132°C.

6.1.1.4. 2,2-difluoro-6-naftalen-1-ilciclohexanona (7)



0.28 mL de DIPA (1.2 eq) es dissolen amb 10 mL de THF anhidre i es refreda a -40°C, s'addicionen 1.3 mL de *n*-BuLi 1.4 M (1.1 eq). Després d'una hora es refreda a -78°C i s'addicionen lentament 0.25 mL de Me₃SiCl (1.2 eq). Després de 10 minuts s'addicionen 0,4 grams de **5** dissolts en 10 mL de THF. Després de dues hores s'evapora el dissolvent, s'afegeixen 30 mL d' Et₂O i es filtra; s'asseca al buit i es dissol el cru en 5 mL de DMF anhidra, es refreda a 0°C i s'addicionen 0.63 grams de Selectfluor (1.1 eq) en 10 mL de DMF. Després de 8 hores s'addicionen 50 mL d'aigua i s'extreu 3×45 mL d'Et₂O, es renta la fase orgànica amb 30 mL de NaCl solució saturada. Es purifica per columna cromatogràfica (Hexà-AcOEt 60:1) i s'obtenen 0.32 grams del producte desitjat (75%).

¹H-RMN

δ(ppm) = 1.9-2.3 (m, 4H), 2.35-2.65 (m, 2H), 2.7-3 (m, 2H), 7.45-7.55 (m, 3H), 7.66 (ddd, 1H, *J*¹ = 7.4Hz, *J*² = 1.9Hz, *J*³ = 1.1Hz), 7.85-7.92 (m, 2H), 8-8.05 (m, 1H).

¹³C-RMN

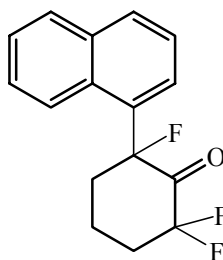
δ(ppm) = 22.3 (d, *J* = 6.6Hz), 28.5, 38.9 (d, *J* = 23.1Hz), 39,7, 99.3 (d, *J* = 109.8Hz), 124.5, 124.9 (d, *J* = 4.7Hz), 125.6, 126.0 (d, *J* = 3.2Hz), 126.2, 128.7, 130.3, 131.2, 132.4 (d, *J* = 12.2Hz), 134.2, 207.9 (d, *J* = 22.5Hz)

¹⁹F-RMN

δ(ppm) = -105.6 (dd, *J*¹ = 249.3Hz, *J*² = 29.5Hz), -113.1 (d, *J* = 249.3Hz).

IR (cm⁻¹) : 2946, 2867, 1729, 1511, 1450, 1251, 1070, 1053, 978, 899, 802, 792, 782, 757, 668.

Punt de fusió: 70-72°C.

6.1.1.5. 2,2,6-trifluoro-6-naftalen-1-ilciclohexanona (9)

Es barregen 0.21 mL de DIPA (1.2 eq) amb 10 mL de THF anhidre i es refreda la mescla a -40°C , s'addicionen 0.97 mL de *n*BuLi 1.4 M (1.1 eq). Després d'una hora es refreda la reacció a -78°C i s'addicionen lentament 0.19 mL de Me_3SiCl (1.2 eq). Després de 10 minuts s'addicionen 0.32 grams de **7** dissolts en 10 mL de THF. Es deixa reaccionar dues hores i es deixa assolir la temperatura ambient. S'evapora el dissolvent, s'afegeixen 30 mL d' Et_2O i es filtra; s'asseca el cru al buit i es redissolt en 5 mL de DMF anhidre, es refreda a 0°C i s'addicionen 0.46 grams de SelectfluorTM (1.1 eq) en 10 mL de DMF. Després de 8 hores s'addicionen 50 mL d'aigua i s'extreu (3×45 mL d' Et_2O), es renta la fase orgànica amb 30 mL d'una solució saturada de NaCl. Es purifica per columna cromatogràfica (hexà-AcOEt 60:1), l'oli obtingut s'escalfa a 80°C al buit durant 2 hores i s'obtenen 0.1 grams del producte desitjat (35%)

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 2.0\text{-}2.15$ (m, 1H), $2.2\text{-}2.42$ (m, 3H), $2.48\text{-}2.6$ (m, 1H), $2.88\text{-}3.0$ (m, 1H), 4.8 (dt, 1H, $J^1 = 12.5\text{Hz}$, $J^2 = 5.5\text{Hz}$), $7.4\text{-}7.55$ (m, 3H, $J = 7.0\text{Hz}$), 7.64 (ddd, 1H, $J^1 = 7.5\text{Hz}$, $J^2 = 2.5\text{Hz}$, $J^3 = 1.0\text{Hz}$), $7.72\text{-}7.76$ (m, 1H), 7.78 (d, 1H, $J = 8.0\text{Hz}$), $7.86\text{-}7.92$ (m, 1H).

^{13}C -RMN

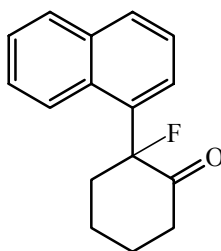
$\delta(\text{ppm}) = 17.2$ (dt, $J^1 = 7.5\text{Hz}$, $J^2 = 5.0\text{Hz}$), 36.1 (t, $J = 22.5\text{Hz}$), 37.4 (d, $J = 23.5\text{Hz}$), 99.7 (d, $J = 189.0\text{Hz}$), 117.2 (t, $J = 254.5\text{Hz}$), 124.4, 124.5 (d, $J = 7.5\text{Hz}$) 125.4 (d, $J = 5.5\text{Hz}$), 126.0, 126.8 (d, $J = 1.5\text{Hz}$), 128.9, 130.1 (d, $J = 20.5\text{Hz}$), 131.1 (d, $J = 2.0\text{Hz}$), 134.2, 134.3, 194.0-194.5 (m).

^{19}F -RMN

$\delta(\text{ppm}) = -106.0$ (ddd, $J^1 = 253.1\text{Hz}$, $J^2 = 17.5\text{Hz}$, $J^3 = 11.6\text{Hz}$), -107.3 (ddd, $J^1 = 253.1\text{Hz}$, $J^2 = 29.4\text{Hz}$, $J^3 = 17.5\text{Hz}$), -141.7 (sa).

IR (cm^{-1}): 3051, 2930, 2854, 1760, 1511, 1457, 1351, 1184, 1146, 1098, 978, 909, 803, 779, 760.

Punt de fusió: $102\text{-}103^{\circ}\text{C}$.

6.1.1.6. 2-fluoro-2-naftalen-1-ilciclohexanona (10)

Es dissolen 0.3 grams de **2** en 2 mL de DMF anhidre, s'addiciona 0.9 mL de Et₃N (5 eq.) i 0.4 mL de Me₃SiCl (2.4 eq) i s'escalfa durant 8 hores a 90°C.

S'addiciona aigua 10mL i s'extreu amb 3×15 mL d'Et₂O, es renta la fase orgànica amb 20 mL de NaCl solució saturada, s'asseca amb MgSO₄, i es filtra.

El silil enol èter obtingut es dissolt en 10 mL de DMF anhidre, es refreda a 0°C i s'addiciona 0.48 grams de Selectfluor en 7 mL de DMF. Es deixa reaccionar tota la nit i s'addicionen 50 mL d'aigua i s'extreu en 3×45 mL d'Et₂O, es renta la fase orgànica amb 30 mL de NaCl solució saturada, i s'asseca amb MgSO₄, i es filtra. El cru obtingut es purifica amb columna cromatogràfica (hexà-AcOEt 60:1) i s'obtenen 0.21 grams del producte desitjat (65%).

¹H-RMN

δ(ppm) = 1.9-2.1 (m, 2H), 2.2-2.35 (m, 2H), 2.4-2.6 (m, 2H), 4.99 (ddd, 1H, $J^1 = 51.5\text{Hz}$, $J^2 = 5.0\text{Hz}$, $J^3 = 2.0\text{Hz}$), 5-5.1 (m, 1H), 7.42 (d, 1H, $J = 7.0\text{Hz}$), 7.5-7.57 (m, 3H), 7.85 (d, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$), 7.9-7.94 (m, 1H).

¹³C-RMN

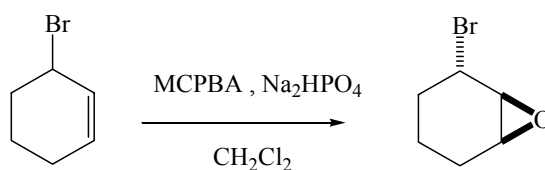
δ(ppm) = 20.0 (d, $J = 2.5\text{Hz}$), 33.6, 34.2 (d, $J = 22.0\text{Hz}$), 48.8 (d, $J = 2.0\text{Hz}$), 93.9 (d, $J = 107.9\text{Hz}$), 122.8, 124.7, 125.2, 125.5, 126.2, 127.8, 128.8, 131.6, 133.2, 133.6, 206.6 (d, $J = 21.0\text{Hz}$)

¹⁹F-RMN

δ(ppm) = -187.5 (tdd, $J^1 = 47.7\text{Hz}$, $J^2 = 11.8\text{Hz}$, $J^3 = 5.9\text{Hz}$).

IR (cm⁻¹): 3061, 2949, 1724, 1599, 1510, 1449, 1403, 1296, 1106, 1069, 980, 963, 929, 803, 788, 768, 739, 667.

Punt de fusió: 131-132°C.

6.1.1.7. 2-Bromo-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptà (11)

Sobre una mescla de 3-bromociclohexè (2 g, 12.4 mmol) i hidrogenfosfat de sodi (4.4 g, 31 mmol) en 25 mL de CH_2Cl_2 s'addiciona àcid *m*-cloroperbenzoic (5.4 g, 31 mmol) a 0°C . La reacció s'agita 10 hores a temperatura ambient, i el cru es renta amb una solució de sulfit sòdic al 10%. Les fases aquoses es reextreuen en CH_2Cl_2 , i les fases orgàniques es renten amb aigua i s'assequen en MgSO_4 . Els dissolvents s'eliminen al buit i el cru es purifica amb columna cromatogràfica (hexà-AcOEt, 200:1) proporcionat 2 grams (90%) del producte desitjat.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.2-1.4$ (m, 1H), $1.5-1.7$ (m, 2H), $1.9-2.1$ (m, 3H), 3.25 (dd, 1H, $J^1=6.0\text{Hz}$, $J^2=3.0\text{Hz}$), 3.4 (dd, 1H, $J^1=3.5\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 4.43 (t_{ap} , 1H, $J=5.5\text{Hz}$).

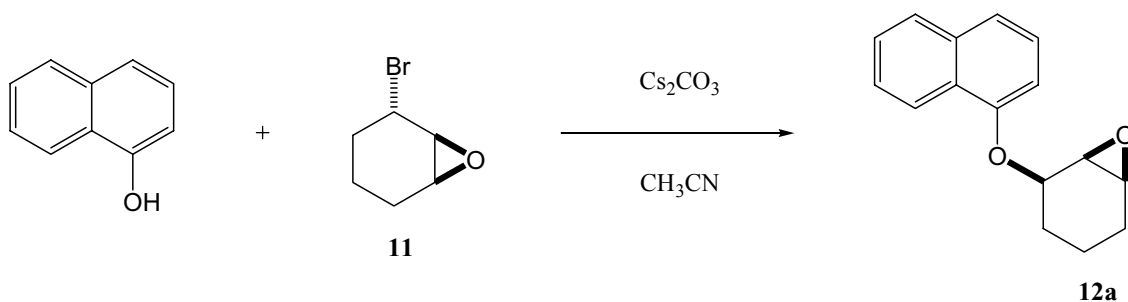
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 15.6, 22.7, 28.4, 47.5, 52.8, 55.2$.

$\text{IR}(\nu) = 2996, 2943, 1456, 1436, 1258, 1184, 1015, 960, 841, 786, 703, 612 \text{ cm}^{-1}$.

6.1.1.8. 2-(Naftalen-1-iloxi)-7-oxabiciclo[4.1.0]heptà (12a)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **12** a partir de **11** i diferents fenols.



Una suspensió de 1-Naftol (0.5 g, 3.5 mmol) i Cs_2CO_3 (1.1 g, 3.5 mmol) en 20 mL d'acetonitril s'agita 10 minuts i llavors s'addiciona una solució de **11** (0.9 g, 5.1 mmol) en acetonitril. La mescla s'agita a reflux durant 10 hores. El cru es refreda i s'addiciona aigua, s'extreu el producte amb AcOEt ($3 \times 30\text{mL}$), i les fases orgàniques es renten amb una solució de NaOH 3M ($4 \times 25\text{mL}$), per eliminar possibles restes de naftol de partida,

amb aigua i solució saturada de NaCl, i s'asseca sobre MgSO₄. El cru es purifica amb columna cromatogràfica (hexà-AcOEt, 80:1) conduint a 0.45 g (54%) del producte desitjat.

¹H-RMN

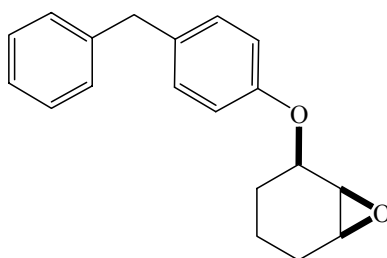
δ(ppm) = 1.2-1.4 (m, 1H), 1.6-1.8 (m, 1H), 1.8-2.0 (m, 4H), 3.3 (t_{ap}, 1H, $J^1=3.9\text{Hz}$, $J^2=1.2\text{Hz}$), 3.48 (dd, 1H, $J^1=4.2\text{Hz}$, $J^2=2.1\text{Hz}$), 4.78 (ddd, 1H, $J^1=8.5\text{Hz}$, $J^2=5.8\text{Hz}$, $J^3=2.1\text{Hz}$), 6.94 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.38 (t_{ap}, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.4-7.55 (m, 3H), 7.75-7.82 (m, 1H), 8.35-8.45 (m, 1H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 19.5, 22.7, 24.6, 53.2, 54.1, 74.9, 107.0, 120.7, 122.5, 125.2, 125.6, 126.4, 126.6, 127.3, 134.7, 153.4.

IR(ν) = 3053, 3009, 2946, 2867, 1598, 1579, 1503, 1459, 1399, 1270, 1235, 1156, 1097, 1069, 1021, 965, 943, 864, 848, 795, 769, 753, 735 cm⁻¹.

6.1.1.9. 2-(4-Benzilfenoxi)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12b)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **12a**, però utilitzant 4-benzilfenol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 70%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 30:1

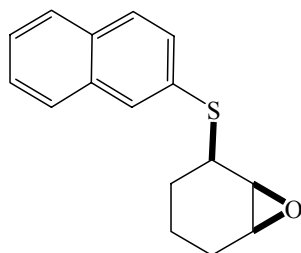
¹H-RMN

δ(ppm) = 1.2-1.4 (m, 1H), 1.55-1.8 (m, 3H), 1.8-1.9 (m, 1H), 3.25-3.32 (m, 1H), 3.38 (dd, 1H, $J^1=3.9\text{Hz}$, $J^2=1.8\text{Hz}$), 3.9 (s, 2H), 4.56 (ddd, 1H, $J^1=8.8\text{Hz}$, $J^2=5.5\text{Hz}$, $J^3=2.1\text{Hz}$), 6.93 (t, 1H, $J=2.5\text{Hz}$), 6.96 (t, 1H, $J=2.5\text{Hz}$), 7.10 (t, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 7.14 (t, 1H, $J=2.5\text{Hz}$), 7.18-7.25 (m, 3H), 7.25-7.35 (m, 2H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 19.4, 22.6, 24.5, 40.9, 53.0, 54.1, 74.2, 116.2, 125.8, 128.3, 128.7, 129.8, 133.7, 141.3, 155.8.

IR(ν) = 3060, 3026, 2999, 2940, 1610, 1510, 1493, 1452, 1238, 1177, 1036, 864, 785, 732, 698 cm⁻¹.

6.1.1.10. 2-(Naftalen-2-ilsulfanil)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12c)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **12a**, però utilitzant 1-tionaftol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 40%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 80:1

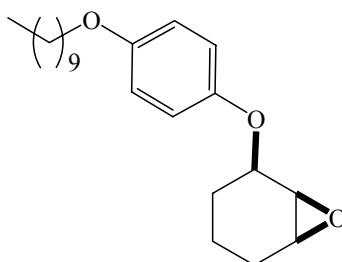
$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.2-1.4$ (m, 2H), $1.5-1.8$ (m, 2H), $1.8-1.9$ (m, 2H), 3.25 (tdap, 1H, $J^1=3.6\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 3.31 (dd, 1H, $J^1=3.7\text{Hz}$, $J^2=2.5\text{Hz}$), 3.6 (ddd, 1H, $J^1=8.9\text{Hz}$, $J^2=5.3\text{Hz}$, $J^3=2.5\text{Hz}$), $7.4-7.5$ (m, 2H), 7.55 (dd, 1H, $J^1=8.5\text{Hz}$, $J^2=1.7\text{Hz}$), $7.7-7.9$ (m, 3H), 7.96 (d, 1H, $J=1.2\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 19.9, 23.2, 26.2, 45.4, 54.2, 54.7, 126.1, 126.5, 127.3, 127.6, 128.4, 129.8, 131.0, 131.8, 132.2, 133.6$.

IR (ν) = 2960, 2936, 2857, 1729, 1499, 1458, 1345, 1282, 1260, 1134, 1071, 945, 854, 813, 744, 666 cm^{-1} .

6.1.1.11. 2-(3-Deciloxifenoxi)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (12d)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **12a**, però utilitzant 4-deciloxifenol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 40%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 30:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 0.86$ (t, 3H, $J=7.0\text{Hz}$), $1.2-1.35$ (m, 13H), 1.4 (quint, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), $1.55-1.65$ (m, 2H), $1.65-1.8$ (m, 3H), $1.8-1.9$ (m, 2H), $3.26-3.32$ (m, 1H), 3.37 (dd, 1H, $J^1=3.9\text{Hz}$,

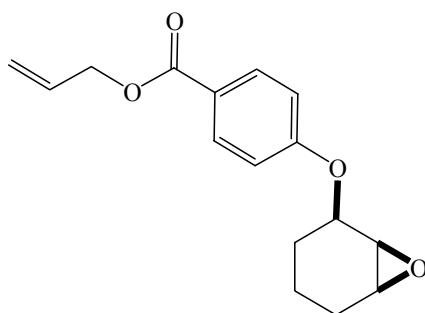
$J^2=2.0\text{Hz}$), 3.87 (t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 4.45 (ddd, 1H, $J^1=8.7\text{Hz}$, $J^2=5.4\text{Hz}$, $J^3=2.1\text{Hz}$), 6.8 (d, 1H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.9 (d, 1H, $J=9.0\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 19.6, 22.6, 22.7, 24.8, 26.0, 29.3, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 31.8, 53.2, 54.2, 68.5, 75.6, 115.3, 118.1, 151.3, 153.9$.

IR(ν) = 2955, 2919, 2859, 1503, 1463, 1222, 1039, 863, 823, 787, 720 cm^{-1} .

6.1.1.12. 4-(7-Oxabiciclo[4.1.0]hept-2-iloxi)benzoic àcid al·lil ester (**12e**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **12a**, però utilitzant 4-hidroxibenzoat d'al·lil s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 40%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 15:1

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.2\text{-}1.4$ (m, 1H), 1.6-1.7 (m, 2H), 1.7-1.8 (m, 1H), 1.8-1.9 (m, 2H), 3.28-3.33 (m, 1H), 3.38-3.41 (m, 1H), 4.7 (ddd, 1H, $J^1=8.7\text{Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$, $J^3=2.2\text{Hz}$), 4.76 (dt, 2H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 5.24 (dq_{ap}, $J^1=10.5\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 5.36 (dq_{ap}, $J^1=17.0\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 6.0 (ddt, $J^1=17.0\text{Hz}$, $J^2=10.5\text{Hz}$, $J^3=5.5\text{Hz}$), 7.55 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.96 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$).

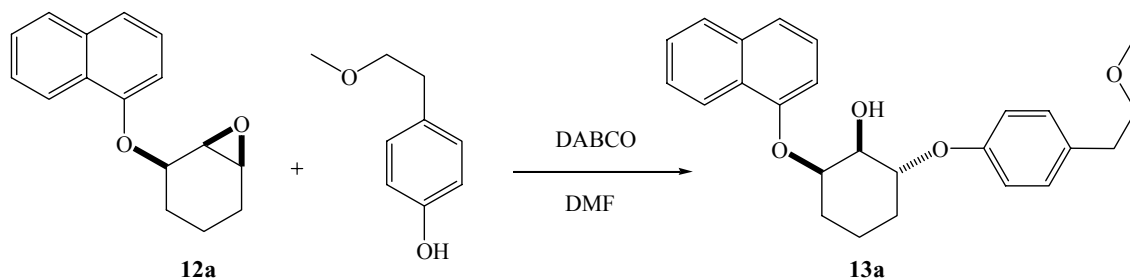
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 19.3, 22.5, 24.4, 52.8, 54.2, 65.2, 74.0, 115.1, 117.9, 122.7, 131.6, 132.3, 161.4, 165.9$.

IR (ν)= 2924, 2853, 1733, 1716, 1684, 1604, 1558, 1507, 1457, 1271, 1247, 1169, 1101, 1026, 669 cm^{-1} .

6.1.1.13. 2-[4-(2-Metoxietil)fenoxi]-6-(naftalen-1-iloxi)ciclohexanol (**13a**)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **13** a partir de **12** i diferents fenols.



A una solució de 4-(2-metoxietil)fenol (43 mg, 0.28 mmol) i **12a** (45 mg, 0.187 mmol) en DMF anhidre s'addiciona una punta d'espàtula de DABCO (catalític) i s'escalfa a 130°C durant 8 hores. Es refreda el cru i s'addiciona aigua, llavors s'extreu en AcOEt (3×30mL), i les fases orgàniques es renten amb una solució de NaOH 3M (4×25mL), després amb aigua i finalment amb una solució saturada de NaCl, posteriorment s'asseca amb MgSO₄. El producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica (hexà-AcOEt, 4:1) conduint a 35 mg (50%) del producte desitjat.

¹H-RMN

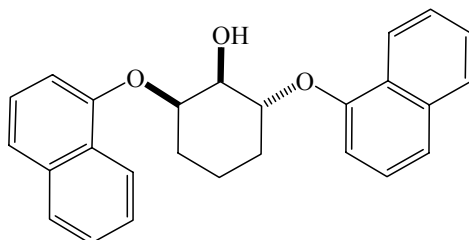
δ(ppm) = 1.5-1.8 (m, 4H), 2.0-2.2 (m, 2H), 2.8 (t, 2H, *J* = 7.0Hz), 3.3 (s, 3H), 3.6 (t, 2H, *J* = 7.0Hz), 4.1 (dd, 1H, *J*¹ = 7.3 Hz, *J*² = 2.9 Hz), 4.7 (td, 1H, *J*¹ = 7.6Hz, *J*² = 3.8Hz), 4.9-5.1 (dt, 1H, *J*¹ = 6.3Hz, *J*² = 2.4Hz), 6.9-7.0 (m, 3H), 7.1-7.2 (m, 2H), 7.35 (t, 3H, *J* = 8.0 Hz), 7.4-7.5 (m, 3H), 7.75-7.82 (m, 1H), 8.2-8.3 (m, 1H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 18.6, 26.6, 27.4, 35.2, 58.7, 72.6, 73.3, 76.5, 77.4, 107.1, 116.3, 120.8, 121.8, 125.3, 125.8, 126.4, 126.5, 127.6, 129.8, 131.8, 134.7, 153.0, 156.2.

IR (ν) = 3434, 2925, 2854, 1578, 1508, 1461, 1397, 1265, 1235, 1176, 1096, 1073, 1005, 790, 771 cm⁻¹.

6.1.1.14. 2,6-Bis(naftalen-1-iloxi)ciclohexanol (13b)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12a** i 1-naftol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 45%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 4:1

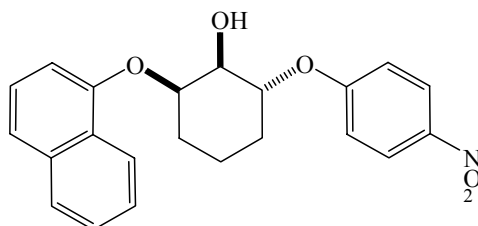
¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.5\text{-}1.9$ (m, 4H), $2.1\text{-}2.3$ (m, 2H), 2.59 (sa, 1H), 4.3-4.4 (m, 1H), 5-5.05 (m, 1H), 5.06-5.1 (m, 1H), 6.94 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.0 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.32 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.4-7.55 (m, 7H), 7.75-7.85 (m, 2H), 8.25-8.3 (m, 1H), 8.3-8.35 (m, 1H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.7, 26.4, 26.9, 72.0, 76.5, 77.3, 106.9, 107.1, 120.7, 120.8, 121.8, 121.9, 125.2, 125.3, 125.7, 125.8, 126.3, 126.3, 126.4, 126.4, 127.5, 127.6, 134.7, 134.7, 152.9, 153.2.$

6.1.1.15. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-nitrofenoxi)ciclohexanol (**13c**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12a** i 4-nitrofenol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 45%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 4:1

^1H -RMN

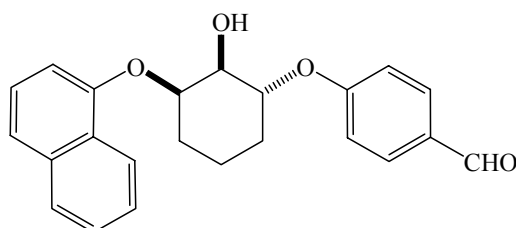
$\delta(\text{ppm}) = 1.45\text{-}1.8$ (m, 4H), $2.0\text{-}2.3$ (m, 2H), 2.83 (sa, 1H), 4.1 (dd, 1H, $J^1 = 7.6$ Hz, $J^2 = 2.8$ Hz), 4.8 (td, 1H, $J^1 = 7.9$ Hz, $J^2 = 3.8$ Hz), 4.9 (dt, 1H, $J^1 = 6.3$ Hz, $J^2 = 2.7$ Hz), 6.92 (da, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.0-7.1 (m, 2H), 7.36 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.7-7.9 (m, 1H), 8.1-8.2 (m, 2H), 8.2-8.3 (m, 1H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.4, 26.5, 27.5, 72.5, 76.6, 77.9, 107.1, 115.4, 121.0, 121.5, 125.4, 125.7, 125.8, 126.2, 126.4, 127.7, 134.6, 141.3, 152.7, 163.0.$

IR (ν) = 3452, 3053, 2943, 2868, 1592, 1578, 1510, 1495, 1461, 1397, 1341, 1260, 1238, 1173, 1097, 1074, 1026, 899, 845, 792, 773, 752, 691, 646 cm^{-1} .

6.1.1.16. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzaldehyd (**13d**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12a** i 4-hidroxibenzaldehyd s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 75%).

$^1\text{H-RMN}$

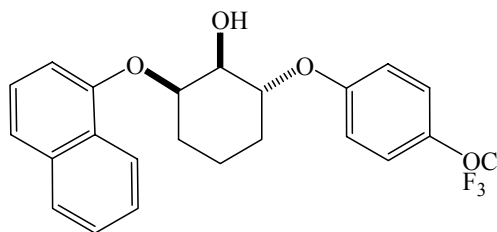
$\delta(\text{ppm}) = 1.45\text{-}1.65$ (m, 3H), $1.65\text{-}1.75$ (m, 1H), $2.05\text{-}2.15$ (m, 2H), 3.04 (sa, 1H), 4.05 (dd, 1H, $J^1=7.7$ Hz, $J^2=2.7$ Hz), 4.88 (td, 1H, $J^1=7.7\text{Hz}$, $J^2=4.0\text{Hz}$), 4.94 (dt, 1H, $J^1=6.5\text{Hz}$, $J^2=2.5\text{Hz}$), 6.9 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 7.07 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.34 (t, 1H, $J=8.0$ Hz), 7.4-7.5 (m, 3H), 7.75-7.85 (m, 1H), 8.3 (dd, 1H, $J^1=6.5\text{Hz}$, $J^2=3.5\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 18.4, 26.5, 27.3, 72.2, 76.6, 77.4, 107.1, 115.8, 120.8, 121.7, 125.2, 125.3, 125.7, 126.3, 127.5, 127.6, 130.0, 131.9, 134.7, 152.9, 163.0, 190.6$.

IR(v) = 3469, 3061, 2940, 2863, 1687, 1592, 1598, 1580, 1507, 1458, 1397, 1259, 1235, 1160, 1097, 1097 cm^{-1} .

6.1.1.17. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-trifluorometoxifenoxi)ciclohexanol (**13e**)



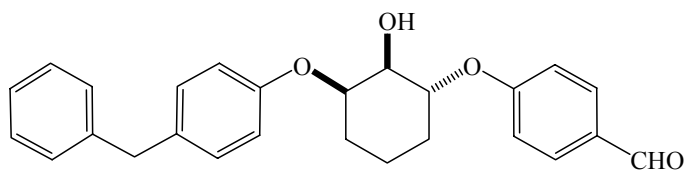
D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12a** i 4-trifluorometilfenol s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 73%).

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.5\text{-}1.8$ (m, 4H), $2.0\text{-}2.2$ (m, 2H), 2.80 (sa, 1H), 4.1 (dd, 1H, $J^1=7.5$ Hz, $J^2=3.0$ Hz), 4.7 (td, 1H, $J^1=8.0\text{Hz}$, $J^2=4.0\text{Hz}$), 4.9-4.95 (m, 1H), 6.9 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 7-7.1 (m, 2H), 7.1-7.1 (m, 2H), 7.35 (t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.4-7.6 (m, 3H), 7.8-7.9 (m, 1H), 8.2-8.3 (m, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 18.5, 26.6, 27.4, 72.5, 76.5, 77.9, 107.2, 117.0, 121.0, 121.7, 122.5, 125.4, 125.7, 126.3, 126.4, 127.7, 134.7, 143.0, 152.9, 156.3$.

6.1.1.18. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzaldehyd (13f)

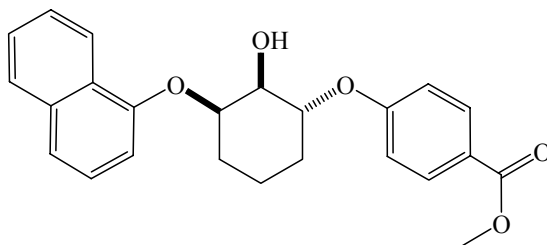
D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12b** i 4-hidroxibenzaldehid s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 69%).

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.4-1.8$ (m, 4H), $2-2.2$ (m, 2H), 2.8 (sa, 1H), 3.93 (s, 2H), 4.0 (dd, 1H, $J^1=7.0$ Hz, $J^2=3.0$ Hz), $4.6-4.7$ (m, 1H), 4.7 (td, 1H, $J^1=7.5\text{Hz}$, $J^2=4.0\text{Hz}$), $6.85-6.95$ (m, 2H), $7-7.15$ (m, 4H), $7.15-7.25$ (m, 3H), $7.25-7.35$ (m, 2H), 7.8 (d, 1H, $J^1=8.5\text{Hz}$), 9.9 (s, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 18.0, 26.3, 27.1, 41.0, 70.9, 71.7, 76.4, 115.7, 116.3, 125.8, 128.3, 128.7, 129.7, 129.8, 131.9, 134.2, 141.2, 155.5, 162.9, 190.7$.

6.1.1.19. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat de metil (13g)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12a** i 4-hidroxibenzoat de metil s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 65%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 5:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.5-1.8$ (m, 4H), $2.05-2.15$ (m, 2H), 2.7 (sa, 1H), 3.87 (s, 3H), 4.1 (dd, 1H, $J^1=7.0$ Hz, $J^2=2.5$ Hz), 4.88 (td, 1H, $J^1=7.6\text{Hz}$, $J^2=3.8\text{Hz}$), $4.9-5.0$ (m, 1H), 6.9 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), $7-7.05$ (m, 2H), 7.35 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.4 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), $7.45-7.5$ (m, 2H), $7.75-7.85$ (m, 1H), $7.95-8.05$ (m, 2H), $8.2-8.3$ (m, 1H).

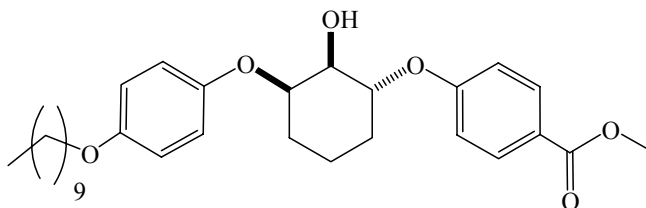
$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 18.4, 26.5, 27.2, 51.8, 72.3, 76.5, 77.1, 107.1, 115.3, 120.9, 121.7, 122.8, 125.4, 125.7, 126.3, 126.4, 127.6, 131.6, 134.7, 152.9, 161.6, 166.7.$

IR (ν)=3410, 3035, 2948, 1723, 1602, 1578, 1504, 1463, 1430, 1399, 1255, 1234, 1201, 1171, 1100, 794, 767, 706 cm^{-1} .

6.1.1.20. 4-[3-(3-Deciloxifenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzoat de metil

(13h)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12d** i 4-hidroxibenzoat de metil s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 77%).

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 0.86$ (t, 3H, $J=6.8\text{Hz}$), 1.2-1.35 (m, 14H), 1.4-1.8 (m, 6H), 1.8-2.1 (m, 2H), 2.5 (sa, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.88 (t, 3H, $J=6.6\text{Hz}$), 3.9-4.0 (m, 1H), 4.56 (td, 1H, $J^1=3.5\text{Hz}$, $J^2=2.7\text{Hz}$), 4.7 (td, 1H, $J^1=7.6\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$), 6.8 (d, 2H, $J=9.3\text{Hz}$), 6.9 (d, 2H, $J=9.3\text{Hz}$), 6.97 (d, 2H, $J=9.0\text{ Hz}$), 7.96 (d, 2H, $J=9.3\text{ Hz}$).

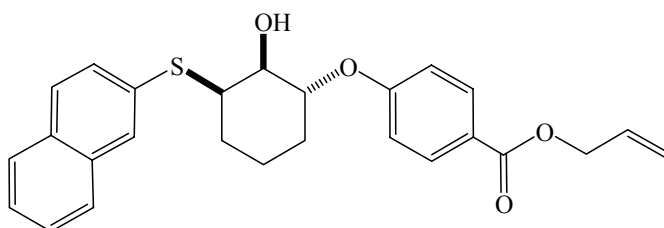
$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 18.2, 22.7, 26.0, 26.5, 27.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 30.3, 31.9, 51.8, 68.5, 72.2, 76.9, 77.6, 115.3, 115.4, 118.1, 126.3, 131.6, 151.3, 153.9, 161.6, 166.7.$

IR (ν)=3425, 3012, 2928, 2927, 2856, 1719, 1604, 1505, 1463, 1436, 1280, 1220, 1169, 1107, 1040, 1006, 846, 769 cm^{-1} .

6.1.1.21. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-2-ilsulfanil)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil

(13i)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12c** i 4-hidroxibenzoat d'al·lil s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 60%).

¹H-RMN

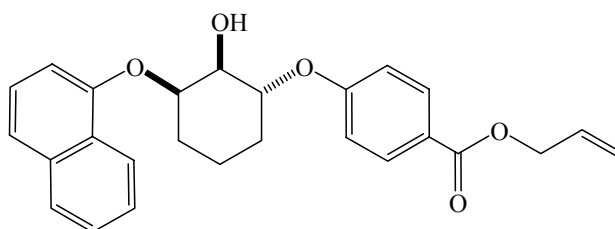
δ (ppm) = 1.7-1.8 (m, 3H), 1.8-1.9 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 1H), 2.73 (sa, 1H), 3.85 (ddd, 1H, $J^1=12.0$ Hz, $J^2=6.0$ Hz, $J^3=3.0$ Hz), 3.95-4.0 (m, 1H), 4.63-4.67 (m, 1H), 4.78 (dt, 2H, $J^1=5.5$ Hz, $J^2=1.5$ Hz), 5.26 (dq_{ap}, $J^1=10.5$ Hz, $J^2=1.2$ Hz), 5.38 (dq_{ap}, $J^1=17.5$ Hz, $J^2=1.5$ Hz), 6.02 (ddt, $J^1=17.2$ Hz, $J^2=10.5$ Hz, $J^3=5.5$ Hz), 6.9 (d, 2H, $J=9.5$ Hz), 7.45-7.5 (m, 3H), 7.55-7.62 (m, 1H), 7.7 (d, 1H, $J=8.5$ Hz), 7.72-7.76 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, $J=1.5$ Hz), 7.96 (d, 2H, $J=9.0$ Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 20.0, 24.9, 26.5, 49.3, 65.2, 68.4, 75.3, 115.2, 117.9, 122.8, 126.1, 126.6, 127.2, 127.6, 128.7, 128.7, 129.8, 130.9, 131.7, 132.1, 132.4, 133.6, 161.2, 165.8.

IR (ν) = 3493, 3059, 2930, 2860, 1713, 1602, 1504, 1453, 1249, 1167, 1106, 1067, 983, 848, 817, 744 cm^{-1} .

Punt de fusió: 116-120°C

6.1.1.22. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (**13j**)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12a** i 4-hidroxibenzoat d'al·lil s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 65%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 7:1

¹H-RMN

δ (ppm) = 1.55-1.8 (m, 4H), 2.1-2.25 (m, 2H), 2.6 (sa, 1H), 4.1 (da, 1H, $J=5.5$ Hz), 4.8 (dt, 2H, $J^1=5.5$ Hz, $J^2=1.5$ Hz), 4.85 (td, 1H, $J^1=7.6$ Hz, $J^2=3.8$ Hz), 4.9-5.0 (m, 1H), 5.27 (dq_{ap}, $J^1=10.5$ Hz, $J^2=1.3$ Hz), 5.39 (dq_{ap}, $J^1=17.5$ Hz, $J^2=1.5$ Hz), 6.0 (ddt, $J^1=17.5$ Hz, $J^2=10.5$ Hz, $J^3=5.5$ Hz), 6.9 (d, 1H, $J=7.5$ Hz), 7.0 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.3 (t, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.4-7.52 (m, 3H), 7.75-7.83 (m, 1H), 8.0 (d, 2H, $J=9.0$ Hz), 8.2-8.3 (m, 1H).

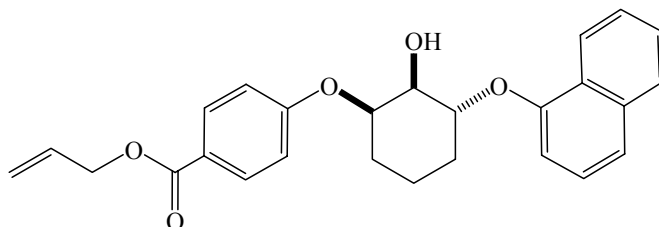
¹³C-RMN

δ (ppm) = 18.5, 26.5, 27.3, 65.3, 72.4, 76.5, 77.1, 107.1, 115.3, 118.0, 121.0, 121.6, 122.8, 125.4, 125.7, 126.3, 126.4, 127.7, 131.7, 132.4, 134.7, 152.9, 161.7, 165.9.

IR(v) = 3490, 3055, 2937, 2866, 1713, 1602, 1569, 1507, 1457, 1397, 1262, 1255, 1168, 1099, 849, 770 cm^{-1} .

6.1.1.23. 4-[2-Hidroxi-3-(naftalen-1-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil

(13j')



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12e** i 1-naftol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 55%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 7:1

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.5\text{-}1.8$ (m, 4H), 2.0-2.1 (m, 1H), 2.1-2.2 (m, 1H), 2.5 (sa, 1H), 4.1 (dd, 1H, $J^1=6.5$ Hz, $J^2=2.4$ Hz), 4.8 (dt, 2H, $J^1=5.6\text{Hz}$, $J^2=1.3\text{Hz}$), 4.85-4.95 (m, 2H), 5.27 (dq_{ap}, $J^1=10.4\text{Hz}$, $J^2=1.2\text{Hz}$), 5.39 (dq_{ap}, $J^1=17.2\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 6.0 (ddt, $J^1=17.2\text{Hz}$, $J^2=10.4\text{Hz}$, $J^3=5.6\text{Hz}$), 6.9 (d, 3H, $J=8.9$ Hz), 7.4 (t, 1H, $J=7.9\text{Hz}$), 7.4-7.5 (m, 3H), 7.75-7.85 (m, 1H), 8.0 (d, 2H, $J=8.9\text{Hz}$), 8.2-8.3 (m, 1H).

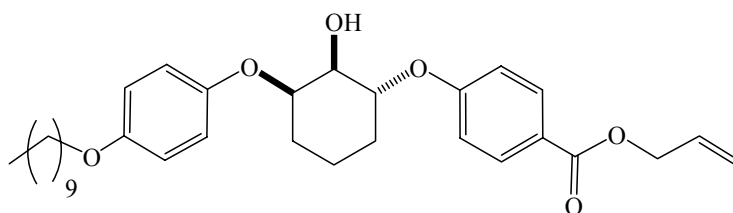
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.5, 26.2, 29.7, 65.3, 72.4, 76.1, 77.1, 106.8, 115.4, 118.0, 120.8, 121.8, 122.9, 125.4, 125.8, 126.3, 126.4, 127.7, 131.7, 132.4, 134.7, 153.0, 161.3, 165.9$.

IR(v) = 3490, 3055, 2926, 2856, 1714, 1602, 1569, 1506, 1457, 1397, 1262, 1255, 1168, 1098, 849, 770 cm^{-1} .

6.1.1.24. 4-[3-(3-Deciloxifenoxi)2-hidroxiciclohexiloxi]benzoat d'al·lil

(13k)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12d** i 4-hidroxibenzoat d'al·lil s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 53%).

¹H-RMN

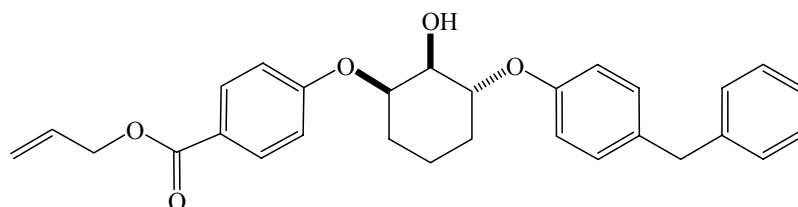
$\delta(\text{ppm}) = 0.86$ (t, 3H, $J=6.8\text{Hz}$), 1.2-1.35 (m, 13H), 1.4 (quint, 1H, $J=7.0\text{Hz}$), 1.5-1.8 (m, 6H), 1.9-2.0 (m, 1H), 2.05-2.15 (m, 1H), 2.5 (sa, 1H), 3.88 (t, 3H, $J=6.5\text{Hz}$), 3.9 (dd, 1H, $J^1=7.0\text{Hz}$, $J^2=3.0\text{Hz}$), 4.5 (td, 1H, $J^1=6.2\text{Hz}$, $J^2=3.1\text{Hz}$), 4.7 (td, 1H, $J^1=7.5\text{Hz}$, $J^2=4.0\text{Hz}$), 4.8 (dt, 2H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 5.25 (dq_{ap}, $J^1=10.5\text{Hz}$, $J^2=1.4\text{Hz}$), 5.37 (dq_{ap}, $J^1=17.2\text{Hz}$, $J^2=1.4\text{Hz}$), 6.0 (ddt, $J^1=17.2\text{Hz}$, $J^2=10.5\text{Hz}$, $J^3=5.5\text{Hz}$), 6.8 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.89 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.97 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 8.0 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$).

¹³C-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 18.1, 22.7, 26.0, 26.5, 29.3, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 29.7, 31.9, 65.3, 68.5, 72.3, 76.9, 77.6, 115.3, 115.4, 118.0, 118.1, 122.7, 131.7, 132.4, 150.9, 154.1, 161.7, 165.9.$

IR(v) = 3490, 2928, 2857, 1717, 1604, 1505, 1464, 1261, 1251, 1220, 1168, 1102, 1003, 770 cm^{-1} .

6.1.1.25. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-hidroxiciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (**13l**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12e** i 4-benzilfenol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 20%.

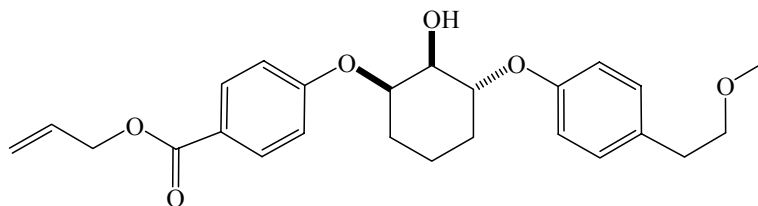
Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 10:1

¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.5-1.8$ (m, 4H), 1.9-2.1 (m, 2H), 2.45 (sa, 1H), 3.9 (s, 2H), 4.0 (da, 1H, $J^1=5.0\text{Hz}$), 4.6 (m, 1H), 4.8 (d, 2H, $J=5.0\text{Hz}$), 4.8 (m, 1H), 5.25 (d, $J=10.0\text{Hz}$), 5.37 (d, $J=17.0\text{Hz}$), 6.0 (ddt, $J^1=17.0\text{Hz}$, $J^2=10.0\text{Hz}$, $J^3=5.0\text{Hz}$), 6.9 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.0 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.1 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.1-7.2 (m, 3H), 8.0 (dd, 2H, $J^1=14.0\text{Hz}$, $J^2=7.0\text{Hz}$), 8.0 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$).

¹³C-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.2, 26.3, 27.1, 41.0, 65.3, 72.1, 75.9, 76.9, 115.5, 116.2, 118.0, 122.9, 126.0, 128.4, 128.8, 130.0, 131.7, 132.4, 134.1, 141.4, 155.9, 161.4, 165.9.$

6.1.1.26. 4-{2-Hidroxi-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]ciclohexiloxi}benzoatd'al·lil (13m)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12e** i 4-(2-metoxietil)-fenol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 25%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 10:1

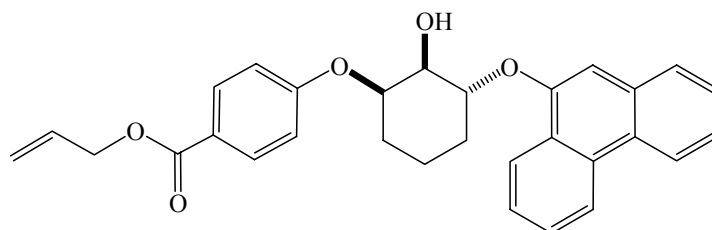
¹H-RMN

δ (ppm) = 1.5-1.7 (m, 4H), 1.9-2.1 (m, 2H), 2.48 (sa, 1H), 2.8 (t, 2H, $J=7.2$ Hz), 3.3 (s, 3H), 3.5 (t, 2H, $J=7.2$ Hz), 4.0 (dd, 1H, $J^1=7.0$ Hz, $J^2=2.5$ Hz), 4.6 (td, 1H, $J^1=7.2$ Hz, $J^2=3.7$ Hz), 4.8 (da, 2H, $J=5.0$ Hz), 4.8 (m, 1H), 5.25 (d, 1H, $J=10.5$ Hz), 5.37 (d, 1H, $J=17.5$ Hz), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.5$ Hz, $J^2=10.5$ Hz, $J^3=5.0$ Hz), 6.9 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.0 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.1 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 8.0 (d, 2H, $J=8.5$ Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 18.2, 26.3, 27.0, 35.3, 58.6, 65.3, 72.1, 73.8, 75.3, 75.9, 115.5, 116.2, 118.0, 122.9, 129.8, 131.7, 131.8, 132.4, 156.0, 161.4, 165.9.

IR (ν) = 3490, 2925, 2855, 1717, 1604, 1505, 1459, 1236, 1220, 1168, 1102, 790, 725 cm^{-1}

6.1.1.27. 4-[2-Hidroxi-3-(fenantren-9-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil(13n)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **13a**, però utilitzant **12e** i 9-fenantrol s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 20%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 10:1

¹H-RMN

δ (ppm) = 1.7-1.9 (m, 4H), 2.0-2.15 (m, 1H), 2.2-2.3 (m, 1H), 2.5 (sa, 1H), 4.3-4.4 (sa, 1H), 4.8 (d, 2H, $J=5.0$ Hz), 4.9 (da, 1H, $J^1=7.5$ Hz), 5.0-5.1 (m, 1H), 5.25 (da, 1H,

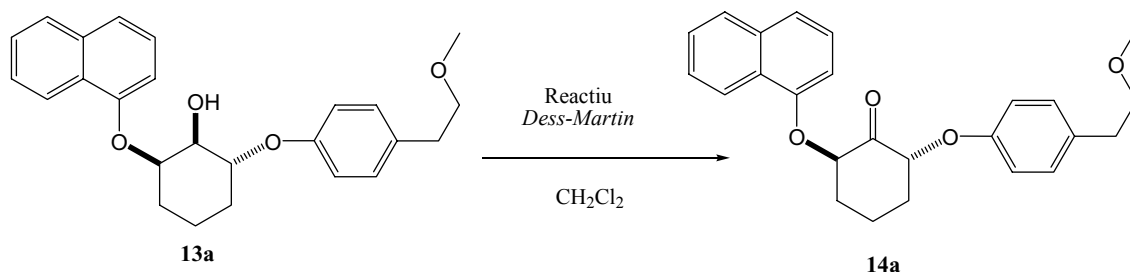
$J=10.0\text{Hz}$), 5.37 (d, 1H, $J=17.5\text{Hz}$), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.5\text{Hz}$, $J^2=10.0\text{Hz}$, $J^3=5.0\text{Hz}$), 6.9 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.1 (s, 1H), 7.45-7.8 (m, 6H), 8.0 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 8.7 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.6, 26.2, 26.5, 65.3, 71.5, 76.2, 76.5, 104.7, 115.5, 118.0, 122.4, 122.5, 122.7, 123.0, 124.5, 126.5, 127.0, 127.2, 127.3, 131.5, 131.7, 132.4, 132.6, 151.0, 161.3, 165.8.$

6.1.1.28. 2-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-6-(naftalen-1-iloxi)ciclohexanona (14a)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **14** a partir de la oxidació dels compostos **13**.



Sobre una dissolució de **13a** (35 mg, 89 μmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) s'addiciona el reactiu de *Dess-Martin* (0.38 mL al 15 % en CH_2Cl_2 , 134 μmol) i s'agita a temperatura ambient durant 3 hores. A continuació s'addiciona Et_2O , i una solució aquosa de NaHCO_3 i $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ i s'agita 5 minuts. Es separa la fase orgànica i es reextreu la fase aquosa en Et_2O ($2 \times 30\text{mL}$). Es renten les fases orgàniques amb aigua i solució saturada de NaCl i s'assequen sobre MgSO_4 . S'eliminen els dissolvents al buit i el residu es purifica mitjançant columna cromatogràfica (hexà-AcOEt, 13:1) obtenint 19 mg (55%) del producte desitjat.

^1H -RMN

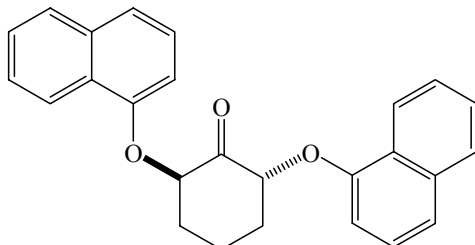
$\delta(\text{ppm}) = 2-2.5$ (m, 6H), 2.7 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 3.3 (s, 1H), 3.5 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 4.9 (dd, 1H, $J^1=8.4\text{Hz}$, $J^2=4.6\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=6.7\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$), 6.4 (d, 1H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.45-6.55 (m, 2H), 6.85-6.95 (m, 2H), 7.15 (t, 1H, $J=7.9\text{Hz}$), 7.4-7.55 (m, 3H), 7.75-7.82 (m, 1H), 8.25-8.35 (m, 1H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.8, 34.8, 35.0, 35.2, 58.6, 73.7, 79.2, 80.2, 106.6, 115.0, 121.3, 121.8, 125.5, 125.6, 126.6, 127.6, 127.6, 129.8, 131.9, 134.6, 152.3, 155.4, 208.0.$

IR (ν)= 2922, 2853, 1687, 1740, 1577, 1508, 1461, 1397, 1264, 1235, 1206, 1115, 1095, 791, 738, 516 cm^{-1} .

6.1.1.29. 2,6-bis(naftalen-1-iloxi)ciclohexanona (14b)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 65%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 40:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 2.2\text{-}2.5$ (m, 6H), 5.2 (dd, 2H, $J^1=7.2\text{Hz}$, $J^2=6.9\text{Hz}$), 6.2 (d, 2H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.0 (t, 2H, $J=7.7\text{Hz}$), 7.4 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.45-7.55 (m, 4H), 7.75-7.82 (m, 2H), 8.25-8.35 (m, 2H).

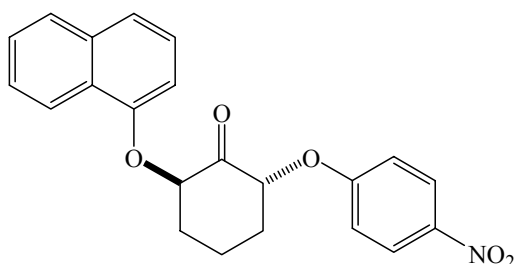
$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 19.0, 35.0, 79.9, 106.6, 121.2, 121.8, 125.5, 125.5, 125.6, 126.6, 127.6, 134.6, 152.6, 207.8$.

IR (ν)= 2927, 2849, 1742, 1596, 1580, 1506, 1464, 1399, 1263, 1234, 1121, 1092, 789, 768 cm^{-1} .

Punt de fusió : 174-176°C.

6.1.1.30. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-nitrofenoxi)ciclohexanona (14c)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 72%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 20:1

$^1\text{H-RMN}$

δ (ppm) = 2-2.2 (m, 3H), 2.4-2.7 (m, 3H), 5.0-5.2 (m, 2H), 6.2-6.3 (m, 2H), 6.7(d, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.3 (t, 1H, $J= 8.1$ Hz), 7.5-7.6 (m, 3H), 7.7-7.9 (m, 3H), 8.3-8.4 (m, 1H).

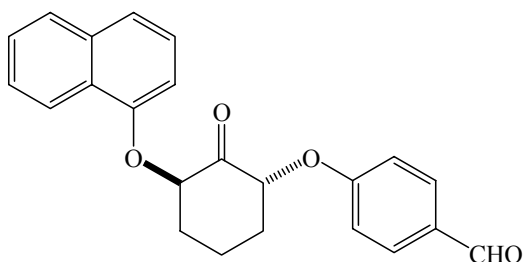
^{13}C -RMN

δ (ppm) = 18.7, 34.1, 35.2, 78.6, 80.7, 107.2, 114.6, 121.4, 122.0, 125.4, 125.5, 125.5, 125.9, 126.9, 127.9, 134.7, 141.5, 152.1, 161.9, 206.5.

IR (ν)= 3109, 2960, 1742, 1593, 1509, 1398, 1345, 1264, 1219, 1111, 1096, 1078, 983, 770, 669 cm^{-1} .

Punt de fusió: 131-132°C.

6.1.1.31. 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzaldehyd (**14d**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 60%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 13:1

^1H -RMN

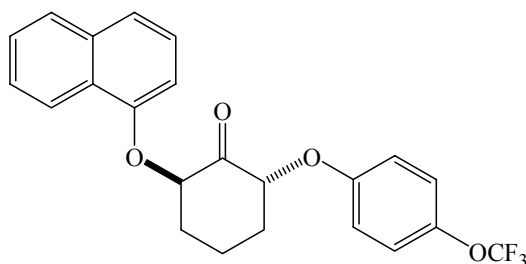
δ (ppm) = 2-2.2 (m, 3H), 2.4-2.7 (m, 3H), 5.0-5.2 (m, 2H), 6.45-6.55 (m, 2H), 6.7(d, 1H, $J=7.2$ Hz), 7.3 (t, 1H, $J= 7.8$ Hz), 7.4-7.6 (m, 5H), 7.8-7.85 (m, 1H), 8.3-8.4 (m, 1H), 9.76 (s, 1H).

^{13}C -RMN

δ (ppm) = 18.7, 34.3, 35.2, 78.5, 80.6, 107.1, 114.9, 121.5, 121.9, 125.4, 125.5, 125.9, 126.8, 127.8, 130.2, 131.7, 134.7, 152.3, 161.9, 190.6, 206.8.

IR (ν)= 2952, 2929, 2852, 1744, 1694, 1601, 1584, 1511, 1458, 1400, 1270, 1240, 1163, 1096, 1080, 833, 800, 773 cm^{-1} .

Punt de fusió: 149-150°C.

6.1.1.32. 2-(Naftalen-1-iloxi)-6-(4-trifluorometoxifenoxi)ciclohexanona**(14e)**

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 76%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 25:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 2\text{-}2.3$ (m, 3H), $2.3\text{-}2.5$ (m, 2H), $2.5\text{-}2.6$ (m, 1H), 4.9 (dd, 1H, $J^1=9.1\text{Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=6.1\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$), 6.35-6.45 (m, 2H), 6.6(d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 6.8-6.95 (m, 2H), 7.2 (t, 1H, $J=8.1\text{Hz}$), 7.45-7.55 (m, 3H), 7.75-7.85 (m, 1H), 8.3-8.4 (m, 1H).

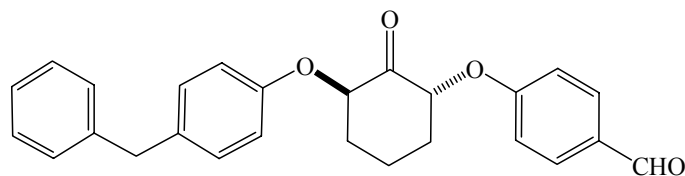
$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 18.8, 34.5, 35.1, 79.2, 80.5, 106.9, 115.7, 121.7, 121.7, 122.3, 125.5, 125.5, 125.7, 126.8, 127.7, 134.7, 143.1, 152.5, 155.4, 207.5.$

$^{19}\text{F-RMN}$ $\delta(\text{ppm}) = -58.8$ (s).

IR (ν)= 3069, 2945, 2872, 1742, 1580, 1505, 1458, 1398, 1266, 1239, 1197, 1163, 1101, 990, 843, 791, 771 cm^{-1} .

Punt de fusió: 84-85°C.

6.1.1.33. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzalhid (14f)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 55%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 13:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.9\text{-}2.1$ (m, 3H), $2.1\text{-}2.3$ (m, 1H), $2.3\text{-}2.45$ (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 4.9 (dd, 1H, $J^1=5.4\text{Hz}$, $J^2=3.3\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.6\text{Hz}$, $J^2=5.4\text{Hz}$), 6.5-6.6 (m, 2H), 6.75-6.85 (m, 2H), 7.05-7.15 (m, 2H), 7.15-7.35 (m, 5H), 7.5-7.6 (m, 2H), 9.76 (s, 1H).

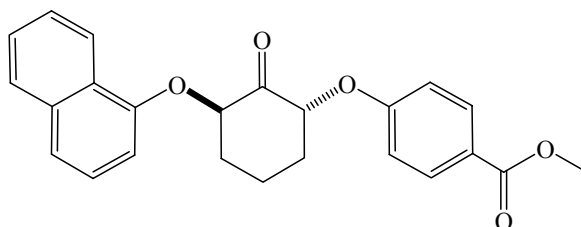
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.4, 34.1, 35.0, 41.0, 78.9, 80.2, 115.1, 115.4, 126.2, 128.5, 128.7, 130.1, 130.3, 131.8, 135.0, 141.2, 155.2, 162.0, 190.7, 206.8.$

IR (ν)= 2923, 2855, 1747, 1696, 1605, 1513, 1452, 1242, 1167, 1079, 839, 795, 757, 744 cm^{-1} .

Punt de fusió: 93-94°C.

6.1.1.34. 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat de metil (**14g**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 80%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 13:1

^1H -RMN

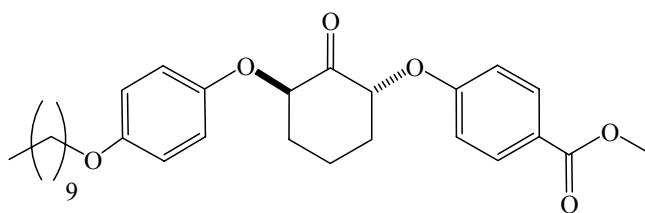
$\delta(\text{ppm}) = 2\text{-}2.2$ (m, 3H), $2.3\text{-}2.45$ (m, 2H), $2.45\text{-}2.6$ (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 5.0 (dd, 1H, $J^1=10.0\text{Hz}$, $J^2=5.5\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=3.5\text{Hz}$), 6.4 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.6 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.2 (t, 1H, $J=8\text{Hz}$), 7.5-7.55 (m, 3H), 7.7 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.88 (dd, 1H, $J^1=6.0\text{Hz}$, $J^2=3.0\text{Hz}$), 8.3 (dd, 1H, $J^1=6.3\text{Hz}$, $J^2=3.3\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.8, 34.4, 35.1, 51.8, 78.6, 80.6, 107.0, 114.3, 121.6, 121.8, 123.1, 125.4, 125.6, 125.7, 126.7, 127.8, 131.4, 134.7, 152.4, 160.7, 166.6, 207.1.$

IR (ν)= 2955, 2931, 2865, 1741, 1717, 1603, 1582, 1510, 1462, 1435, 1393, 1281, 1267, 1243, 1173, 1108, 1096, 1075, 841, 793, 763 cm^{-1} .

Punt de fusió: 148-149°C.

6.1.1.35. 4-[3-(4-Deciloxifenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat de metil (14h)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 70%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 13:1

$^1\text{H-RMN}$

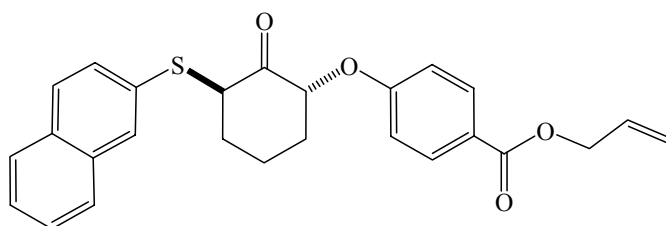
$\delta(\text{ppm}) = 0.86$ (t, 3H, $J=6.7\text{Hz}$), 1.2-1.35 (m, 12H), 1.35-1.45 (m, 2H), 1.74 (quint., 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 1.9-2.2 (m, 6H), 3.8 (s, 3H), 3.9 (t, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 4.8 (dd, 1H, $J^1=5.7\text{Hz}$, $J^2=3.6\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=8.8\text{Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.7(s, 4H), 7.8 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 18.5, 22.7, 26.0, 29.3, 29.3, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9, 34.3, 34.9, 51.9, 68.6, 79.1, 80.8, 114.6, 115.5, 116.5, 123.3, 131.5, 150.8, 154.3, 160.9, 166.6, 207.3.$

$\text{IR}(\nu) = 2925, 2854, 1743, 1718, 1604, 1507, 1278, 1239, 1169, 1110, 1080, 769 \text{ cm}^{-1}.$

Punt de fusió: 71-72°C.

6.1.1.36. 4-[3-(Naftalen-2-ilsulfanil)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14i)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 92%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 13:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.9-2.1$ (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 3H), 2.35-2.5 (m, 1H), 4.3 (t_{ap} , 1H, $J=4.2\text{Hz}$), 4.7 (dt, 2H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=1.4\text{Hz}$), 5.25 (dq_{ap} , 1H, $J^1=10.5\text{Hz}$, $J^2=1.4\text{Hz}$), 5.35 (dq_{ap} , 1H, $J^1=16.9\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 5.5 (dd, 1H, $J^1=10.2\text{Hz}$, $J^2=5.7\text{Hz}$), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.0\text{Hz}$, $J^2=10.5\text{Hz}$, $J^3=5.5\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.4(dd, 1H, $J^1=8.7\text{Hz}$, $J^2=1.8\text{Hz}$), 7.45 (dd,

2H, $J^1=6.3\text{Hz}$, $J^2=3.3\text{Hz}$), 7.6 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.7 (dd, 1H, $J^1=6.1\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$), 7.76 (d, 1H, $J=8.7\text{Hz}$), 7.79 (dd, 1H, $J^1=6.0\text{Hz}$, $J^2=2.7\text{Hz}$), 7.8 (d, 1H, $J=1.8\text{Hz}$).

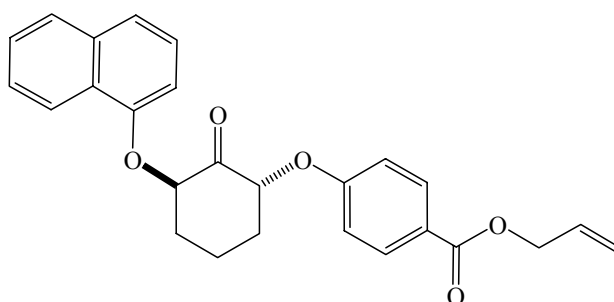
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 20.2, 33.3, 34.6, 54.7, 65.1, 77.3, 114.5, 117.9, 123.0, 126.6, 126.9, 127.4, 127.7, 128.1, 129.0, 129.9, 130.2, 131.4, 132.4, 132.4, 133.5, 161.2, 165.7, 204.0$.

IR(ν) = 2928, 2855, 1718, 1604, 1560, 1542, 1508, 1270, 1252, 1170, 1101, 1066, 769 cm^{-1} .

Punt de fusió: 104-105°C.

6.1.1.37. 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (**14j**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 95%).

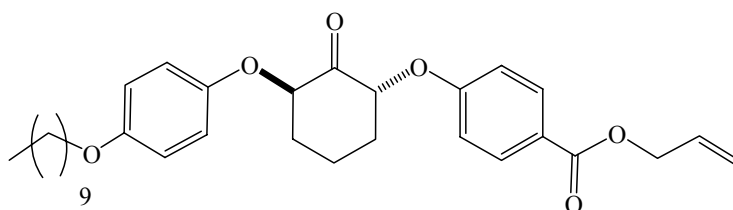
^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 2.0\text{-}2.2$ (m, 3H), 2.3-2.45 (m, 2H), 2.5 (dd, 1H, $J^1=14.0\text{Hz}$, $J^2=4.5\text{Hz}$), 4.7 (d, 2H, $J=5.5\text{Hz}$), 5.0 (dd, 1H, $J^1=9.7\text{Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=5.2\text{Hz}$, $J^2=3.7\text{Hz}$), 5.25 (d, 1H, $J=10.5\text{Hz}$), 5.35 (d, 1H, $J=17.5\text{Hz}$), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.5\text{Hz}$, $J^2=10.5\text{Hz}$, $J^3=5.5\text{Hz}$), 6.4 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.6 (d, 1H, $J=7.5\text{ Hz}$), 7.2(t, 1H, $J=7.7\text{Hz}$), 7.45 (dd, 2H, $J^1=9.2\text{Hz}$, $J^2=2.7\text{Hz}$), 7.7 (t, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.7 (d, 1H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.8 (dd, 1H, $J^1=6.2\text{Hz}$, $J^2=3.2\text{Hz}$), 8.2 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 8.3 (dd, 1H, $J^1=6.0\text{Hz}$, $J^2=3.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.7, 34.4, 35.1, 65.2, 78.5, 80.5, 106.9, 114.4, 117.9, 121.6, 121.7, 123.0, 125.4, 125.5, 125.7, 126.7, 127.7, 129.2, 131.2, 131.4, 132.3, 134.6, 152.3, 160.7, 165.7, 207.1$.

IR (ν)= 2925, 2854, 1741, 1717, 1701, 1684, 1604, 1577, 1559, 1507, 1458, 1397, 1266, 1240, 1169, 1107, 770 cm^{-1} .

6.1.1.38. 4-[3-(4-Deciloxifenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (**14k**)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 90%).

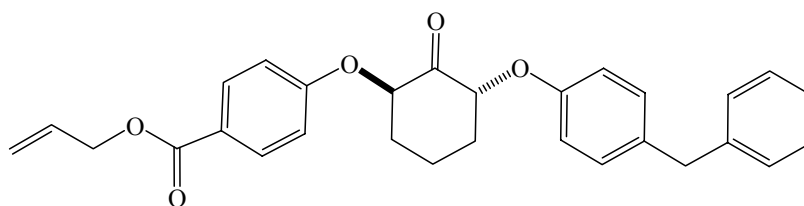
¹H-RMN

δ (ppm) = 0.85 (t, 3H, $J=6.7$ Hz), 1.2-1.35 (m, 12H), 1.42 (quint, 2H, $J=7.2$ Hz), 1.74 (quint, 2H, $J=7.2$ Hz), 1.9-2.0 (m, 3H), 2.1-2.4 (m, 3H), 3.9 (t, 2H, $J=6.5$ Hz), 4.7 (d, 2H, $J^1=5.5$ Hz), 4.8 (dd, 1H, $J^1=5.5$ Hz, $J^2=4.0$ Hz), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.0$ Hz, $J^2=5.5$ Hz), 5.25 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 5.35 (d, 1H, $J=17.0$ Hz), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.0$ Hz, $J^2=10.0$ Hz, $J^3=5.5$ Hz), 6.5 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 6.7 (s, 4H), 7.8 (d, 2H, $J=8.5$ Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.1, 18.4, 22.6, 26.0, 29.3, 29.3, 29.4, 29.5, 29.7, 31.9, 34.4, 35.1, 65.2, 68.5, 79.0, 80.7, 114.5, 115.4, 116.4, 117.9, 123.2, 131.6, 132.3, 150.7, 154.2, 160.9, 165.7, 207.3.

IR(v) = 2960, 2927, 2855, 1716, 1604, 1582, 1508, 1453, 1270, 1249, 1169, 1101, 1078, 769, 697 cm^{-1} .

6.1.1.39. 4-[3-(4-Benzilfenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoat d'al·lil (**14l**)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 95%).

¹H-RMN

δ (ppm) = 2.0-2.3 (m, 4H), 2.3-2.4 (m, 2H), 4.0 (s, 2H), 4.8 (d, 2H, $J=5.0$ Hz), 5.0 (dd, 1H, $J^1=5.0$ Hz, $J^2=3.2$ Hz), 5.1 (dd, 1H, $J^1=8.7$ Hz, $J^2=5.3$ Hz), 5.25 (d, 1H, $J=10.0$ Hz), 5.35 (d, 1H, $J=17.5$ Hz), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.5$ Hz, $J^2=10.5$ Hz, $J^3=5.0$ Hz), 6.6 (d, 2H, $J=$

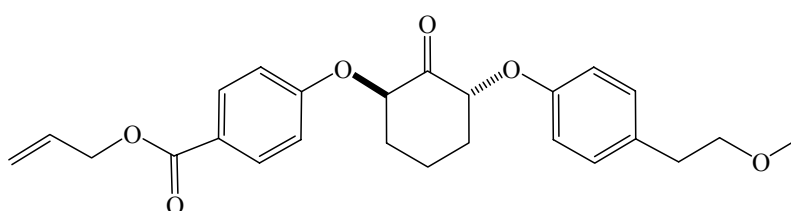
8.5Hz), 6.8 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.1 (d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.2-7.4 (m, 5H), 7.8 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.4, 34.3, 34.9, 40.9, 65.3, 79.0, 80.1, 114.6, 115.3, 118.0, 123.2, 126.1, 128.5, 128.8, 130.1, 131.6, 132.6, 134.8, 141.1, 155.3, 160.9, 165.7, 207.0.$

IR (ν)= 2926, 2854, 1739, 1716, 1604, 1582, 1508, 1453, 1270, 1249, 1168, 1101, 1077, 846, 769, 697 cm^{-1} .

6.1.1.40. 4-{3-[4-(2-Metoxietil)fenoxi]-2-oxociclohexiloxi}benzoat d'al·lil(14m)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 80%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 10:1

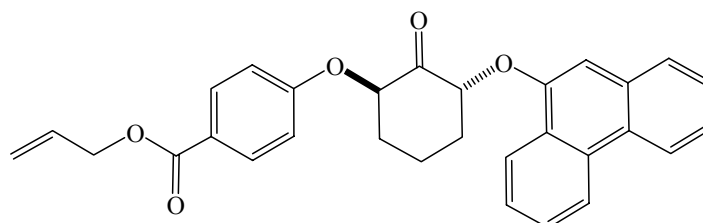
^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 2.0\text{-}2.4$ (m, 6H), 2.8 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 3.3 (s, 3H), 3.5 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 4.7 (d, 2H, $J=5.5\text{Hz}$), 4.9 (dd, 1H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=3.5\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.0\text{Hz}$, $J^2=5.5\text{Hz}$), 5.25 (d, 1H, $J=10.5\text{Hz}$), 5.35 (d, 1H, $J=17.5\text{Hz}$), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.5\text{Hz}$, $J^2=10.5\text{Hz}$, $J^3=5.5\text{Hz}$), 6.6 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.7 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.1 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.8 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.7, 34.4, 34.9, 35.2, 58.7, 65.2, 73.6, 79.0, 80.0, 114.2, 114.9, 118.0, 123.2, 130.6, 131.3, 131.6, 132.6, 155.3, 160.9, 165.7, 207.1.$

6.1.1.41. 4-[2-Oxo-3-(fenantren-9-iloxi)ciclohexiloxi]benzoat d'al·lil (14n)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **14a** s'obté el producte desitjat suficientment pur per la següent reacció sense necessitat de columna cromatogràfica (rendiment 90%).

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 2.1\text{-}2.4$ (m, 5H), $2.4\text{-}2.6$ (m, 1H), 4.8 (dt, 2H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.0\text{Hz}$, $J^2=5.0\text{Hz}$), $5.2\text{-}5.3$ (m, 2H), 5.33 (dq_{ap}, 1H, $J^1=17.5\text{Hz}$, $J^2=1.5\text{Hz}$), 6.0 (ddt, 1H, $J^1=17.5\text{Hz}$, $J^2=10.5\text{Hz}$, $J^3=5.0\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.6 (s, 1H), 7.4 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.4 (t, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.5 (t, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.6 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.6 (t, 1H, $J=7.0\text{Hz}$), 7.7 (t, 1H, $J=7.0\text{Hz}$), 8.4 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 8.6 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 8.7 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

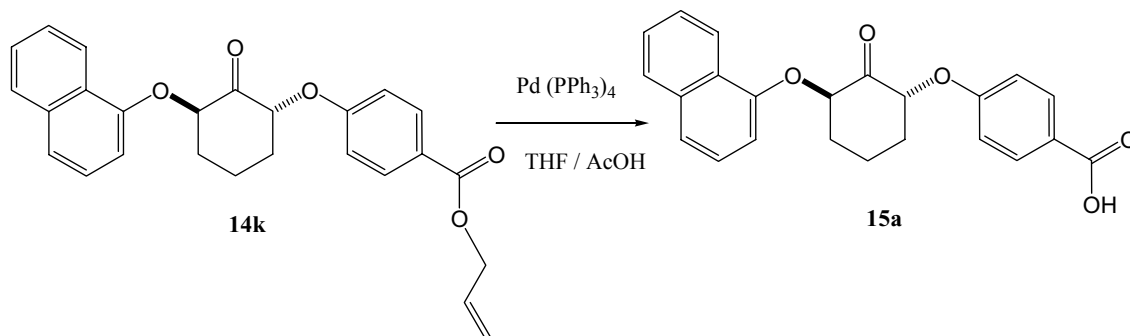
$\delta(\text{ppm}) = 18.8, 34.7, 35.1, 65.2, 78.9, 80.3, 105.3, 114.5, 117.9, 122.3, 122.4, 122.8, 123.3, 125.1, 126.1, 126.6, 126.7, 127.2, 127.5, 127.6, 131.6, 131.9, 132.3, 150.6, 160.7, 165.6, 207.4$.

IR (ν) = 2955, 2922, 2854, 1717, 1655, 1604, 1508, 1455, 1270, 1247, 1169, 1098, 770, 670 cm^{-1} .

Punt de fusió : 73-75°C.

6.1.1.42. àcid 4-[3-(Naftalen-1-iloxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (**15a**)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **15** a partir de la desprotecció del grup àcid carboxílic dels respectius compostos **14**.



A una solució de **14k** (28 mg, 0.067 mmol) en THF (2mL) s'addiciona $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.1mmol) i la mescla s'agita 30 minuts a temperatura ambient. S'addiciona àcid acètic (0.2mL) i la reacció s'agita 10 hores a la mateixa temperatura, a continuació s'addiciona aigua i s'extreu en AcOEt (3×20mL), es renten les fases orgàniques amb aigua i solució saturada de NaCl i s'asseca amb MgSO_4 . S'elimina el dissolvent i es purifica mitjançant columna cromatogràfica (hexà/AcOEt, 3:2) conduint a un sòlid blanc (12.6 mg, 50%).

¹H-RMN

δ(ppm) = 2.0-2.2 (m, 3H), 2.4-2.5 (m, 2H), 2.5-2.6 (m, 1H), 5.0 (dd, 1H, $J^1=9.7\text{Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=5.2\text{Hz}$, $J^2=3.2\text{Hz}$), 6.4 (d, 2H, $J=9.5\text{Hz}$), 6.7 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.3(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.5-7.55 (m, 3H), 7.7 (d, 2H, $J=9.5\text{Hz}$), 7.83-7.87 (m, 1H), 8.3-8.35 (m, 1H).

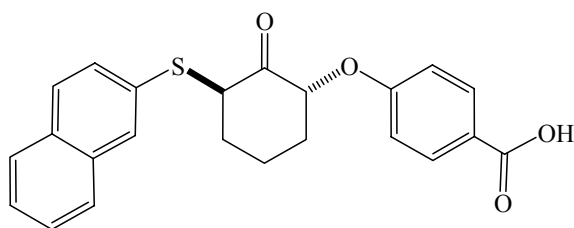
¹³C-RMN

δ(ppm) = 18.8, 34.4, 35.2, 78.5, 80.6, 107.1, 114.5, 121.6, 121.9, 122.0, 125.5, 125.6, 125.8, 126.8, 127.9, 128.5, 131.2, 133.9, 134.7, 152.3, 161.4, 170.9, 207.1.

IR (ν)= 3056, 2927, 2855, 1741, 1688, 1604, 1581, 1509, 1462, 1435, 1397, 1286, 1265, 1240, 1169, 1096, 1073, 793, 757 cm^{-1} .

Punt de fusió: 130°C.

6.1.1.43. àcid 4-[3-(Naftalen-2-ilsulfanil)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (**15b**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **15a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 40%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 3:2

¹H-RMN

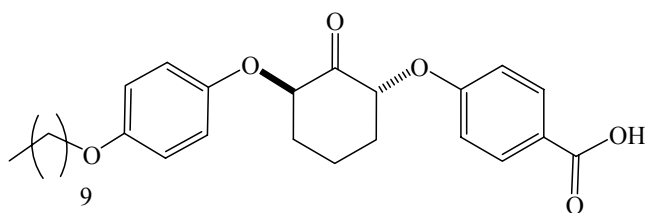
δ(ppm) = 1.8-2.0 (m, 3H), 2.0-2.3 (m, 3H), 4.1-4.2 (m, 1H), 5.4 (dd, 1H, $J^1=10.2\text{Hz}$, $J^2=5.7\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.4(d, 1H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.4-7.45 (m, 2H), 7.6 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.6-7.7 (m, 1H), 7.7 (d, 1H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.7-7.8 (m, 1H), 7.75-7.8 (m, 1H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 20.1, 33.3, 34.4, 54.7, 77.3, 114.4, 123.1, 126.5, 126.8, 127.3, 127.6, 128.0, 128.9, 129.8, 130.1, 131.7, 132.3, 133.5, 161.2, 168.3, 204.3.

IR (ν)= 3648, 2924, 2853, 1717, 1699, 1684, 1652, 1603, 1558, 1507, 1456, 1251, 1169, 850 cm^{-1} .

Punt de fusió: 155-157°C.

6.1.1.44. àcid 4-[3-(4-Deciloxifenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (**15c**)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **15a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 65%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 3:2

$^1\text{H-RMN}$

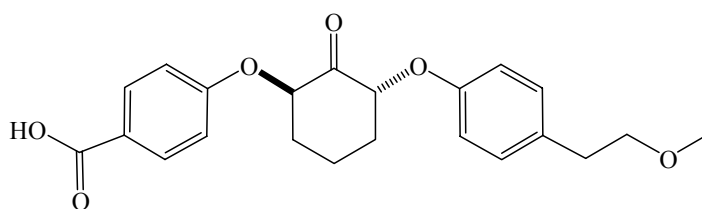
$\delta(\text{ppm}) = 0.84$ (t, 3H, $J=7.0\text{Hz}$), 1.2-1.35 (m, 12H), 1.43 (quint, 2H, $J=7.5\text{Hz}$), 1.76 (quint, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 1.9-2.0 (m, 1H), 2.0-2.1 (m, 2H), 2.15-2.3 (m, 1H), 2.3-2.4 (m, 2H), 3.9 (t, 2H, $J=6.5\text{Hz}$), 4.8 (dd, 1H, $J^1=5.7\text{Hz}$, $J^2=3.2\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.5\text{Hz}$, $J^2=5.5\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.8 (s, 4H), 7.8 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 18.4, 22.7, 26.0, 29.3, 29.4, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 34.2, 34.9, 68.6, 79.0, 80.8, 114.6, 115.5, 116.5, 122.2, 132.2, 150.6, 154.3, 161.5, 171.2, 207.2$.

IR (ν) = 3450, 3056, 2929, 2856, 1738, 1687, 1607, 1507, 1426, 1264, 1171, 1077, 898, 739 cm^{-1} .

Punt de fusió: 124°C (descomposició).

6.1.1.45. àcid 4-{3-[4-(2-metoxietil)-fenoxi]-2-oxociclohexiloxi}benzoic (**15d**)

D'acord amb el procediment descrit per la formació de **15a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 54%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 4:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.9-2.1$ (m, 3H), 2.1-2.3 (m, 1H), 2.3-2.4 (m, 2H), 2.8 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 3.3 (s, 3H), 3.6 (t, 2H, $J=7.0\text{Hz}$), 4.9 (dd, 1H, $J^1=5.5\text{Hz}$, $J^2=3.5\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.5\text{Hz}$,

$J^2=5.5\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.7 (d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.1 (d, 2H, $J=8.5\text{Hz}$), 7.8 (d, 2H, $J=8.5\text{ Hz}$).

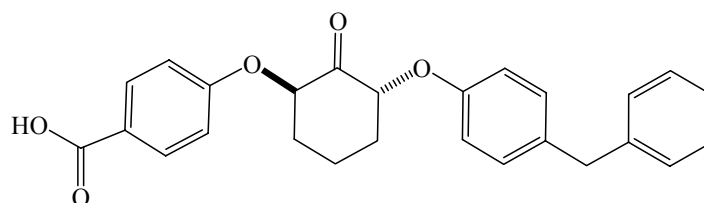
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.5, 34.3, 35.0, 35.3, 58.7, 73.7, 79.0, 80.1, 114.6, 115.4, 123.2, 130.1, 132.1, 132.7, 155.3, 161.4, 170.9, 207.1$.

IR (ν)= 2925, 2854, 1743, 1688, 1604, 1510, 1456, 1378, 1241, 1169, 1110, 999, 774 cm^{-1} .

Punt de fusió: 178-180°C.

6.1.1.46. àcid 4-[3-(3-benzilfenoxi)-2-oxociclohexiloxi]benzoic (**15e**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **15a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 69%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 3:1

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.9\text{-}2.15$ (m, 3H), 2.15-2.25 (m, 1H), 2.25-2.4 (m, 2H), 3.9 (s, 2H), 4.9 (dd, 1H, $J^1=5.2\text{Hz}$, $J^2=3.7\text{Hz}$), 5.1 (dd, 1H, $J^1=9.5\text{Hz}$, $J^2=5.5\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.8 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.0 (d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.2-7.4 (m, 5H), 7.8 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$).

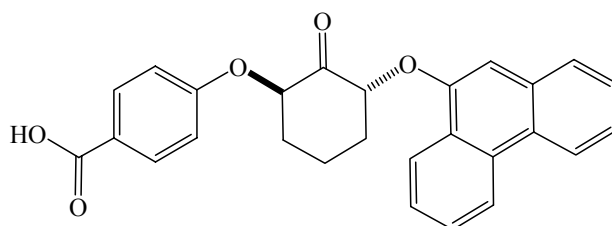
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 18.4, 34.3, 34.9, 40.9, 79.0, 80.1, 114.6, 115.3, 122.2, 126.1, 128.5, 128.8, 130.1, 132.3, 134.9, 141.1, 155.2, 161.5, 170.8, 207.0$.

IR (ν)= 3648, 2925, 2854, 1740, 1783, 1698, 1683, 1558, 1507, 1435, 1240, 1170, 1007, 896 cm^{-1} .

Punt de fusió: 155°C (descomposició).

6.1.1.47. àcid 4-[2-oxo-3-(fenantren-9-iloxi)ciclohexiloxi]benzoic (**15f**)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **15a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 68%.

Dissolvents columna: Hexà-AcOEt 3:2

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 2.0\text{-}2.45$ (m, 5H), 2.5-2.6 (m, 1H), 5.1 (dd, 1H, $J^1=8.8\text{Hz}$, $J^2=5.0\text{Hz}$), 5.3 (dd, 1H, $J^1=6.3\text{Hz}$, $J^2=3.4\text{Hz}$), 6.5 (d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.7 (s, 1H), 7.4-7.7 (m, 7H), 8.4 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 8.6 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 8.7 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

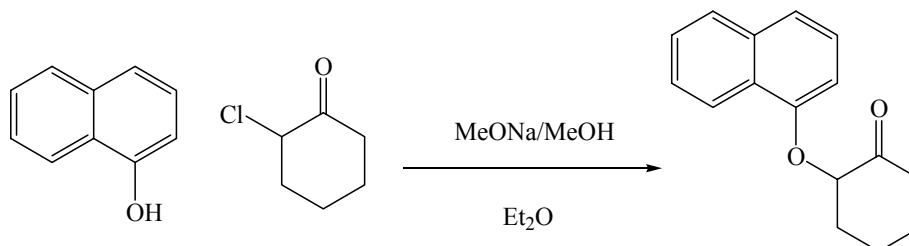
$\delta(\text{ppm}) = 18.6, 34.6, 34.9, 78.9, 80.0, 104.9, 114.3, 122.1, 122.2, 122.5, 123.7, 124.8, 125.8, 126.4, 126.9, 127.3, 127.4, 127.9, 131.7, 131.9, 150.4, 160.6, 171.6, 207.6$.

IR (ν)= 2955, 2925, 2854, 1741, 1717, 1677, 1626, 1604, 1509, 1450, 1435, 1401, 1310, 1284, 1246, 1201, 1173, 1151, 1128, 1095, 998, 852, 773 cm^{-1} .

Punt de fusió: 145°C (descomposició).

6.1.1.48. 2-(Naftalen-1-iloxi)ciclohexanona (16a)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **16** mitjançant clorociclohexanona i diferents fenols.



Una solució al 30% de MeONa en MeOH (0.24 mL, 1.3 mmol) es va addicionar a una dissolució de 1-naftol (0.2 g, 1.3 mmol) en metanol (11 mL) i la mescla es va agitar a temperatura ambient durant 40 minuts. El dissolvent es va eliminar i el cru es va redissoldre en Et₂O anhidre (24mL) i es va addicionar gota a gota una dissolució de 1-clorociclohexanona (0.15 mL, 1.3 mmol) en Et₂O anhidre (8mL). Es va agitar durant 2 hores a temperatura ambient i llavors es va rentar amb aigua, una dissolució de NaOH 3M, solució saturada de NaCl i es va assecar amb MgSO₄. El residu es va purificar mitjançant columna cromatogràfica (hexà-AcOEt, 30:1) donant 160 mg (50%) del producte desitjat.

^1H -RMN

δ (ppm) = 1.5-2.4 (m, 7H), 2.6-2.8 (m, 1H), 4.8(ddd, 1H, $J^1=8.6\text{Hz}$, $J^2=5.0\text{Hz}$, $J^3=0.8\text{Hz}$), 6.7 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 7.3 (t, 1H, $J=7.9\text{Hz}$), 7.4-7.55 (m, 3H), 7.75-7.82 (m, 1H), 8.3-8.4 (m, 1H).

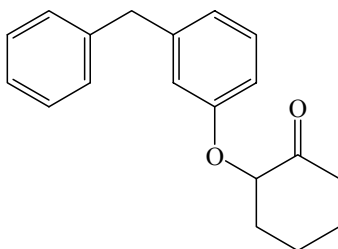
^{13}C -RMN

δ (ppm) = 22.5, 28.0, 34.6, 40.2, 81.0, 106.6, 121.0, 122.1, 125.3, 125.6, 125.8, 126.4, 127.4, 134.6, 153.2, 208.7.

IR (ν)= 2933, 2863, 1726, 1577, 1505, 1461, 1397, 1266, 1239, 1206, 1107, 1070, 791, 771 cm^{-1} .

Punt de fusió: 83-85°C.

6.1.1.49. 2-(3-Benzilfenoxi)ciclohexanona (16b)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **16a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 40%.

Dissolvent columna : hexà-AcOEt 40:1

^1H -RMN

δ (ppm) = 1.6-1.9 (m, 2H), 1.9-2.1 (m, 3H), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.5-2.6 (m, 1H), 3.9 (s, 2H), 4.6(ddd, 1H, $J^1=9.7\text{ Hz}$, $J^2=5.2\text{Hz}$, $J^3=1.1\text{Hz}$), 6.75-6.85 (m, 2H), 7.0-7.15 (m, 2H), 7.15-7.25 (m, 3H), 7.25-7.35 (m, 2H).

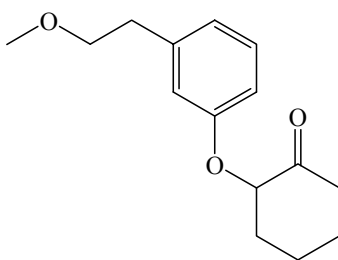
^{13}C -RMN

δ (ppm) = 22.7, 27.7, 34.4, 40.4, 40.9, 80.7, 115.4, 125.9, 128.3, 128.7, 129.7, 134.0, 141.3, 155.9, 208.3.

IR (ν)= 3004, 3029, 2936, 2863, 1729, 1610, 1512, 1455, 1433, 1241, 1091, 1072, 729, 701 cm^{-1} .

Punt de fusió: 55°C

6.1.1.50. 2-[3-(2-Metoxietil)fenoxi]ciclohexanona (16c)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **16a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 45%.

Dissolvent columna : hexà-AcOEt 16:1

¹H-RMN

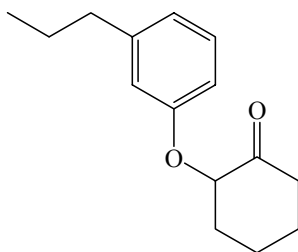
δ (ppm) = 1.6-1.8 (m, 2H), 1.9-2.1 (m, 3H), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.5-2.6 (m, 1H), 2.8 (t, 2H, $J=4.2$ Hz), 3.3 (s, 3H), 3.5 (t, 2H, $J=4.2$ Hz), 4.6(dd, 1H, $J^1=9.0$ Hz, $J^2=5.5$ Hz), 6.7 (d, 2H, $J=8.5$ Hz), 7.0 (d, 2H, $J=8.5$ Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 22.7, 27.7, 34.4, 35.2, 40.2, 58.5, 73.6, 80.7, 115.4, 129.6, 131.7, 156.0, 208.3.

IR (ν)= 3053, 2938, 2865, 1727, 1613, 1514, 1447, 1267, 1241, 1178, 1116, 1087, 1069, 836, 737, 696 cm^{-1} .

6.1.1.51. 2-(3-Propilfenoxi)ciclohexanona (16d)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **16a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 50%.

Dissolvent columna : hexà-AcOEt 40:1

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.9 (t, 3H, $J=7.3$ Hz), 1.5-1.65 (m, 2H), 1.65-1.9 (m, 2H), 1.9-2.1 (m, 3H), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.5 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 2.55-2.65 (m, 1H), 4,6(ddd, 1H, $J^1=9.3$ Hz, $J^2=5.1$ Hz, $J^3=1.2$ Hz), 6.7 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.0 (d, 2H, $J=8.7$ Hz).

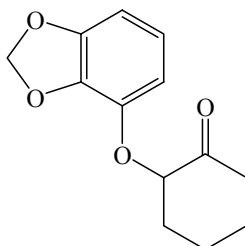
¹³C-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 13.7, 22.8, 24.7, 27.8, 34.5, 37.1, 40.5, 80.9, 115.3, 129.3, 135.7, 155.6, 208.6.$

IR (ν)= 2959, 2937, 2869, 1727, 1612, 1511, 1451, 1238, 1085, 1067, 828, 813 cm^{-1} .

Punt de fusió: 43-45°C

6.1.1.52. 2-(Benzo[1,3]dioxol-4-iloxi)ciclohexanona (16e)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **16a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 45%.

Dissolvent columna : hexà-AcOEt 20:1

$^1\text{H-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 1.5-1.8$ (m, 2H), 1.85-2.1 (m, 3H), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.5-2.6 (m, 2H), 4.5(ddd, 1H, $J^1=9.7$ Hz, $J^2=5.2$ Hz, $J^3=1.2$ Hz), 5.8 (s, 2H), 6.7 (dd, 1H, $J^1=8.7$ Hz, $J^2=2.4$ Hz), 6.4 (d, 1H, $J=2.4$ Hz), 6.6 (d, 1H, $J=8.7$ Hz).

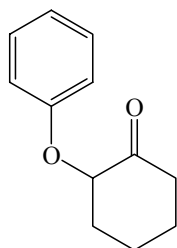
$^{13}\text{C-RMN}$

$\delta(\text{ppm}) = 22.8, 27.7, 34.4, 40.4, 81.8, 99.2, 101.1, 107.4, 107.8, 142.1, 148.1, 152.9, 208.2.$

IR (ν)= 2943, 2867, 1726, 1626, 1502, 1482, 1447, 1244, 1186, 1127, 1035, 932, 839, 815, 797 cm^{-1} .

Punt de fusió: 85-86°C.

6.1.1.53. 2-Fenoxiciclohexanona (16f)



D'acord amb el procediment descrit per la formació de **16a** s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 70%.

Dissolvent columna : hexà-AcOEt 40:1

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.6-1.9$ (m, 2H), 1.9-2.1 (m, 3H), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.55-2.7 (m, 2H), 4.6(ddd, 1H, $J^1=9.6$ Hz, $J^2=5.1$ Hz, $J^3=1.2$ Hz), 6.8-6.9 (m, 2H), 6.9 (tt, 1H, $J^1=7.3$ Hz, $J^2=1.0$ Hz), 7.2-7.3 (m, 2H).

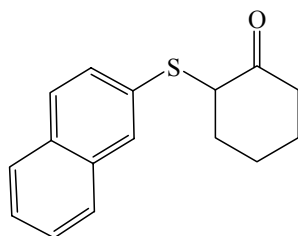
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 22.8, 27.8, 34.4, 40.5, 80.6, 115.5, 121.4, 129.4, 157.6, 208.3$.

IR (ν)= 2944, 2867, 1725, 1593, 1492, 1453, 1239, 1173, 1089, 921, 888, 847, 753, 690 cm^{-1} .

Punt de fusió: 64-65°C. (literatura 65°C)¹¹⁰

6.1.1.54. 2-(Naftalen-2-ilsulfanil)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptà (16g)



Una mescla de 2-tionaftol (0.3 g, 1.9 mmol) i NaH al 55% (82mg, 1.9 mmol) en DMF (5mL) es va agitar durant 30 minuts a temperatura ambient. A continuació es va addicionar gota a gota una solució de clorociclohexanona (0.11 mL, 0.96 mmol) en DMF anhidre (10mL). Es va agitar durant 1 hora a temperatura ambient posteriorment es va addicionar aigua, i es va extreure en Et₂O (3×30mL). Les fases orgàniques es van rentar amb aigua i amb una solució saturada de NaCl i el cru es va purificar mitjançant columna cromatogràfica (hexà-AcOEt, 35:1) conduint a 220 mg (90%) del producte desitjat.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 1.6-1.7$ (m, 1H), 1.7-2.0 (m, 3H), 2.0-2.15 (m, 1H), 2.15-2.4 (m, 2H), 2.8-3.0 (m, 1H), 4,8(ddd, 1H, $J^1=6.5$ Hz, $J^2=5.4$ Hz, $J^3=1.6$ Hz), 7.4-7.5 (m, 3H), 7.7-7.8 (m, 3H), 7.85-7.9 (m, 1H).

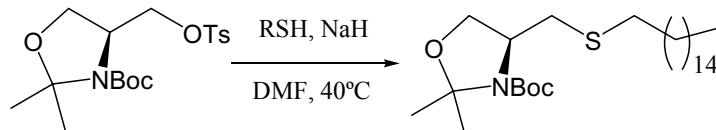
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 22.6, 27.2, 33.9, 39.1, 56.3, 126.1, 126.4, 127.3, 127.5, 128.4, 128.9, 130.5, 131.0, 132.2, 133.4, 207.4$.

IR (ν)= 3050, 2939, 2857, 1708, 1584, 1498, 1446, 1331, 1289, 1221, 1122, 1057, 939, 851, 815, 742 cm^{-1} .

Punt de fusió: 60-61°C.

6.1.2. Síntesi d'anàlegs de Substrat

6.1.2.1. (S)-4-((hexadeciltio)metil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilat de tert-butil (17)

Una solució del tosilat de l'alcohol de Garner (2 g, 5.19 mmol) en DMF es va addicionar a una solució prèviament formada per NaH (250 mg, 10.3 mmol) i 1-hexadecanetioli (1.6 mL, 10.4 mmol) en DMF. La reacció es va escalfar a 40°C durant quatre hores. A continuació es refreda la mescla de reacció a temperatura ambient, i s'addiciona una solució de HCl 1M (40 mL). La fase aquosa s'extreu amb Et₂O (3×50mL) i es renta amb aigua i solució saturada de NaCl. La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ i s'eliminen els dissolvents al buit. El cru es purifica mitjançant cromatografia flash (hexà-AcOEt 40:1) conduint a 1,96gr (80%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.85 (t, 3H, *J* = 6.7Hz), 1.2-1.3 (m, 26H), 1.44 (m, 12H), 1.54 (m, 5H), 2.45 (m, 3H), 2.84 (m, 1H), 3.87 (m, 3H).

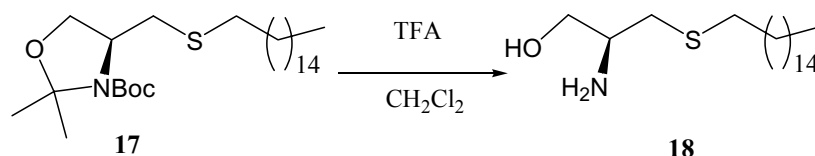
¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.0, 22.6, 24.2, 26.8, 27.5, 28.3, 28.4, 28.7, 29.1, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.9, 31.8, 32.1, 34.3, 34.4, 57.3, 57.2, 66.3, 66.4, 79.9, 80.1, 94.9, 95.1, 151.8, 152.0.

IR (film): 2925, 2848, 1701, 1641, 1388, 1255, 1179, 1091 cm⁻¹.

Punt de fusió: 36°C

[α]_D = -42.0 (c=1, CHCl₃, 20°C)

6.1.2.2. (2S)-2-amino-3-(hexadeciltio)propan-1-ol (18)

S'addiciona gota a gota àcid trifluoroacètic (5mL) sobre una solució de **17** (1 g, 2.1mmol) en 25 mL de CH₂Cl₂. S'agita 20 minuts i s'eliminen els dissolvents al buit. A continuació s'addicionen 20 mL d'una solució de NaOH 1M i s'extreu amb Et₂O

(3×30mL). La fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ i s'eliminen els dissolvents per obtenir 0.73 grams del producte desitjat com un sòlid blanc.(rendiment quantitatiu).

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.86 (t, 3H, *J*= 6.7Hz), 1.2-1.3 (s, 26H), 1.5-1.6 (m, 2H), 1,7 (sa, 3H), 2.4 (dd, 1H, *J*¹= 13.2Hz, *J*²= 8.1Hz,), 2.5 (t, 2H, *J*= 7.2Hz), 2.64 (dd, 1H, *J*¹= 13.2Hz, *J*²= 4.8Hz), 3.0 (dddd, 1H, *J*¹= 8.1Hz, *J*²= 6.6Hz, *J*³= 4.8Hz, *J*⁴= 4.3Hz), 3.39 (dd, 1H, *J*¹= 10.6Hz, *J*²= 6.6Hz,), 3.63 (dd, 1H, *J*¹= 10.6Hz, *J*²= 4.3Hz).

¹³C-RMN

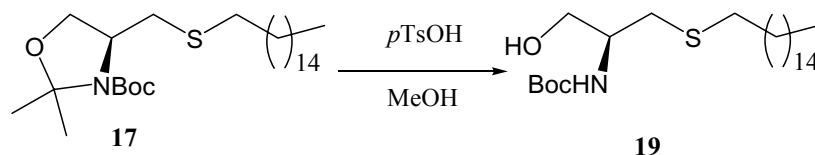
δ(ppm) = 14.1, 22.7, 28.9, 29.2, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 31.9, 32.6, 37.2, 51.8, 66.1.

IR (film): 3324, 2923, 2847, 1466, 1065 cm⁻¹.

Punt de fusió: 78-80°C

[α]_D= +0,15 (c=0.1, CHCl₃)

6.1.2.3. (S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-ilcarboxilat de tert-butil (19)



Una dissolució de *p*-TsOH (0.16 g, 0.84 mmol) i **17** (1.9 g, 4.0 mmol) en metanol s'agita vuit hores a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent, es redissolt el cru amb AcOEt i es renta amb aigua i solució saturada de NaCl. El cru es purifica mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 4:1) proporcionant 1,5 grams (87%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.86 (t, 3H, *J*= 6.8Hz), 1.2-1.3 (s, 26H), 1.44 (s, 9H), 1.5-1.6 (m, 2H), 2.5 (t, 2H, *J*=7.3Hz), 2.6 (dd, 2H, *J*¹= 6.3Hz, *J*²= 2.8Hz), 3.6-3.8 (m, 3H), 5.0 (sa, 1H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.0, 22.5, 28.2, 28.6, 28.7, 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 31.8, 32.2, 32.6, 33.4, 50.8, 61.0, 64.1, 80.0, 155.2.

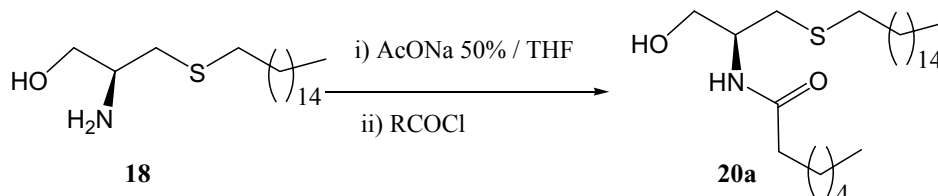
IR (film): 3412, 3348, 2926, 2855, 1712, 1694, 1501, 1462, 1367, 1170 cm⁻¹.

Punt de fusió: 48-51°C

$[\alpha]_D = +12,05$ (c=1.0 CHCl₃)

6.1.2.4. *N*-((*S*)-3-(hexadecilio)-1-hidroxiopropan-2-il)heptanamida (**20a**)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **20** amb la funcionalitat amida mitjançant reacció de Schotten-Baumann.



S'addicionen 6 mL d'una solució de NaOAc al 50% sobre una solució de **18** (0.12g, 0.36mmol) en 5 mL de THF. Deu minuts després s'addiciona gota a gota el clorur d'àcid corresponent (61 μ L, 0.39mmol). La reacció s'agita tota la nit a temperatura ambient. S'addiciona aigua (20 mL) i el producte s'extreu amb CH₂Cl₂ (3 \times 30mL), s'asseca amb MgSO₄ i es purifica mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 3:1) fent 0.15 grams (95%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.86 (t, 6H, J = 6.7Hz), 1.2-1.4 (m, 32H), 1.5-1.6 (m, 4H), 2.2 (t, 2H, J = 7.6Hz), 2.5 (t, 2H, J = 7.5Hz), 2.6 (dd, 1H, J^1 = 13.5Hz, J^2 = 6.7Hz), 2.7 (dd, 1H, J^1 = 13.5Hz, J^2 = 6.6Hz), 3.2 (sa, 1H), 3.6 (dd, 1H, J^1 = 11.1Hz, J^2 = 3.9Hz), 3.7 (dd, 1H, J^1 = 11.1Hz, J^2 = 4.9Hz), 3.9-4.1 (m, 1H), 6.1 (d, 1H, J = 7.2Hz).

¹³C-RMN

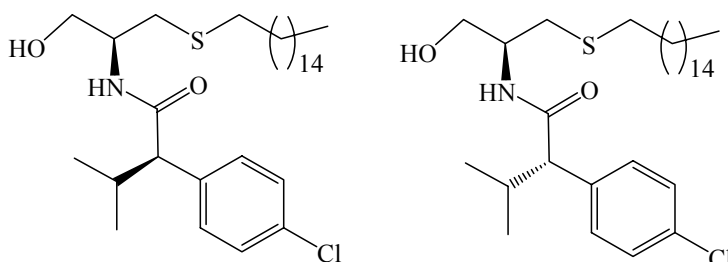
δ (ppm) = 14.0, 14.1, 22.6, 22.6, 25.6, 28.8, 28.9, 29.2, 29.3, 29.6, 31.5, 31.9, 32.5, 33.0, 36.7, 50.6, 63.9, 174.0.

IR (film): 3316, 2918, 2849, 1638, 1561, 1470, 1045, 810, 719 cm⁻¹.

Punt de fusió: 68°C

$[\alpha]_D = 17.38$ (c=1.0 CHCl₃)

6.1.2.5. (2R)-2-(4-clorofenil)-N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-3-metilbutanamida (R-20b) i (2S)-2-(4-clorofenil)-N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-3-metilbutanamida (S-20b)



Seguint el procediment descrit per la formació de **20a** s'obtenen els dos diastereòmers possibles que es purifiquen mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 7:1) proporcionant dos diastereòmers purs (A i B, 44 i 45% respectivament) com a sòlids blancs.

A :

R_f (Hexà : Acetat d'Etil 1:1) : 0.73

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.67 (d, 3H, *J* = 6.6Hz), 0.86 (t, 6H, *J* = 6.6Hz), 1.0 (d, 3H, *J* = 6.3Hz), 1.2-1.3 (m, 26H), 1.5 (quint, 2H, *J* = 7.2Hz), 2.2-2.4 (m, 1H), 2.5 (t, 2H, *J* = 7.3Hz), 2.6 (dd, 1H, *J*¹ = 13.5Hz, *J*² = 6.6Hz), 2.7 (dd, 1H, *J*¹ = 13.5Hz, *J*² = 6.8Hz), 2.8 (d, 1H, *J* = 10.4Hz), 3.5 (sa, 1H), 3.5 (dd, 1H, *J*¹ = 11.2Hz, *J*² = 4.0Hz), 3.7 (dd, 1H, *J*¹ = 11.2Hz, *J*² = 4.3Hz), 3.9-4.0 (m, 1H), 6.4 (d, *J* = 7.4Hz), 7.2 (m, 4H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.0, 20.2, 21.4, 22.6, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.5, 29.5, 29.6, 31.7, 31.8, 32.4, 32.9, 50.6, 61.2, 63.2, 128.5, 129.5, 132.9, 137.6, 173.7.

IR (film): 3291, 2954, 2917, 2851, 1643, 1543, 1467, 1183, 1041, 809, 726 cm⁻¹.

Punt de fusió. 78-82°C.

[α]_D = 6.78 (c=1.0 CHCl₃)

B:

R_f (Hexà : Acetat d'Etil 1:1) : 0.58

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.67 (d, 3H, *J* = 6.9Hz), 0.86 (t, 6H, *J* = 6.7Hz), 1.0 (d, 3H, *J* = 6.6Hz), 1.2-1.3 (m, 26H), 1.4 (quint, 2H, *J* = 7.2Hz), 2.2-2.4 (m, 3H), 2.5 (dd, 1H, *J*¹ = 13.8Hz, *J*² =

6.6Hz), 2.6 (dd, 1H, $J^1 = 13.8\text{Hz}$, $J^2 = 6.6\text{Hz}$), 2.8 (d, 1H, $J = 10.2\text{Hz}$), 3.5 (sa, 1H), 3.7 (dd, 1H, $J^1 = 11.1\text{Hz}$, $J^2 = 3.9\text{Hz}$), 3.8 (dd, 1H, $J^1 = 11.1\text{Hz}$, $J^2 = 4.9\text{Hz}$), 3.9-4.0 (m, 1H), 6.2 (d, $J = 6.9\text{Hz}$), 7.2 (sa, 4H).

^{13}C -RMN

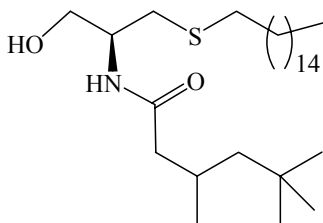
$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 20.2, 21.5, 22.7, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.7, 31.5, 31.9, 32.4, 32.8, 50.6, 61.3, 64.3, 128.6, 129.5, 133.0, 137.6, 173.8.$

IR (film): 3287, 2955, 2919, 2850, 1644, 1544, 1492, 1466, 1093, 1037, 814 cm^{-1} .

Punt de fusió 82-84°C.

$[\alpha]_D = 33.55$ ($c=1.0$ CHCl_3)

6.1.2.6. *N*-((*S*)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-3,5,5-trimetilhexanamida (**20c**)



Seguint el procediment descrit per la formació de **20a** i purificant el producte mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 3:1) s'obté un sòlid blanc (mescla de dos diastereòmers 95%).

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.80$ (t, 6H, $J = 6.9\text{Hz}$), 0.84 (s, 18H), 0.90 (d, 6H, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.0 (dd, 2H, $J^1 = 6.6\text{Hz}$, $J^2 = 3.0\text{Hz}$), 1.1 (dd, 2H, $J^1 = 6.6\text{Hz}$, $J^2 = 3.0\text{Hz}$), 1.15-1.25 (m, 52H), 1.5 (quint, 4H, $J = 7.4\text{Hz}$), 1.9 (t, 1H, $J = 8.8\text{Hz}$), 1.9 (t, 1H, $J = 8.7\text{Hz}$), 1.95-2.0 (m, 2H), 2.1 (dd, 1H, $J^1 = 10.2\text{Hz}$, $J^2 = 5.8\text{Hz}$), 2.2 (dd, 1H, $J^1 = 10.5\text{Hz}$, $J^2 = 5.8\text{Hz}$), 2.5 (t, 4H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.6 (dd, 2H, $J^1 = 13.6\text{Hz}$, $J^2 = 6.4\text{Hz}$), 3.8 (dd, 1H, $J^1 = 13.5\text{Hz}$, $J^2 = 7.0\text{Hz}$), 2.7 (dd, 1H, $J^1 = 13.5\text{Hz}$, $J^2 = 6.9\text{Hz}$), 3.55-3.6 (m, 2H), 3.7-3.75 (m, 2H), 3.9-4.0 (m, 4H), 6.3 (d, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$), 6.4 (d, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0, 22.4, 22.5, 22.5, 27.3, 27.3, 28.7, 29.1, 29.2, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.5, 29.6, 29.9, 30.9, 30.9, 31.8, 32.4, 32.4, 32.8, 32.9, 46.5, 50.5, 50.5, 50.6, 50.6, 63.2, 63.2, 173.1.$

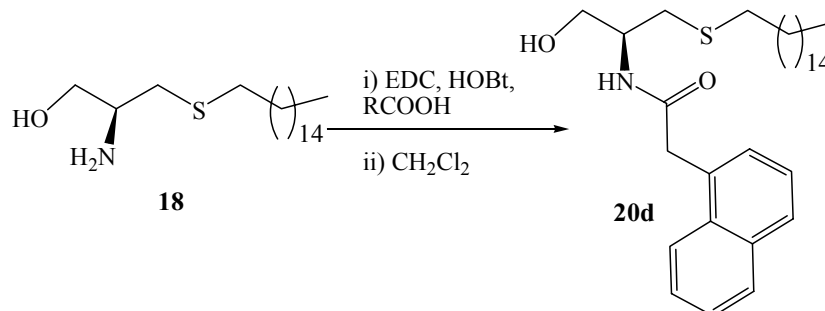
IR (film): 3500, 2920, 2857, 1645, 1544, 1460, 1368, 1250, 1040 cm^{-1} .

Punt de fusió: 46°C

$[\alpha]_D = +20.8$ (c=0.5)

6.1.2.7. *N*-((*S*)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-2-(naftalen-1-il)acetamida (**20d**)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **20** amb la funcionalitat amida mitjançant reacció amb agent d'acoblament EDC.



Una dissolució d'àcid naftilacètic (0.17 g, 0.9 mmol), EDC (0.19 g, 1.0 mmol) i HOBT (0.12 g, 0.9 mmol) en CH₂Cl₂ s'agita durant 15 minuts, llavors aquesta solució s'addiciona sobre una dissolució del producte **18** (0.3 g, 0.9 mmol) en CH₂Cl₂. La reacció s'agita durant vuit hores a temperatura ambient, a continuació s'addiciona aigua i s'extreu amb CH₂Cl₂ (3×40mL), es renta amb una solució saturada de NaCl, s'asseca amb MgSO₄ i es purifica mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 4:1) conduint a 0,42 grams (90%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.86 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.2-1.4 (m, 28H), 2.1 (dt, 1H, $J^1 = 12.5$ Hz, $J^2 = 7.2$ Hz), 2.2 (dt, 1H, $J^1 = 12.5$ Hz, $J^2 = 7.2$ Hz), 2.4 (dd, 1H, $J^1 = 13.5$ Hz, $J^2 = 6.5$ Hz), 2.5 (dd, 1H, $J^1 = 13.5$ Hz, $J^2 = 6.5$ Hz), 3.1 (sa, 1H), 3.5 (dd, 1H, $J^1 = 11.0$ Hz, $J^2 = 3.7$ Hz), 3.7 (dd, 1H, $J^1 = 11.0$ Hz, $J^2 = 5.0$ Hz), 3.85-3.95 (m, 1H), 4.0 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 4.1 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz), 6.1 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.35-7.45(m, 2H), 7.45-7.55(m, 2H), 7.8 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.9 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.0 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz).

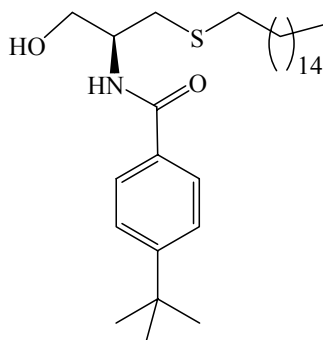
¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.1, 22.7, 28.7, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 32.1, 32.7, 41.7, 50.9, 64.0, 123.6, 125.6, 126.1, 126.7, 128.3, 128.5, 128.8, 130.7, 132.0, 133.9, 171.9.

IR (film): 3282, 2918, 2850, 1652, 1541, 1467, 1252, 1230, 1037, 810 cm⁻¹.

Punt de fusió: 83-85°C

$[\alpha]_D = 37.87$ (c=1.0 CHCl₃)

6.1.2.8. 4-tert-butil-N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)benzamida**(20e)**

Seguint el procediment descrit per la formació de **20d** i purificant el producte mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 6:1) s'obté un sòlid blanc (76%).

¹H-RMN

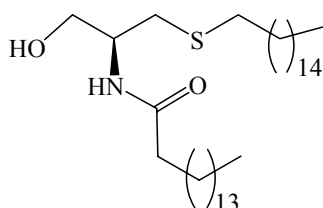
δ (ppm) = 0.84 (t, 3H, J = 6.9Hz), 1.2-1.25 (m, 26H), 1.26 (s, 9H), 1.5 (quint, 2H, J =7.4Hz), 2.5 (t, 2H, J = 7.4Hz), 2.8 (d, 1H, J = 6.8Hz), 3.7 (dd, 1H, J^1 = 11.2Hz, J^2 = 4.0Hz), 3.8 (dd, 1H, J^1 = 11.2Hz, J^2 = 4.5Hz), 4.15-4.25 (m, 1H), 7.0 (d, 1H, J = 7.6Hz), 7.3 (d, 2H, J = 8.5Hz), 7.7 (d, 2H, J = 8.5Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.0, 22.6, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 31.0, 31.8, 32.5, 32.9, 34.8, 51.0, 63.3, 125.3, 126.8, 131.0, 155.0, 167.8.

IR (film): 3298, 2960, 2920, 2857, 1645, 1544, 1038 cm^{-1} .

Punt de fusió: 48-49°C

 $[\alpha]_D^{25} = +14.2$ (c=0.5)6.1.2.9. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)palmitamida (20f)

Seguint el procediment descrit per la formació de **20d** i purificant el producte mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 3:1) s'obté un sòlid blanc (60%).

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.85 (t, 3H, J = 6.9Hz), 1.2-1.3 (m, 52H), 1.5 (quint, 2H, J =7.5Hz), 1.5 (quint, 2H, J =7.0Hz), 2.2 (t, 2H, J = 7.6Hz), 2.5 (t, 2H, J = 7.4Hz), 2.6 (dd, 1H, J^1 = 13.6Hz, J^2 =

6.8Hz), 2.7 (dd, 1H, $J^1 = 13.6\text{Hz}$, $J^2 = 6.4\text{Hz}$), 3.0 (sa, 1H), 3.7 (dd, 1H, $J^1 = 11.1\text{Hz}$, $J^2 = 3.5\text{Hz}$), 3.8 (dd, 1H, $J^1 = 11.1\text{Hz}$, $J^2 = 4.9\text{Hz}$), 3.8-4.0 (m, 1H), 6.0 (d, 1H, $J = 6.7\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 25.7, 28.8, 29.2, 29.2, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 31.9, 32.5, 33.1, 36.8, 50.8, 64.5, 174.0$.

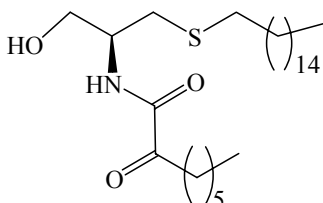
IR (film): 3311, 2920, 2857, 1637, 1536, 1462, 1075, 714 cm^{-1} .

Punt de fusió: 89-90°C.

$[\alpha]_{\text{D}} = +0.12$ (c=0.1, CHCl_3)

6.1.2.10. *N*-(*S*)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)-2-oxooctanamida

(20g)



Seguint el procediment descrit per la formació de **20d** i purificant el producte mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 36:1) s'obté un sòlid blanc (50%).

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.84$ (t, 3H, $J = 6.9\text{Hz}$), 0.84 (t, 3H, $J = 6.9\text{Hz}$), 1.2-1.3 (m, 32H), 1.5 (quint, 4H, $J = 7.2\text{Hz}$), 2.5 (t, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.7 (dd, 1H, $J^1 = 13.6\text{Hz}$, $J^2 = 6.4\text{Hz}$), 2.8 (dd, 1H, $J^1 = 13.6\text{Hz}$, $J^2 = 6.9\text{Hz}$), 2.9 (t, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 3.7 (dd, 1H, $J^1 = 11.3\text{Hz}$, $J^2 = 4.1\text{Hz}$), 3.8 (dd, 1H, $J^1 = 11.3\text{Hz}$, $J^2 = 4.7\text{Hz}$), 4.0 (m, 1H), 7.4 (d, 1H, $J = 8.2\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 14.1, 22.4, 22.6, 23.1, 28.7, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.5, 31.9, 32.7, 32.7, 36.8, 50.8, 63.0, 160.3, 198.8$.

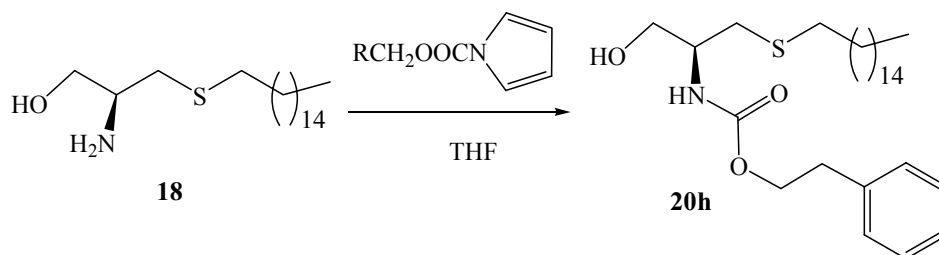
IR (film): 3315, 2925, 2853, 2375, 1717, 1656, 1521, 1466, 1033 cm^{-1} .

Punt de fusió 65°C.

$[\alpha]_{\text{D}} = +9.0$ (c=1.0 CHCl_3)

6.1.2.11. *S*)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-ilcarboxilat de fenetil (20h)

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **20** amb la funcionalitat carbamat.



S'addicionen 5 mg de DMAP (catalític) sobre una solució del carbamat intermedi (preparat amb carbonil diimidazol i l'alcohol corresponent en THF) (58 mg, 0.27 mmol) i **18** (89 mg, 0.27 mmol) en 5 mL de THF i s'agita vuit hores a temperatura ambient. El dissolvent s'elimina i el producte es redissolt en AcOEt, es renta amb una solució de HCl 1N, aigua i solució saturada de NaCl, s'asseca amb MgSO₄ i després i es purifica mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 4:1) conduint a 105 mil·ligrams d'un sòlid blanc (82%).

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7Hz), 1.2-1.3 (m, 26H), 1.6 (quint, 2H, *J* = 7.5Hz), 2.5 (t, 2H, *J* = 7.2Hz), 2.70 (da, 2H, *J* = 5.4Hz), 2.9 (t, 2H, *J* = 7.0Hz), 3.6-3.8 (m, 3H), 4.3 (t, 2H, *J* = 7.0Hz), 5.2 (d, 1H, *J* = 7.2Hz), 7.2-7.4 (m, 5H).

¹³C-RMN

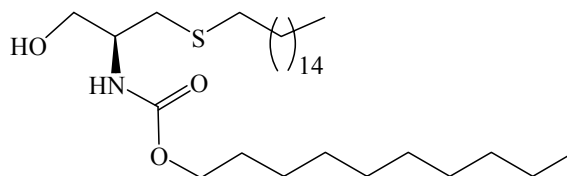
δ(ppm) = 14.1, 22.7, 28.8, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 32.7, 33.4, 35.4, 52.0, 63.8, 65.5, 126.5, 128.4, 128.9, 137.8, 156.5

IR (film): 3517, 3309, 2954, 2918, 2850, 1676, 1544, 1467, 1255, 1104, 1015, 695 cm⁻¹.

Punt de fusió 73-76°C.

[α]_D = 12.22 (c=1.0, CHCl₃)

6.1.2.12. (S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-ilcarboxilat de decil (20i)



Seguint el procediment descrit per la formació de **20h** i purificant el producte mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 4:1) s'obté un sòlid blanc (75%).

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.85 (t, 6H, *J* = 6.9Hz), 1.2-1.3 (m, 40H), 1.6 (quint, 4H, *J* = 7.5Hz), 2.5 (t, 2H, *J* = 7.5Hz), 2.70 (da, 2H, *J* = 5.9Hz), 3.6-3.8 (m, 3H), 4.0 (t, 2H, *J* = 6.7Hz), 5.2 (d, 1H, *J* = 7.0Hz).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.0, 22.6, 25.8, 28.7, 28.8, 28.8, 28.9, 29.0, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 31.8, 31.8, 32.6, 33.3, 52.0, 63.9, 65.4, 156.8.

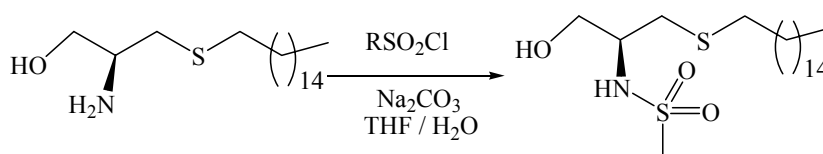
IR (film): 3443, 3312, 2959, 2925, 2854, 1726, 1698, 1533, 1465, 1256, 1065, 1015, 717 cm^{-1} .

Punt de fusió 54-56°C

$[\alpha]_D = -6.77$ (c=1.0 CHCl_3)

6.1.2.13. N-((S)-3-(hexadeciltio)-1-hidroxiopropan-2-il)metilsulfonamida

(20j)



Sobre una solució de **18** (0.25g, 0.75 mmol), i Na_2CO_3 (0.16g, 1.5 mmol) en 12 mL de THF i 4 mL d'aigua s'addiciona $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ (0.064mL, 0.82 mmol), i la reacció s'agita tota la nit a temperatura ambient. L'endemà s'elimina el THF, s'addiciona una solució saturada de NaCl i el producte s'extreu en CH_2Cl_2 , s'asseca amb MgSO_4 i es purifica mitjançant cromatografia amb sílice flash (hexà-AcOEt 4:1) conduint a 263 mg (81%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.85 (t, 3H, $J = 6.9\text{Hz}$), 1.2-1.3 (m, 26H), 1.6 (quint, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.5 (t, 1H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.7 (d, 2H, $J = 6.5\text{Hz}$), 3.0 (s, 3H), 3.5-3.6 (m, 1H), 3.7 (dd, 1H, $J^1 = 11.2\text{Hz}$, $J^2 = 5.1\text{Hz}$), 3.8 (dd, 1H, $J^1 = 11.2\text{Hz}$, $J^2 = 4.2\text{Hz}$), 5.1 (d, 1H, $J = 7.7\text{Hz}$).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.0, 22.7, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 32.9, 33.0, 34.4, 34.5, 41.6, 55.2, 64.2.

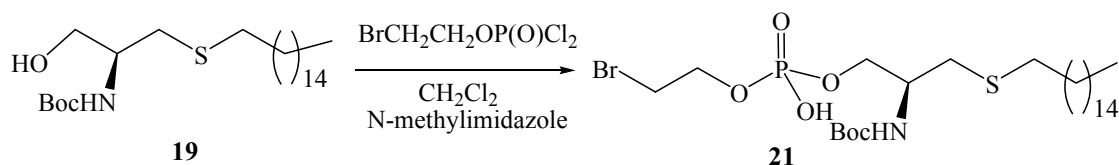
IR (film): 3493, 3235, 2919, 2845, 1457, 1297, 1142, 1073 cm^{-1} .

Punt de fusió: 87°C.

$[\alpha]_D = +0.12$ (c=1.0, CHCl_3)

6.1.2.14. 1-(hexadeciltio)-2-(tert-butiloxicarbonilaminodeoxi)-3-[(2'-bromoetil)-fosfo]-sn-glicerol (21)

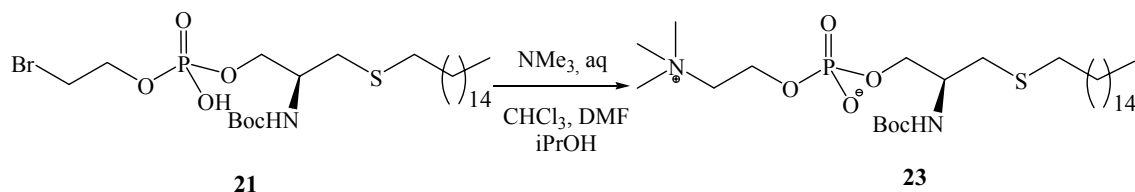
Exemple del procediment experimental de formació dels compostos 21 i 22. Introducció del grup fosfat.



Es dissolt **19** (0.25g, 0.56mmol) i diclorofosfat (0.2 g, 0.8 mmol) en 15 mL de CH_2Cl_2 i s'agita 5 minuts, després s'addiciona *N*-metilimidazol gota a gota (70 μL , 0.88 mmol) i s'agita vuit a hores a temperatura ambient. S'addicionen 2 mL d'aigua, i s'agita durant tres hores més. A continuació s'addicionen 10 mL d'una solució HCl 1M i 10 mL d'una solució saturada de NaCl i s'extreu en CHCl_3 :MeOH 2:1 (3 \times 40mL), les fases orgàniques es renten amb solució saturada de NaCl, s'assequen amb MgSO_4 i es filtra. El cru sense purificar s'utilitza en les següents reaccions.

6.1.2.15. 1-(hexadeciltio)-2-(tert-butiloxicarbonilaminodeoxi)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**23**)

Exemple del procediment experimental d'introducció del grup colina.



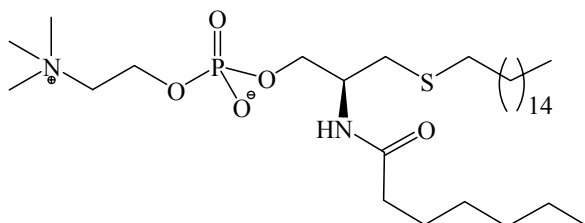
El compost **21** es dissolt en CHCl_3 :DMF:iPrOH (3:5:5 mL) en un tub de pressió i s'addicionen 4 mL de NMe_3 (40 % en solució aquosa), la reacció s'agita a 80°C durant 48 hores. La solució es refreda i s'addiciona AgCO_3 (4.8 mg), es torna a agitar la reacció a 80°C tres hores més, llavors el cru es refreda, es filtra s'elimina el dissolvent. El cru es purifica mitjançant cromatografia amb sílice flash (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2 :MeOH:H₂O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH_2Cl_2 , es filtra per obtenir el producte desitjat com a un sòlid cerós (40% després de les dues etapes).

¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.8$ (t, 3H, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.0-1.3 (m, 26H), 1.35 (s, 9H), 1.5-1.6 (m, 2H), 2.4-2.5 (m, 2H), 2.55-2.7 (m, 2H), 3.35(s, 9H), 3.5-3.8 (m, 2H), 3.8-4.1 (m, 2H), 4.1-4.6 (m, 3H), 6.0-6.5 (m, 1H).

¹³C-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 13.9, 22.5, 28.4, 28.8, 29.1, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 31.7, 32.5, 33.0, 50.8, 54.1, 55.4, 58.0, 59.3, 65.3, 65.9, 78.9, 155.5.$

³¹P-RMN $\delta(\text{ppm}) = -1.96$ IR (KBr): 3420, 2924, 2851, 1703, 1535, 1467, 1244, 1088, 962, 772, 501 cm^{-1} .ESI-MS: $m/z = 597 [M^+ + 1]$, $597 [M^+ + 23]$ 6.1.2.16. 1-(hexadeciltio)-2-(heptanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24a)

Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 21%.

¹H-RMN

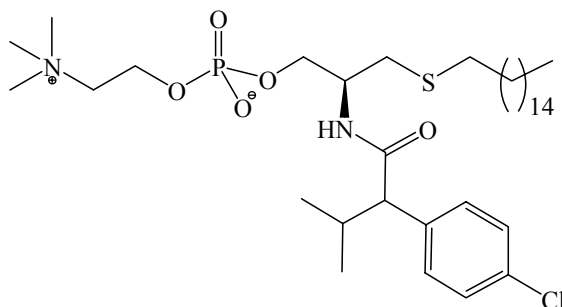
$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 6H, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.1-1.3 (m, 32H), 1.5-1.6 (m, 4H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.4-2.6 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 3.3(s, 9H), 3.5-4.5 (m, 7H), 5.3 (sa, 1H).

¹³C-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.6, 22.7, 25.8, 29.0, 29.1, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.4, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8, 31.7, 31.9, 32.6, 32.6, 32.7, 36.5, 49.4, 54.4, 59.4, 65.1, 66.3, 173.5.$

³¹P-RMN $\delta(\text{ppm}) = +0.10$

IR (KBr): 3406, 2929, 2859, 1648, 1545, 1468, 1242, 1094, 1043, 965, 927, 830, 772, 714, 502 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 609 [M^+ + 1]$, $631 [M^+ + 23]$ 6.1.2.17. 1-(hexadeciltio)-2-(2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24b)

Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 17%.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.85 (t, 3H, J = 6.8Hz), 1.0 (d, 6H, J = 6.0Hz), 1.0-1.3 (m, 26H), 1.6 (quint, 2H, J =7.4Hz), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.4-2.6 (m, 3H), 2.85(s, 9H), 3.0-4.5 (m, 8H), 5.8 (sa, 1H), 7.2-7.5 (m, 4H).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 13.9, 20.2, 21.2, 22.5, 28.7, 28.7, 29.1, 29.1, 29.2, 29.3, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 31.7, 32.4, 44.7, 51.6, 54.1, 57.9, 59.9, 65.4, 70.4, 128.1, 130.1, 132.4, 138.8, 173.7.

³¹P-RMN

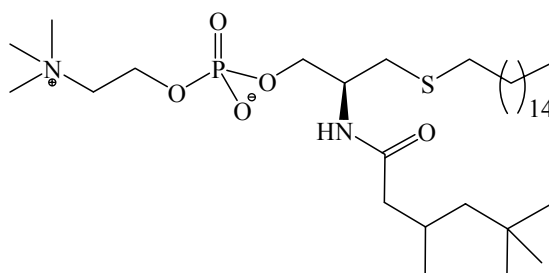
δ (ppm) = - 1.67

IR (KBr): 3432, 3020, 2962, 2923, 2852, 1648, 1474, 1255, 1113, 978, 894, 611 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z = 691 [$M^+ + 1$]

$[\alpha]_D = +0,04$ (c=0.2, CHCl_3 :MeOH 4:1)

6.1.2.18. 1-(hexadeciltio)-2-(3,5,5-trimetilhexanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**24c**)



Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 13%.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.8-0.9 (m, 15H), 1.2-1.3 (m, 26H), 1.5 (quint, 2H, J =6.6Hz), 1.9-2.1 (m, 1H), 2.4-2.55 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 3.4(s, 9H), 3.2-4.5 (m, 7H), 5.7 (sa, 1H).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.1, 22.4, 22.7, 22.8, 27.2, 27.4, 29.0, 29.0, 29.1, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 30.1, 30.1, 31.0, 31.1, 31.9, 32.7, 46.3, 49.5, 50.5, 54.5, 55.8, 58.7, 65.5, 66.3, 70.5, 172.7.

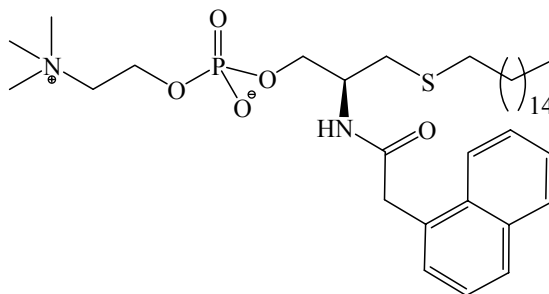
³¹P-RMN

δ (ppm) = -1.70

IR (KBr): 3335, 2923, 2859, 1628, 1563, 1512, 1403, 1306, 1120, 894, 791 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z = 637 [$M^+ + 1$]

6.1.2.19. 1-(hexadeciltio)-2-[(naftalen-8-il)acetoilamino]-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24d)



Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 12%.

^1H -RMN

δ (ppm) = 0.85 (t, 3H, J = 6.5Hz), 1.0-1.3 (m, 26H), 1.5-1.6 (m, 2H), 2.2-2.4 (m, 2H), 2.5-2.7 (m, 2H), 3.0(s, 9H), 3.3-4.3 (m, 9H), 5.2-5.4 (m, 1H), 7.3-7.6 (m, 3H), 7.6 (d, 1H, J = 7.5Hz), 7.7 (d, 1H, J = 7.5Hz), 7.9-8.0 (m, 1H), 8.0 (d, 1H, J = 7.0Hz).

^{13}C -RMN

δ (ppm) = 14.1, 22.7, 28.4, 28.9, 29.1, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 31.7, 32.5, 33.0, 54.2, 54.1, 55.4, 58.0, 59.3, 65.3, 65.9, 123.6, 125.6, 126.1, 126.7, 128.3, 128.5, 128.8, 130.7, 132.0, 133.9, 155.5.

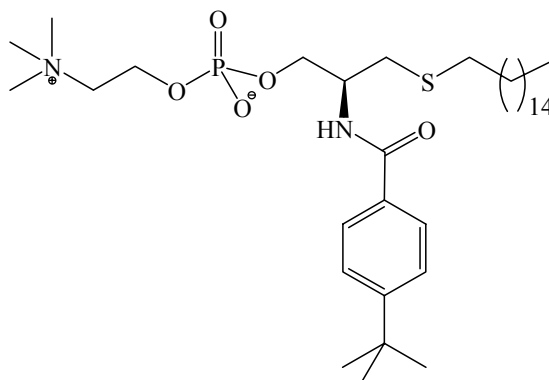
^{31}P -RMN

δ (ppm) = +2.47

IR (KBr): 3387, 2923, 2859, 1648, 1468, 1171, 1114, 1088, 598 cm^{-1} .

ESI-MS: m/z = 665 [$\text{M}^+ + 1$]

6.1.2.20. 1-(hexadeciltio)-2-(4-*tert*-butilbenzoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24e)



Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 6%.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.84$ (t, 3H, $J = 6.9\text{Hz}$), 1.0-1.3 (m, 35H), 1.5-1.6 (m, 2H), 2.45-2.55 (m, 2H), 2.8(s, 11H), 3.0-3.1 (m, 2H), 3.5-4.5 (m, 5H), 7.3-7.4 (m, 2H), 7.8-7.9 (m, 2H).

 ^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 29.0, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.2, 31.9, 32.7, 34.9, 45.0, 50.4, 54.3, 65.3, 65.9, 77.2, 125.4, 127.5, 131.1, 155.0, 167.1.$

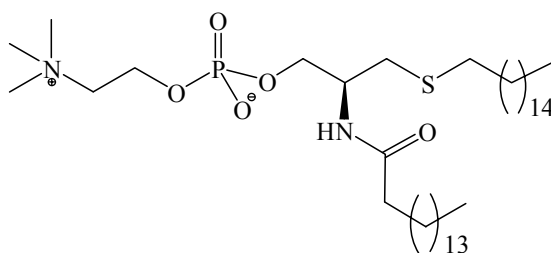
 ^{31}P -RMN

$\delta(\text{ppm}) = -2.05$

IR (KBr): 3419, 2962, 2923, 2852, 1642, 1545, 1468, 1255, 1094, 1049, 972, 792 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 657$ [$\text{M}^+ + 1$]

$[\alpha]_{\text{D}} = +0.15$ ($c = 0.2$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 4:1)

6.1.2.21. 1-(hexadeciltio)-2-(hexadecilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24f)

Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 11%.

 ^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.84$ (t, 6H, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.1-1.3 (m, 50H), 1.5-1.6 (m, 4H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.4-2.55 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 2.8(s, 9H), 3.2-4.5 (m, 7H), 5.2 (sa, 1H).

 ^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 25.8, 29.0, 29.3, 29.4, 29.6, 29.6, 29.7, 29.9, 29.9, 29.9, 31.9, 32.6, 36.6, 45.0, 49.2, 54.6, 59.7, 66.1, 70.5, 173.5.$

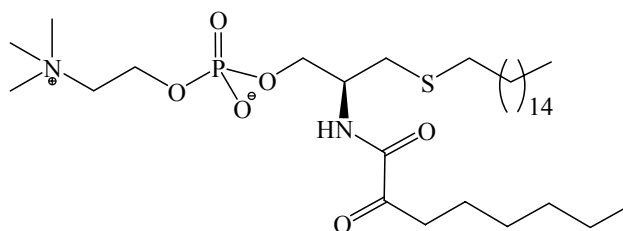
 ^{31}P -RMN

$\delta(\text{ppm}) = +0.80$

IR (KBr): 3303, 2961, 2919, 2852, 2623, 2483, 1643, 1544, 1471, 1233, 1088, 1056, 968, 838 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 735$ [$\text{M}^+ + 1$], 757 [$\text{M}^+ + 23$]

$[\alpha]_{\text{D}} = +0.09$ ($c = 0.1$, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 4:1)

6.1.2.22. 1-(hexadeciltio)-2-(2-oxooctanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina**(24g)**

Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 13%.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.8 (t, 6H, $J= 6.9\text{Hz}$), 1.1-1.3 (m, 26H), 1.4-1.55 (m, 4H), 2.4-2.5 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 2.75-2.85 (m, 2H), 3.3(s, 9H), 3.7-3.85 (m, 2H), 3.85-4.0 (m, 2H), 4.1 (td, 1H, $J^1= 11.6\text{Hz}$, $J^2= 3.4\text{Hz}$), 4.2-4.3 (m, 2H), 8.7 (d, 1H, $J= 7.5\text{Hz}$).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 13.9, 14.0, 22.3, 22.5, 23.0, 28.6, 28.8, 29.1, 29.2, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 31.4, 31.7, 31.8, 32.4, 36.9, 43.0, 50.1, 54.2, 59.3, 64.0, 66.2, 160.5, 199.1.

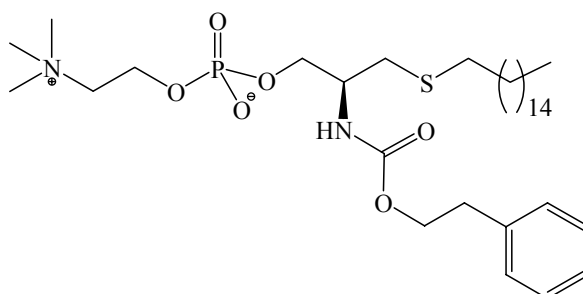
³¹P-RMN

δ (ppm) = +0.59

IR (KBr): 3361, 2923, 2852, 1718, 1674, 1525, 1461, 1378, 1242, 1088, 1049, 959, 920, 830, 759, 495 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z= 637 [M^+ + 1]$

$[\alpha]_D= +0,05$ (c=0.2, CHCl_3 :MeOH 4:1)

6.1.2.23. 1-(hexadeciltio)-2-(2-feniletiloxicarbonilaminodeoxi)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**24h**)

Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 65%.

¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.86$ (t, 3H, $J = 6.6\text{Hz}$), 1.1-1.3 (m, 26H), 1.4-1.6 (m, 2H), 2.5 (t, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 2.6-2.75 (m, 2H), 2.9 (t, 2H, $J = 6.7\text{Hz}$), 3.3 (s, 9H), 3.3-3.4 (m, 2H), 3.4-3.5 (m, 1H), 3.7-3.8 (m, 2H), 3.9-4.15 (m, 2H), 4.2-4.3 (m, 2H), 6.7-6.8 (m, 1H), 7.1-7.3 (m, 5H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.6, 28.9, 29.3, 29.6, 29.7, 29.8, 31.9, 32.6, 35.5, 39.5, 51.6, 54.2, 55.5, 59.2, 65.1, 66.1, 126.4, 128.5, 128.9, 138.1, 156.3.$

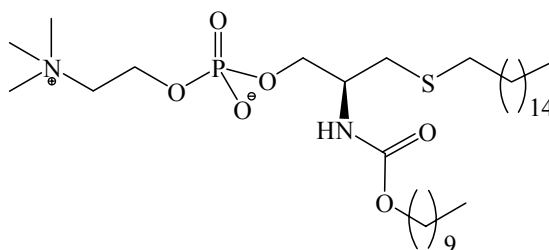
^{31}P -RMN

$\delta(\text{ppm}) = -0.27$

IR (KBr): 3419, 3294, 2923, 2852, 1706, 1532, 1494, 1462, 1410, 1339, 1230, 1094, 1049, 953, 920, 837, 772, 740, 695, 567, 489 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 645$ [$\text{M}^+ + 1$]

6.1.2.24. 1-(hexadeciltio)-2-(deciloxicarbonilaminodeoxi)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24i)



Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 16%.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 6H, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.1-1.3 (m, 40H), 1.5-1.6 (m, 4H), 2.4-2.55 (m, 2H), 2.6-2.75 (m, 2H), 3.35 (s, 9H), 3.5-3.7 (m, 3H), 3.8-4.1 (m, 4H), 4.2-4.5 (m, 2H), 6.4 (sa, 1H).

^{13}C -RMN

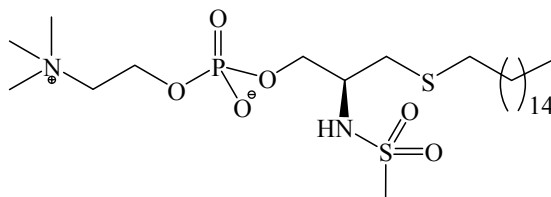
$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 25.8, 29.4, 29.7, 29.7, 31.9, 32.7, 33.1, 54.5, 55.8, 58.4, 59.5, 65.0, 65.4, 66.2, 156.6.$

^{31}P -RMN

$\delta(\text{ppm}) = -1.18$

IR (KBr): 3419, 2923, 2852, 1706, 1532, 1468, 1242, 1088, 959, 837, 772, 502 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 681$ [$\text{M}^+ + 1$]

6.1.2.25. 1-(hexadeciltio)-2-(metilsulfonamido)-*sn*-glicero-3-fosfocolina**(24j)**

Seguint el procediment descrit per la introducció del grup fosfat (**21**) i del grup colina (**23**) s'obté el producte desitjat amb un rendiment 46%.

¹H-RMN

δ (ppm) = 0.83 (t, 3H, $J=6.9$ Hz), 1.1-1.25 (m, 24H), 1.3 (quint, 2H, $J=7.0$ Hz), 1.5 (quint, 2H, $J=7.2$ Hz), 2.5 (t, 2H, $J=7.2$ Hz), 2.65-2.75 (m, 2H), 3.0 (sa, 3H), 3.3 (s, 9H), 3.5-3.7 (m, 3H), 3.7-3.9 (m, 1H), 3.9-4.0 (m, 1H), 4.2-4.4 (m, 1H), 7.9 (sa, 1H).

¹³C-RMN

δ (ppm) = 14.1, 22.6, 29.0, 29.3, 29.6, 29.7, 31.9, 32.6, 34.1, 34.3, 41.7, 54.3, 54.7, 55.6, 58.4, 59.5, 61.5, 66.1, 66.5, 70.5, 72.5.

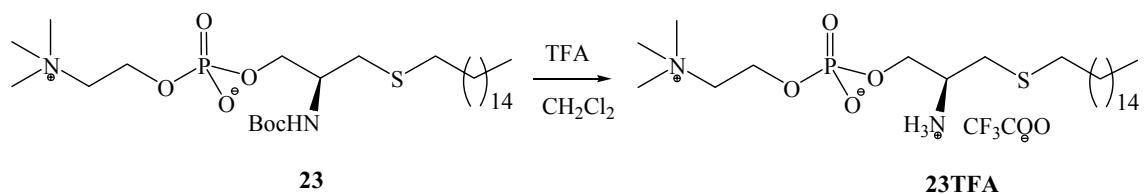
³¹P-RMN

δ (ppm) = -1.06

IR (KBr): 3438, 2923, 2852, 1487, 1461, 1313, 1236, 1145, 1087, 1049, 952, 868, 772, 520 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z=575$ [$M^+ + 1$]

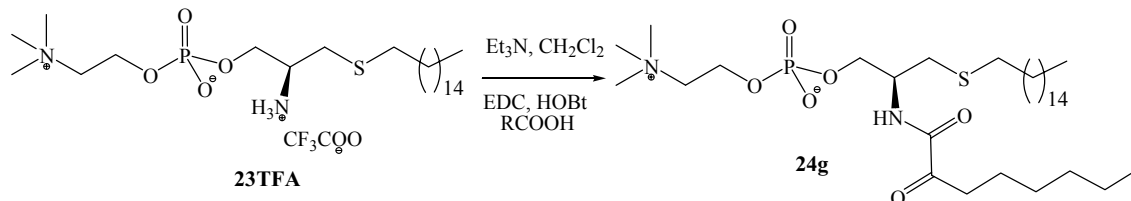
$[\alpha]_D=+0,05$ (c=0.2, CHCl_3 :MeOH 4:1)

6.1.2.26. Desprotecció de 1-(hexadeciltio)-2-(tert-butiloxicarbonilamino)-deoxi)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**23TFA**)

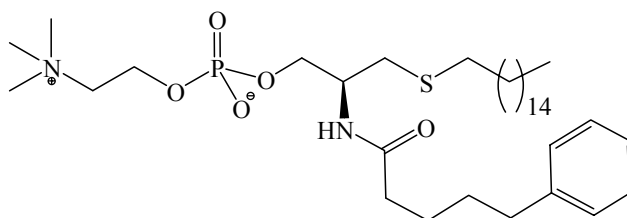
El producte **23** (0.25g, 0,42 mmol) es dissolt en 15 mL de CH_2Cl_2 , llavors s'addiciona TFA (1 mL) i la reacció s'agita 20 minuts. Llavors s'eliminen els dissolvents i el producte s'utilitza per a la següent reacció sense necessitat de purificar el cru. El rendiment mostrat aquestes reaccions correspon al rendiment en les reaccions de desprotecció i de funcionalitació posterior.

6.1.2.27. 1-(hexadeciltio)-2-(2-oxooctanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina**(24g)**

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **24a** amb funcionalitat amida partir de **23TFA** i l'agent d'acoblament EDC.



S'agita durant 15 minuts una solució de EDC (0.16 g, 0.84 mmol), HOBt (0.11 g, 0.81 mmol) i l'àcid corresponent (0.17 g, 1.0 mmol) en 15 mL de CH₂Cl₂, llavors s'addiciona sobre una solució de **23TFA** (cru de l'última reacció) i Et₃N (0.06 mL, 0.4 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂, i s'agita 8 hores a temperatura ambient. A continuació s'elimina el dissolvent al buit i el producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica en sílice flash (CH₂Cl₂- CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH₂Cl₂, es filtra per obtenir el producte desitjat (65% en dues etapes). El producte s'ha descrit en l'apartat 6.1.2.22.

6.1.2.28. 1-(hexadeciltio)-2-(5-fenilpentanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina**(24k)**

Seguint el procediment descrit en l'apartat 6.1.2.27 per la introducció del grup amida s'obté el producte desitjat amb un rendiment 70%.

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.85 (t, 3H, *J* = 6.5Hz), 1.1-1.4 (m, 28H), 1.45-1.65 (m, 4H), 1.9-2.3 (m, 2H), 2.3-2.4 (m, 2H), 2.5-2.6 (m, 2H), 2.7-3.0 (m, 2H), 3.3 (s, 9H), 3.5-4.5 (m, 7H), 5.2 (sa, 1H), 7.1-7.2 (m, 1H), 7.2-7.3 (m, 2H), 7.7-7.8 (m, 2H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.1, 22.7, 29.0, 29.2, 29.2, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 31.9, 53.4, 54.4, 55.7, 59.5, 66.1, 127.0, 128.3, 129.6, 143.1, 173.5.

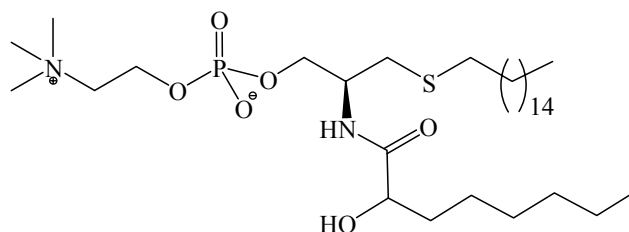
³¹P-RMN

$\delta(\text{ppm}) = -1.31$

IR (KBr): 3419, 2962, 2923, 2852, 1687, 1622, 1551, 1494, 1461, 1236, 1165, 1081, 965, 798, 714 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 657 [M^+ + 1]$

6.1.2.29. 1-(hexadeciltio)-2-(2-hidroxi-octanoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (241)



Seguint el procediment descrit en l'apartat 6.1.2.27 per la introducció del grup amida s'obté el producte desitjat amb un rendiment 60%.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.1-1.4 (m, 32H), 1.45-1.6 (m, 4H), 1.7-2.0 (m, 2H), 2.4-2.7 (m, 4H), 2.7-2.85 (m, 2H), 3.3 (s, 9H), 3.5-4.5 (m, 8H), 6.7 (sa, 1H).

^{13}C -RMN

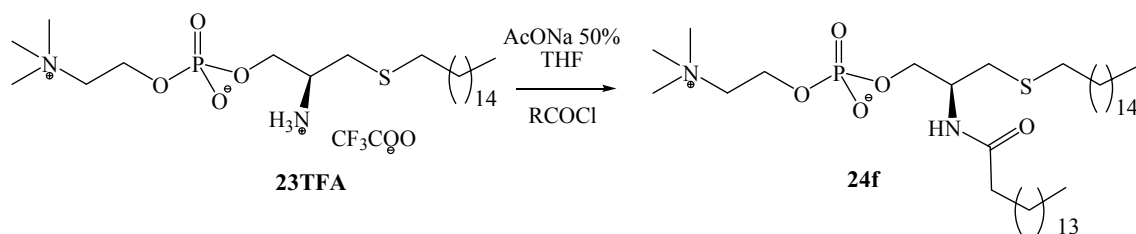
$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 29.0, 29.3, 29.6, 29.7, 31.8, 31.9, 34.8, 36.6, 43.1, 49.4, 54.3, 55.6, 59.6, 66.1, 71.8, 159.5$.

^{31}P -RMN : -1.51

IR (KBr): 3387, 2923, 2852, 1641, 1557, 1467, 1248, 1120, 1087, 964, 842, 772, 714, 617 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 639 [M^+ + 1]$

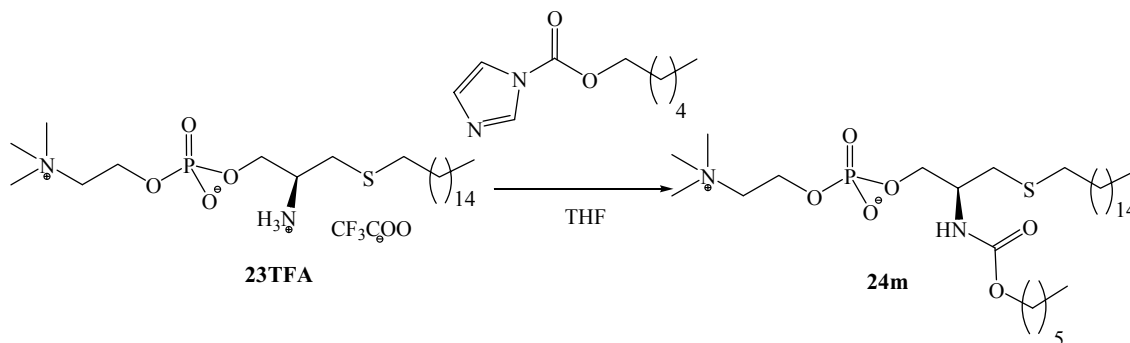
6.1.2.30. 1-(hexadeciltio)-2-(palmitoilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24f)



23TFA (veure 6.1.2.26) (82 mg, 0.13 mmol) es dissolt en THF (5mL) i s'addicionen 7 mL de NaOAc al 50%; es refreda la mescla a 0°C i s'addiciona gota a gota el clorur d'àcid corresponent (45 μL , 0,15 mmol. A continuació s'elimina el dissolvent al buit i el producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica en sílice flash (CH_2Cl_2 -

CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH₂Cl₂, es filtra per obtenir el producte desitjat (99 mg, 80% en dues etapes). El producte s'ha descrit en l'apartat 6.1.2.21.

6.1.2.31. 1-(hexadeciltio)-2-(hexiloxicarbonilaminodeoxi)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (24m)



23TFA (veure 6.1.2.26) (0.23 g, 0.38 mmol) i DMAP (97 mg, 0.79 mmol) es dissolen en 5 mL de THF i llavors s'addiciona una solució del carbamat intermedi (preparat amb carbonil diimidazol i l'alcohol corresponent en THF) (156 mg, 0.80 mmol) en THF i s'agita vuit hores a temperatura ambient. A continuació s'elimina el dissolvent al buit i el producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica en sílice flash (CH₂Cl₂-CH₂Cl₂:MeOH:H₂O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH₂Cl₂, es filtra per obtenir el producte desitjat (112 mg, 47% en dues etapes).

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.84 (t, 6H, *J*= 6.8Hz), 1.1-1.3 (m, 32H), 1.3-1.4 (m, 2H), 1.45-1.55 (m, 2H), 2.45-2.55 (m, 2H), 2.6-2.7 (m, 2H), 3.3 (s, 9H), 3.7-3.8 (m, 2H), 3.85-3.95 (m, 2H), 3.95-4.1 (m, 2H), 4.2-4.4 (m, 3H), 6.6 (sa, 1H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.0, 14.1, 22.5, 22.6, 25.4, 28.5, 28.9, 29.3, 29.6, 29.7, 29.8, 31.5, 31.9, 32.6, 51.5, 54.3, 55.5, 59.3, 64.8, 65.0, 66.3, 79.0, 156.5

³¹P-RMN

δ(ppm) = -0.21

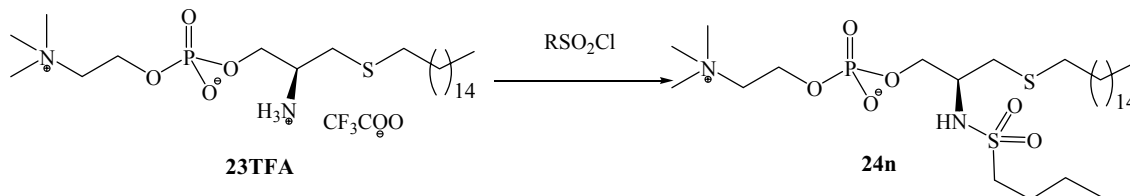
IR (KBr): 3400, 2923, 2852, 1700, 1526, 1468, 1236, 1152, 1081, 1042, 959, 914, 824, 772, 714, 546, 502 cm⁻¹.

ESI-MS: *m/z* = 625 [M⁺ + 1], 647 [M⁺ + 23]

[α]_D = +0,02 (c=0.2, CHCl₃:MeOH 4:1)

6.1.2.32. 1-(hexadeciltio)-2-(butilsulfonamido)-*sn*-glicero-3-fosfocolina**(24n)**

Exemple del procediment experimental de formació dels compostos **24a** amb funcionalitat sulfonamida.



Sobre una solució de **23TFA** (veure apartat 6.1.2.26) (0.15 g, 0.25 mmol) i Na_2CO_3 (0.1 g, 0.94 mmol) en 10 mL de THF:H₂O 3:1 s'addiciona el clorur de sulfoni corresponent (0.035 mL, 0.27 mmol) en THF i s'agita vuit hores a temperatura ambient. A continuació s'elimina el dissolvent al buit i el producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica en sílice flash (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2 :MeOH:H₂O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH_2Cl_2 , es filtra per obtenir el producte desitjat (92 mg, 59% en dues etapes).

¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.8\text{-}0.9$ (m, 6H), $1.1\text{-}1.3$ (m, 28H), $1.45\text{-}1.6$ (m, 2H), $1.65\text{-}1.9$ (m, 2H), $2.45\text{-}2.6$ (m, 2H), $2.7\text{-}2.8$ (m, 2H), $3.0\text{-}3.7$ (m, 12H), $3.8\text{-}4.3$ (m, 4H), $4.4\text{-}4.6$ (m, 2H), 5.2 (sa, 1H).

¹³C-RMN

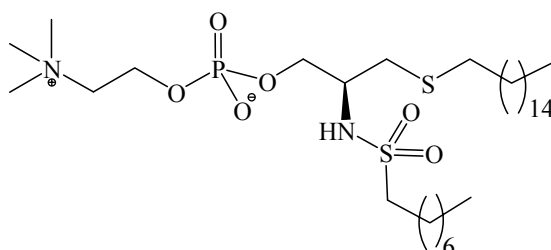
$\delta(\text{ppm}) = 13.6, 14.1, 21.5, 22.7, 25.6, 29.0, 29.3, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9, 51.6, 54.3, 55.6, 60.0, 65.7$.

³¹P-RMN

$\delta(\text{ppm}) = -1.28$

IR(KBr): 3464, 2917, 2852, 1719, 1494, 1461, 1307, 1236, 1140, 1094, 1043, 946 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 639$ [$\text{M}^+ + 23$]

6.1.2.33. 1-(hexadeciltio)-2-(octilsulfonamido)-*sn*-glicero-3-fosfocolina**(24o)**

Seguint el procediment descrit en l'apartat 6.1.2.32 per la introducció del grup sulfonamida s'obté el producte desitjat amb un rendiment del 55%.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.84$ (t, 6H, $J=6.6\text{Hz}$), 1.1-1.4 (m, 32H), 1.55 (quint, 2H, $J=7.1\text{Hz}$), 1.7-1.9 (m, 2H), 2.5 (t, 2H, $J=7.1\text{Hz}$), 2.65-2.8 (m, 2H), 3.0-3.6 (m, 12H), 3.8-3.9 (m, 2H), 4.0-4.1 (m, 2H), 4.3-4.5 (m, 2H), 5.2 (sa, 1H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 14.1, 22.6, 22.6, 22.7, 23.6, 25.4, 28.4, 28.9, 29.0, 29.1, 29.2, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 31.7, 31.8, 31.9, 32.7, 34.0, 45.8, 52.3, 54.3, 55.6, 59.7, 65.9, 67.0$.

^{31}P -RMN

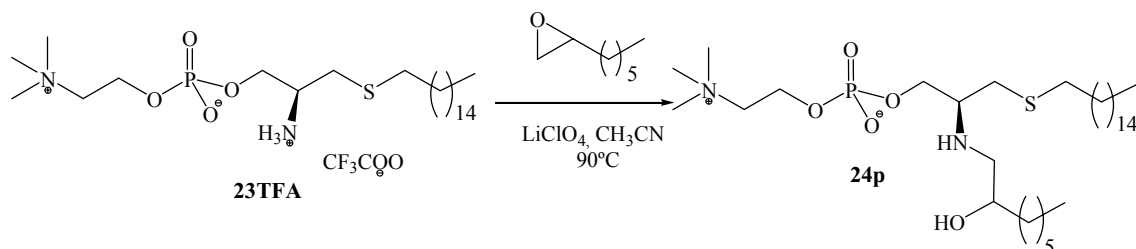
$\delta(\text{ppm}) = -0.36$

IR (KBr): 3406, 2930, 2852, 1719, 1494, 1461, 1313, 1249, 1197, 1094, 1043, 953, 837, 714, 605, 528 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 673$ [$\text{M}^+ + 1$], 695 [$\text{M}^+ + 23$]

6.1.2.34. 1-(hexadeciltio)-2-(2-hidroxiocetilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina

(24p)



Sobre una mescla d'epòxid (78 μL , 0.5 mmol) i LiClO_4 (2.4g, 22 mmol) en 5 mL CH_3CN s'addiciona una solució de **23TFA** (veure apartat 6.1.2.26) (0.15g, 0.25 mmol) en 5 mL CH_3CN i s'agita 36 hores a 80°C . S'elimina el dissolvent al buit i el producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica en sílice flash (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH_2Cl_2 , es filtra per obtenir el producte desitjat (15 mg, 10% en dues etapes).

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 6H, $J=6.7\text{Hz}$), 1.1-1.4 (m, 36H), 1.5-1.6 (m, 2H), 2.5 (dd, 2H, $J^1=14.1\text{Hz}$, $J^2=6.8\text{Hz}$), 2.65-2.75 (m, 2H), 3.3 (s, 9H), 3.5-3.9 (m, 4H), 3.9-4.1 (m, 2H), 4.1-4.2 (m, 1H), 4.2-4.4 (m, 2H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 28.9, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8, 31.9, 32.5, 51.2, 54.3, 59.3, 64.2, 66.2.$

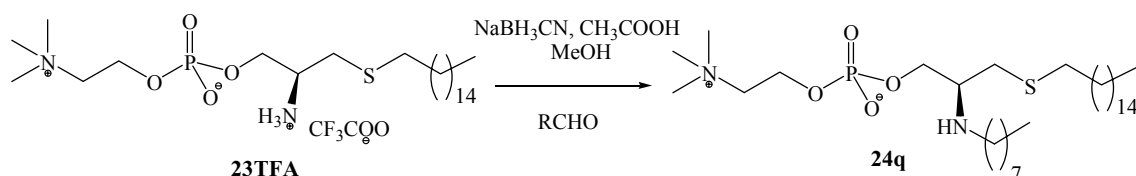
^{31}P -RMN

$\delta(\text{ppm}) = -0.38$

IR (KBr): 3430, 2929, 2862, 1452, 1243, 1088, 963, 917, 767, 717 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 625 [M^+ + 1]$

6.1.2.35. 1-(hexadeciltio)-2-(octilamino)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**24q**)



S'obre una solució de **23TFA** (veure apartat 6.1.2.26) (0.12g, 0.2 mmol) en 9 mL de MeOH s'addiciona NaBH_3CN (32mg, 0.5 mmol), àcid acètic (0.8 μL , 0.01 mmol) i octanal (40 μL , 0.2 mmol) i s'agita 36 hores a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent al buit i el producte es purifica mitjançant columna cromatogràfica en sílice flash (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2 :MeOH:H₂O 65:25:4); els dissolvents s'eliminen al buit i el producte es redissolt en CH_2Cl_2 , es filtra per obtenir el producte desitjat (80 mg, 66% en dues etapes).

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.8$ (t, 6H, $J = 6.6\text{Hz}$), 1.1-1.4 (m, 38H), 1.5 (quint, 2H, $J = 6.9\text{Hz}$), 2.5 (t, 2H, $J = 7.1\text{Hz}$), 2.7-2.8 (m, 2H), 2.85-3.1 (m, 2H), 3.35 (s, 9H), 3.7-3.8 (m, 1H), 3.8-3.9 (m, 2H), 4.0-4.2 (m, 2H), 4.3-4.4 (m, 2H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 14.1, 22.6, 22.6, 22.6, 26.5, 27.0, 27.5, 28.9, 29.2, 29.2, 29.3, 29.6, 29.6, 29.6, 29.6, 29.7, 31.7, 31.7, 31.7, 31.8, 31.9, 32.7, 40.7, 41.6, 46.4, 48.1, 54.3, 58.2, 59.4, 63.4, 66.0.$

^{31}P -RMN

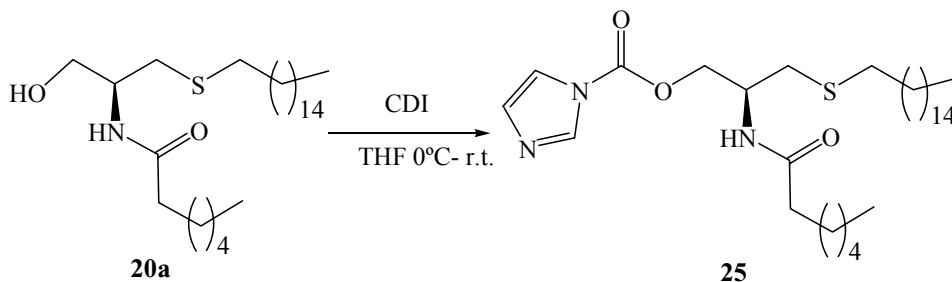
$\delta(\text{ppm}) = -0.41$

IR (KBr): 3425, 2929, 2859, 1680, 1468, 1236, 1197, 1088, 965, 920, 817, 773, 721, 611, 502 cm^{-1}

ESI-MS: $m/z = 609 [M^+ + 1]$

$[\alpha]_D = -0.03$ (c=0.2, CHCl_3 :MeOH 4:1)

6.1.2.36. 1*H*-imidazole-1-carboxilat de (*S*)-2-(heptanamido)-3-(hexadeciltio)-propil (**25**)



Sobre una solució de CDI (66 mg, 0.4 mmol) en 1 mL de THF a 0°C s'addiciona una solució de l'alcohol corresponent (0.2 g, 0.27 mmol de **20a**) en 1 mL de THF i s'agita una hora a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent i es redissolt en CH₂Cl₂, es renta amb tampó fosfat a pH=7, i la fase orgànica s'asseca amb MgSO₄ conduint al producte desitjat (0.13 g, 91%).

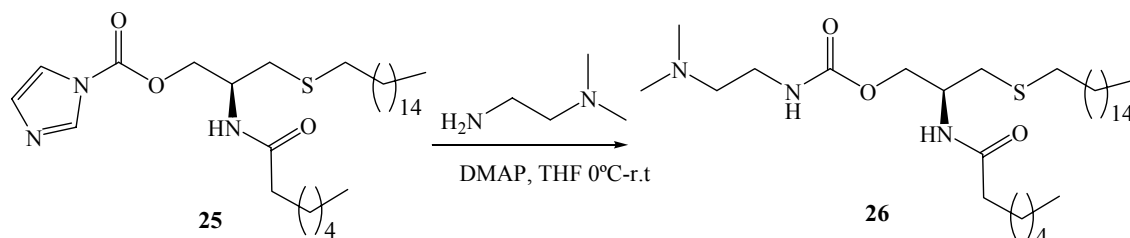
¹H-RMN

δ(ppm) = 0.79 (t, 3H, *J*= 6.4Hz), 0.81 (t, 3H, *J*= 6.7Hz), 1.1-1.35 (m, 32H), 1.51 (quint, 2H, *J*= 7.9Hz), 1.54 (quint, 2H, *J*= 7.9Hz), 2.1 (t, 2H, *J*= 7.4Hz), 2.5 (t, 2H, *J*= 7.3Hz), 2.6 (dd, 1H, *J*¹= 13.7Hz, *J*²= 6.4Hz), 2.7 (dd, 1H, *J*¹= 13.7Hz, *J*²= 5.1Hz), 4.0 (dd, 1H, *J*¹= 14.2Hz, *J*²= 7.1Hz), 4.4-4.5 (m, 2H), 6.3 (d, *J*= 7.5Hz), 7.0 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 8.0 (s, 1H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 13.9, 14.0, 14.0, 20.9, 22.3, 22.6, 25.5, 28.7, 28.8, 29.1, 29.2, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 31.4, 31.8, 32.8, 33.1, 36.5, 47.3, 53.3, 60.3, 68.2, 117.1, 130.5, 136.9, 148.4, 173.1.

6.1.2.37. 2-(dimetilamino)etilcarboxilat de (*S*)-2-(heptanamido)-3-(hexadeciltio)-propil (**26**)



Sobre una solució de **25** (0.13 mg, 0.24 mmol) en 2 mL de THF a 0°C s'addiciona *N,N*-dimetiletilenediamina (38 μL, 0.36 mmol) i DMAP (catalític), i s'agita vuit hores a

temperatura ambient. S'elimina el dissolvent al buit, s'addiciona CH_2Cl_2 i es renta amb tampó fosfat a $\text{pH}=7$, s'asseca la fase orgànica amb MgSO_4 i s'obté un sòlid blanc (0.13 g, 94%).

^1H -RMN

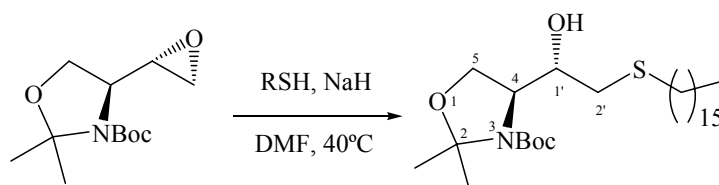
$\delta(\text{ppm}) = 0.83$ (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 0.84 (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.2 - 1.35 (m, 32H), 1.53 (quint, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 1.59 (quint, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 2.2 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$), 2.5 (t, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.6 (dd, 1H, $J^1 = 13.5\text{Hz}$, $J^2 = 7.8\text{Hz}$), 2.7 (s, 6H), 2.9 (t, 3H, $J = 5.3\text{Hz}$), 3.35 - 3.45 (m, 1H), 3.5 - 3.6 (m, 1H), 4.2 - 4.3 (m, 3H), 6.3 (sa, 1H), 6.8 (d, $J = 7.0\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 14.1, 22.5, 22.6, 25.6, 28.8, 28.9, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 31.5, 31.8, 32.6, 32.8, 36.5, 36.7, 44.0, 44.1, 48.2, 57.8, 64.9, 173.4$
 IR(KBr): $3355, 2955, 2916, 2852, 2717, 1700, 1648, 1539, 1461, 1287, 1255, 714\text{ cm}^{-1}$.

6.1.3. Síntesi d'anàlegs de ceramida

6.1.3.1. (4S,1'S)-4-(2-(hexadeciltio)-1-hidroxiètil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilat de *tert*-butil (27)



Una solució de l'epòxid de partida (sintetitzat per Carme Bedia seguint la metodologia de Moore i col·laboradors⁹⁴) (0.1 g, 0.4 mmol) en DMF s'addiciona sobre un solució de NaH (33 mg al 60%, 0.8 mmol) i 1-hexadecanetioli (0.25 mL, 0.8 mmol) en DMF. La reacció s'escalfa a 40°C durant quatre hores. Es refreda fins temperatura ambient i s'addiciona una solució d'HCl 1M (10 mL). El producte s'extreu amb dietil èter ($3 \times 20\text{mL}$) i es renta amb aigua i solució saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica amb MgSO_4 anhidre i s'elimina el dissolvent al buit. El cru es purifica mitjançant cromatografia en sílice flash (hexà-AcOEt 8:1) proporcionant 0.19 g (95%) d'un sòlid blanc.

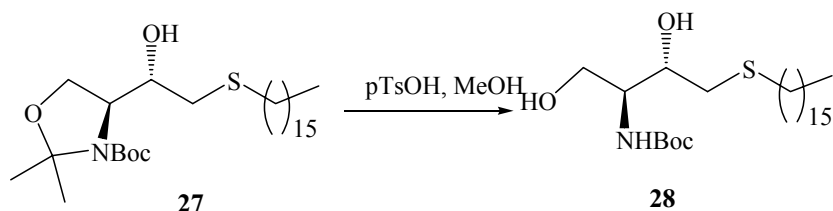
^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 7.0\text{Hz}$), 1.2 - 1.3 (m, 22H), 1.3 - 1.35 (m, 2H), 1.4 (s, 9H), 1.5 - 1.6 (m, 8H), 2.4 - 2.5 (m, 3H), 2.6 (dd, 1H, $J^1 = 13.7\text{Hz}$, $J^2 = 2.7\text{Hz}$), 2.8 (sa, 1H), 3.6 (m, 1H), 3.7 (m, 1H), 3.8 - 4.1 (m, 2H).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 22.6, 26.0, 27.0, 28.3, 28.8, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 31.8, 32.2, 36.4, 61.3, 64.9, 71.0, 80.8, 94.0, 153.6.$

6.1.3.2. (2*S*,3*S*)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxiбутан-2-ілcarboxilat de tert-butil (28)



Una mescla de d'àcid *p*-toluensulfònic (0.016 g, 0.084 mmol) i **27** (0.19 g, 0.4 mmol) s'agita 8 hores a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent i es redissolt el cru en AcOEt, es renta la solució amb aigua i solució saturada de NaCl. El cru es purifica mitjançant cromatografia flash (hexà-AcOEt 3:2) proporcionant 0.15 grams (85%) d'un sòlid blanc.

 ^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.2-1.3 (m, 24H), 1.3-1.4 (m, 2H), 1.4 (s, 9H), 1.45 (quint, 2H, $J = 6\text{Hz}$), 2.5 (t, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 2.6 (dd, 1H, $J^1 = 14.0\text{Hz}$, $J^2 = 10.0\text{Hz}$), 2.8 (dd, 1H, $J^1 = 14.0\text{Hz}$, $J^2 = 4.0\text{Hz}$), 2.9 (sa, 1H), 3.3 (sa, 1H), 3.5-3.6 (m, 1H), 3.6-3.7 (m, 1H), 3.7-3.8 (m, 1H), 4.0 (da, 1H, $J = 10.5\text{Hz}$), 5.3 (d, 1H, $J = 8.0\text{Hz}$).

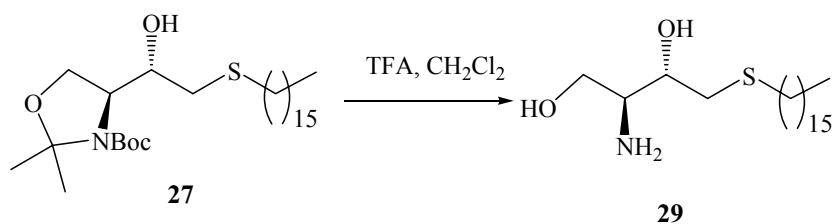
 ^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 28.3, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 32.1, 36.7, 37.0, 54.4, 62.4, 71.3, 79.8, 156.0.$

IR (film): 3368, 2923, 2848, 1685, 1529, 1460, 1367, 1240, 1177, 1049 cm^{-1} .

$[\alpha]_{\text{D}} = +0.001$ ($c=0.1$, CHCl_3)

6.1.3.3. (2*S*,3*S*)-2-amino-4-(hexadeciltio)butan-1,3-diol (29)



Sobre una solució de **27** (80 mg, 0.17 mmol) en 5 mL de CH_2Cl_2 s'addiciona gota a gota 1 mL de TFA. Després de 20 minuts s'eliminen els dissolvents i s'addicionen 20 mL de

NaOH 1M, i el producte s'extreu en CH₂Cl₂ (3×30mL), es renten les fases orgàniques amb aigua i solució saturada de NaCl, i s'asseca sobre MgSO₄, després de filtrar i eliminar els dissolvents s'obté el producte desitjat com un sòlid blanc (48 mg, 77%).

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.85 (t, 3H, *J*= 6.6Hz), 1.2-1.3 (m, 24H), 1.3-1.4 (m, 2H), 1.55 (quint, 2H, *J*= 7.5Hz), 2,3 (sa, 3H), 2.5 (t, 2H, *J*= 7.4Hz), 2.6 (dd, 1H, *J*¹= 13.4Hz, *J*²=9.1Hz), 2.8 (dd, 1H, *J*¹= 13.4Hz, *J*²= 3.4Hz), 2.9 (sa, 1H), 3.5-3,7 (m, 3H).

¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.1, 22.7, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 32.2, 36.9, 55.4, 64.4, 72.2.

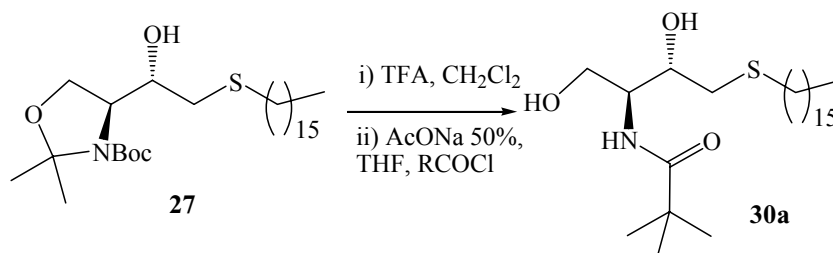
IR (film): 3348, 2917, 2853, 1464, 1050, 717 cm⁻¹.

Punt de fusió: 65-68°C.

[α]_D= +0.033 (c=0.1, CHCl₃)

6.1.3.4. *N*-((2*S*,3*S*)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxiбутан-2-ил)пivalamida

(30a)



Sobre una solució de **27** (95 mg, 0.19 mmol) en 20 mL de CH₂Cl₂ s'addicionen gota a gota 4 mL de TFA. Després de 20 minuts el dissolvent s'elimina al buit i el cru s'utilitza per la següent reacció.

Sobre una solució del cru anterior en 5 mL de THF s'addicionen 6 mL de NaOAc al 50%. Deu minuts després s'addiciona gota a gota el clorur d'àcid corresponent (36 μL, 0.2 mmol). La reacció s'agita 8 hores a temperatura ambient i llavors s'eliminen els dissolvents al buit. S'addiciona aigua (20 mL) i el producte s'extreu amb CH₂Cl₂ (3×30mL), s'assequen les fases orgàniques amb MgSO₄ i es purifica el producte mitjançant columna cromatogràfica de sílice flash (CH₂Cl₂ i CH₂Cl₂:MeOH 97:3) conduït a 72 mg (85%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.2 (s, 9H), 1.2-1.3 (m, 22H), 1.3-1.35 (m, 2H), 1.5 (quint, 2H, $J = 6\text{Hz}$), 1.7 (sa, 1H), 2.5 (t, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.6 (dd, 1H, $J^1 = 13.8\text{Hz}$, $J^2 = 9.4\text{Hz}$), 2.7 (dd, 1H, $J^1 = 13.8\text{Hz}$, $J^2 = 3.8\text{Hz}$), 2.9 (sa, 1H), 3.39 (sa, 1H), 3.6-3.7 (m, 1H), 3.75-3.82 (m, 1H), 3.87-3.92 (m, 1H), 3.96-4.0 (m, 1H), 6.5 (d, 1H, $J = 7.2\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 27.5, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 32.0, 36.8, 38.8, 53.4, 62.1, 71.3, 179.0$.

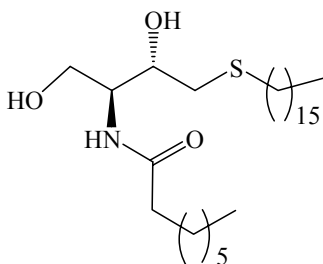
IR (film): 3356, 2956, 2925, 2856, 1641, 1541, 1520, 1462, 1199, 1052 cm^{-1} .

Punt de fusió: 52-55°C.

$[\alpha]_{\text{D}} = -0.016$ ($c=0.1$, CHCl_3)

6.1.3.5. *N*-((2*S*,3*S*)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxibutan-2-il)octanamida

(30b)



^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.7\text{Hz}$), 1.2-1.3 (m, 32H), 1.45 (quint, 2H, $J = 6\text{Hz}$), 1.52 (quint, 2H, $J = 6\text{Hz}$), 2.2 (t, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 2.5 (t, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 2.6 (dd, 1H, $J^1 = 13.5\text{Hz}$, $J^2 = 10.0\text{Hz}$), 2.8 (dd, 1H, $J^1 = 14.0\text{Hz}$, $J^2 = 4.0\text{Hz}$), 2.9 (sa, 1H), 3.4 (sa, 1H), 3.6-3.7 (m, 1H), 3.8 (dt, 1H, $J^1 = 9.5\text{Hz}$, $J^2 = 4.5\text{Hz}$), 3.9-3.95 (m, 1H), 4.0 (dd, 1H, $J^1 = 11.5\text{Hz}$, $J^2 = 2.5\text{Hz}$), 6.3 (d, 1H, $J = 8.0\text{Hz}$).

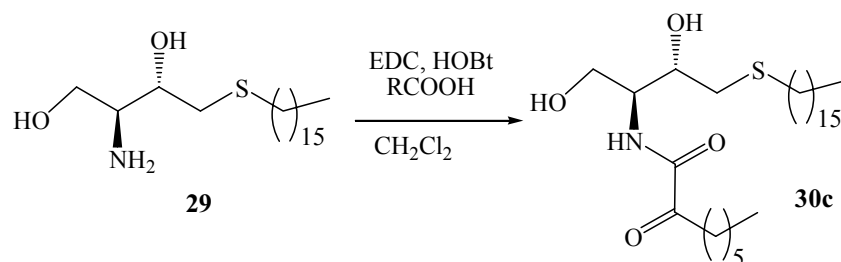
^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 14.1, 22.6, 22.7, 25.7, 28.8, 29.0, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.7, 31.9, 32.0, 36.8, 36.9, 53.3, 62.1, 71.3, 173.6$

IR (film): 3295, 2923, 2853, 1638, 1548, 1463, 1068, 717 cm^{-1} .

$[\alpha]_{\text{D}} = -0.007$ ($c=0.1$, CHCl_3)

6.1.3.6. *N*-((2*S*,3*S*)-4-(hexadeciltio)-1,3-dihidroxiutan-2-il)-2-oxooctanamida (**30c**)



S'agita durant 15 minuts una solució de l'àcid corresponent (26 mg, 0.17 mmol), EDC (32 mg, 0.17 mmol) i HOBT (22 mg, 0.17 mmol) en CH₂Cl₂, a continuació aquesta solució s'addiciona sobre una dissolució de **29** (40 mg, 0.11 mmol) en CH₂Cl₂. La reacció s'agita a temperatura ambient durant 8 hores, llavors s'addiciona aigua i el producte s'extreu en CH₂Cl₂ (3×20mL), es renten les fases orgàniques amb solució saturada de NaCl, s'asseca amb MgSO₄ i es purifica per columna cromatogràfica (CH₂Cl₂ i CH₂Cl₂:MeOH 97:3) proporcionant 30 mg (55%) d'un sòlid blanc.

¹H-RMN

δ(ppm) = 0.85 (t, 6H, *J*= 6.7Hz), 1.2-1.4 (m, 36H), 1.5-1.6 (m, 4H), 2.5 (t, 2H, *J*= 7.2Hz), 2.6 (dd, 1H, *J*¹= 14.0Hz, *J*²=9.5Hz), 2.7 (sa, 1H), 2.8 (dd, 1H, *J*¹= 14.0Hz, *J*²= 3.5Hz), 2.9 (t, 2H, *J*= 7.5Hz), 3.2 (da, 1H, *J*=10.0 Hz), 3.8-3.85 (m, 1H), 3.9 (dt, 1H, *J*¹= 13.0Hz, *J*²= 3.5Hz), 4.0 (dd, 1H, *J*¹= 11.7Hz, *J*²= 2.7 Hz), 7.6 (d, 1H, *J*= 8.5Hz).

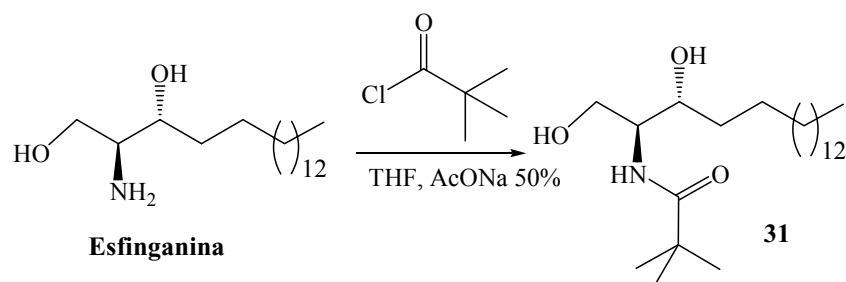
¹³C-RMN

δ(ppm) = 14.0, 14.1, 22.4, 22.7, 23.1, 28.7, 28.8, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.5, 31.9, 32.0, 36.8, 37.0, 53.4, 61.7, 70.5, 160.2, 198.7.

IR (film): 3375, 2927, 2850, 1723, 1670, 1517, 1458, 1057 cm⁻¹.

[α]_D= -0.022 (c=0.1, CHCl₃)

6.1.3.7. *N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)pivalàmida (**31**)



Sobre una solució d'esfinganina (10mg, 0.03mmol) en 4 mL de THF s'addicionen 5 mL de NaOAc al 50%. Deu minuts després s'addiciona gota a gota el clorur d'àcid

corresponent (4.5 μ L, 0.03 mmol). La reacció s'agita 8 hores a temperatura ambient i llavors s'eliminen els dissolvents al buit. S'addiciona aigua (20 mL) i el producte s'extreu amb CH_2Cl_2 (3 \times 30mL), s'assequen les fases orgàniques amb MgSO_4 i es purifica el producte mitjançant columna cromatogràfica de sílice flash (CH_2Cl_2 i CH_2Cl_2 :MeOH 97:3) conduint a 7 mg (55%) del producte desitjat.

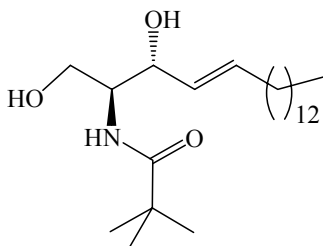
^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.2 (s, 9H), 1.2-1.3 (m, 24H), 1.45-1.55 (m, 2H), 3.0 (sa, 1H), 3.2 (sa, 1H), 3.65-3.75 (m, 2H), 3.75-3.8 (m, 1H), 4.0 (dd, 1H, $J^1 = 11.3\text{Hz}$, $J^2 = 4.0\text{Hz}$), 6.5 (d, 1H, $J = 7.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 25.9, 27.5, 27.6, 27.6, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 31.9, 34.4, 34.5, 38.8, 53.8, 62.3, 73.9, 179.1$.

6.1.3.8. *N*-((*E*,2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il)pivalàmida (32)



Dissolvents columna: CH_2Cl_2 i CH_2Cl_2 :MeOH 97:3

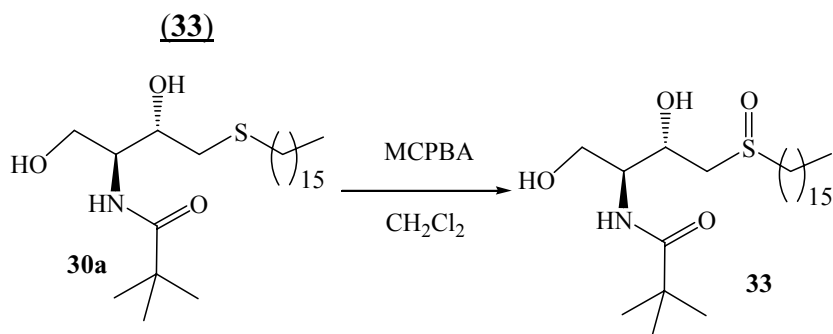
Rendiment: 78%

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.7\text{Hz}$), 1.2 (s, 9H), 1.2-1.3 (m, 20H), 2.0 (q, 2H, $J = 7.0\text{Hz}$), 2.9 (sa, 1H), 3.0 (sa, 1H), 3.7 (da, 2H, $J = 9.8\text{Hz}$), 3.8-3.9 (m, 1H), 3.9 (da, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$), 4.3 (sa, 1H), 5.5 (dd, 1H, $J^1 = 15.0\text{Hz}$, $J^2 = 6.3\text{Hz}$), 2.7 (dt, 1H, $J^1 = 15.0\text{Hz}$, $J^2 = 6.2\text{Hz}$), 6.4 (d, 1H, $J = 7.0\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.1, 22.7, 27.5, 27.6, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 31.9, 32.3, 54.6, 62.5, 74.4, 128.8, 134.3, 179.0$.

6.1.3.9. *N*-((2*S*,3*S*)-4-(hexadecilsulfinil)-1,3-dihidroxiutan-2-il)pivalàmida

Sobre una dissolució de **30a** (13mg, 0.03mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 a 0°C s'addiciona lentament àcid *m*-cloroperbenzoic (7mg, 0.03mmol) i s'agita 1 hora a temperatura ambient.

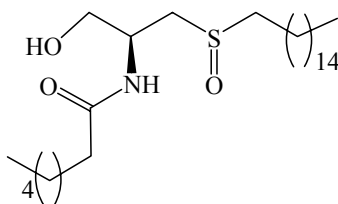
El cru es renta amb una solució saturada de NaHCO_3 (3×30mL) i amb una solució saturada de NaCl , s'asseca la fase orgànica amb MgSO_4 i es purifica el producte mitjançant columna cromatogràfica de sílice flash (CH_2Cl_2 i CH_2Cl_2 :MeOH 97:3) conduint a 10 mg (74%) del producte desitjat.

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 3H, $J = 6.9\text{Hz}$), 1.2 (s, 9H), 1.2-1.3 (m, 24H), 1.4 (quint, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 1.8 (quint, 2H, $J = 7.4\text{Hz}$), 2.8 (sa, 1H), 3.0-3.1 (m, 2H), 3.1 (dd, 1H, $J^1 = 14.6\text{Hz}$, $J^2 = 2.1\text{Hz}$), 2.7 (dd, 1H, $J^1 = 14.6\text{Hz}$, $J^2 = 9.5\text{Hz}$), 3.7 (dt, 1H, $J^1 = 11.4\text{Hz}$, $J^2 = 4.7\text{Hz}$), 3.85-3.95 (m, 1H), 4.0 (dt, 1H, $J^1 = 11.6\text{Hz}$, $J^2 = 3.4\text{Hz}$), 4.3-4.4 (m, 1H), 4.4 (d, 1H, $J = 4.8\text{Hz}$), 6.5 (d, 1H, $J = 7.6\text{Hz}$).

6.1.3.10. *N*-((*S*)-3-(heptadecilsulfinil)-1-hidroxiopropan-2-il)heptanamida

(34)



Dissolvents columna: CH_2Cl_2 i CH_2Cl_2 :MeOH 96:4

Rendiment: 76%

^1H -RMN (mescla de diastereòmers relació 5.5:4.5)

$\delta(\text{ppm}) = 0.85$ (t, 6+6'H, $J = 6.7\text{Hz}$), 1.2-1.4 (m, 34+34'H), 1.4 (sext, 2+2'H, $J = 6.8\text{Hz}$), 1.6 (sext, 2+2'H, $J = 6.7\text{Hz}$), 1.7 (quint, 2+2'H, $J = 7.8\text{Hz}$), 2.2 (t, 2'H, $J = 7.6\text{Hz}$), 2.2 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$), 2.8-3.0 (m, 3+3'H), 3.1 (dd, 1'H, $J^1 = 13.2\text{Hz}$, $J^2 = 6.9\text{Hz}$),

2.7 (dd, 1H, $J^1 = 13.5\text{Hz}$, $J^2 = 6.0\text{Hz}$), 3.6-4.0 (m, 2+1'H), 4.1-4.4 (m, 1+1'H), 4.5-4.6 (m, 1'H), 6.7 (d, 1H, $J = 6.9\text{Hz}$), 7.0 (d, 1'H $J = 7.2\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 14.1, 22.5, 22.6, 25.5, 25.6, 28.7, 28.7, 28.9, 29.1, 29.3, 29.5, 29.6, 29.6, 29.6, 31.4, 31.9, 36.5 (36.6'), 48.5 (49.1'), 52.1 (52.3'), 55.7 (53.0'), 63.6 (63.6'), 173.7 (174.0')$.

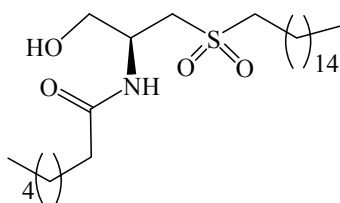
IR (film): 3321, 2955, 2920, 2852, 1641, 1546, 1464, 1075, 1016, 994, 722 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 482 [M^+ + 23]$

$[\alpha]_D = -19.51$ ($c = 1.0 \text{ CHCl}_3$)

6.1.3.11. *N*-((*S*)-3-(heptadecilsulfonil)-1-hidroxipropan-2-il)heptanamida

(35)



Dissolvents column: CH_2Cl_2 i $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 98:2

Rendiment: 78%

^1H -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 0.86$ (t, 6H, $J = 6.7\text{Hz}$), 1.2-1.3 (m, 34H), 1.4 (quint, 2H, $J = 7.5\text{Hz}$), 1.6 (quint, 2H, $J = 6.9\text{Hz}$), 1.7-1.9 (m, 2H), 2.2 (t, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$), 3.0 (dd, 1H, $J^1 = 9.1\text{Hz}$, $J^2 = 7.0\text{Hz}$), 3.3 (dd, 1H, $J^1 = 14.3\text{Hz}$, $J^2 = 5.7\text{Hz}$), 3.4 (dd, 1H, $J^1 = 14.3\text{Hz}$, $J^2 = 6.1\text{Hz}$), 3.4 (sa, 1H), 3.8 (dd, 1H, $J^1 = 11.8\text{Hz}$, $J^2 = 4.3\text{Hz}$), 3.9 (dd, 1H, $J^1 = 11.8\text{Hz}$, $J^2 = 3.9\text{Hz}$), 4.3-4.4 (m, 1H), 6.4 (d, 1H, $J = 7.5\text{Hz}$).

^{13}C -RMN

$\delta(\text{ppm}) = 14.0, 14.1, 21.8, 22.5, 22.7, 25.4, 28.4, 28.9, 29.0, 29.3, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 31.5, 31.9, 36.6, 47.5, 52.3, 54.3, 63.4, 174.0$.

IR (film): 3460, 3315, 2957, 2919, 2850, 1630, 1542, 1464, 1398, 1267, 1228, 1124, 1093, 1043, 769, 719 cm^{-1} .

ESI-MS: $m/z = 498 [M^+ + 23]$

$[\alpha]_D = 2.82$ ($c = 1.0 \text{ CHCl}_3$)

6.2. Metodologia utilitzada en biologia molecular i expressió proteïnes:

6.2.1. Anàlisi aminoacídic de la seqüència.

A continuació es presenta la seqüència d'aminoàcids de la proteïna, així com la seqüència d'àcids nucleics que codifiquen per la mateixa.

```
1 atgcagttct tcggacgcct cgtcaacacc ctcagtagcg tcaccaactt
1 M Q F F G R L V N T L S S V T N L
51 gttctcgaac ccattccggg tgaaggaggt gtccctgact gactacgtct
18 F S N P F R V K E V S L T D Y V S
101 caagtgaacg tgtccgggag gaagggcagc tgatcctggt acagaatgtc
35 S E R V R E E G Q L I L L Q N V
151 tccaatcgca cctgggactg tgtcctggtc agcccgagga acccacagag
51 S N R T W D C V L V S P R N P Q S
201 cggcttccgg ctcttccaac tggagtctga ggcagacgcc ctggtgaact
68 G F R L F Q L E S E A D A L V N F
251 tccagcagtt ctctcccag ctgccgcct tctacgagag ctctgtgcag
85 Q Q F S S Q L P P F Y E S S V Q
301 gtcctgcatg tggaggtgct tcagcacctg accgacctca tccggaacca
101 V L H V E V L Q H L T D L I R N H
351 ccccagctgg acagtgacac acctagccgt ggagcttggc atccgggagt
118 P S W T V T H L A V E L G I R E C
401 gcttccatca cagccgcatc atcagctgtg ccaacagcac agagaatgag
135 F H H S R I I S C A N S T E N E
451 gagggctgca cccactaca tctggcctgc cgcaaggggtg acagtgagat
151 E G C T P L H L A C R K G D S E I
501 cctggtggag ctggtacaat actgccacgc ccagatggat gtcactgaca
168 L V E L V Q Y C H A Q M D V T D N
551 acaaaggcga gactgccttc cattacgctg tgcaagggga caatccccag
185 K G E T A F H Y A V Q G D N P Q
601 gtgctacagc tcctagggaa gaacgcctca gccggcctga accaggtaaa
201 V L Q L L G K N A S A G L N Q V N
```

651 caaccaaggg ctgactccac tgcacctggc ctgcaagatg ggaaagcagg
 218 N Q G L T P L H L A C K M G K Q E
 701 agatggtgcg cgtcctgctg ctctgtaatg cccgctgcaa catcatgggg
 235 M V R V L L L C N A R C N I M G
 751 cccggtggct tccccatcca cacagccatg aagttttccc agaagggggtg
 251 P G G F P I H T A M K F S Q K G C
 801 tgctgaaatg attatcagca tggacagcaa ccagatccac agcaaggatc
 268 A E M I I S M D S N Q I H S K D P
 851 ctcgctacgg agccagccca ctccattggg ccaagaacgc cgagatggcc
 285 R Y G A S P L H W A K N A E M A
 901 cgaatgctgc tgaagcgggg ctgtgacgtg gacagcacta gctcctcagg
 301 R M L L K R G C D V D S T S S S G
 951 gaacacagcc ctgcatgtgg cggatgatgcg caaccgcttt gactgtgtca
 318 N T A L H V A V M R N R F D C V M
 1001 tggtgctgct gacctacggg gctaatgcag gtgcccgcgg agagcacggg
 335 V L L T Y G A N A G A R G E H G
 1051 aacacgccac tgcacctggc catgtcgaaa gataacatgg agatggtcaa
 351 N T P L H L A M S K D N M E M V K
 1101 agccctcatt gtatttgggg cagaagtgga caccccaac gactttgggg
 368 A L I V F G A E V D T P N D F G E
 1151 agactcctgc attgatagcc tccaagatca gcaagcagct tcaggatctc
 385 T P A L I A S K I S K Q L Q D L
 1201 atgcccattct ctcgagcccg gaagccagcg ttcattcctga gctccatgag
 401 M P I S R A R K P A F I L S S M R
 1251 ggacgagaag cggagtcacg accacctgct ctgcctggac ggagggggcg
 418 D E K R S H D H L L C L D G G G V
 1301 tgaaaggcct ggtcattatc cagcttctca tcgccatcga gaaggcctcg
 435 K G L V I I Q L L I A I E K A S
 1351 ggagtggcca ccaaggacct cttcgactgg gtggcaggaa ccagcacagg
 451 G V A T K D L F D W V A G T S T G
 1401 gggcatcctg gccctggcca ttctgcacag taaatccatg gcctatatgc
 468 G I L A L A I L H S K S M A Y M R
 1451 gtgggtgtgta cttccgtatg aaggacgagg tgtttcgggg ctcacggccc
 485 G V Y F R M K D E V F R G S R P

1501 tatgagtctg ggcccctgga ggagttcctg aagcgggagt ttggggagca
 501 Y E S G P L E E F L K R E F G E H
 1551 caccaagatg acagatgtca aaaaacccaa ggtgatgctg acagggacac
 518 T K M T D V K K P K V M L T G T L
 1601 tgtctgaccg gcagccagca gagctccacc tattccggaa ttacgatgct
 535 S D R Q P A E L H L F R N Y D A
 1651 cccgaagccg ttcgagagcc ccgctgcaac caaacatta acctgaagcc
 551 P E A V R E P R C N Q N I N L K P
 1701 accgactcag cctgcagacc aactgggatg gcgtgcagcc cggagcagtg
 568 P T Q P A D Q L V W R A A R S S G
 1751 gggcagcccc aacctatttc cggcccaatg gacgcttcct ggatggaggg
 585 A A P T Y F R P N G R F L D G G
 1801 ctgctggcca acaaccccac actggatgcc atgactgaaa tccatgagta
 601 L L A N N P T L D A M T E I H E Y
 1851 caatcaggac atgatccgca agggccaggg caacaagggtg aagaaactct
 618 N Q D M I R K G Q G N K V K K L S
 1901 ccatagtcgt ttctctgggg acaggaaagt cccctcaagt gcctgtaacc
 635 I V V S L G T G K S P Q V P V T
 1951 tgtgtagatg tctttcgtcc cagcaaccct tgggaactgg ccaaaaactgt
 651 C V D V F R P S N P W E L A K T V
 2001 ttttggagcc aaggaactgg gcaagatggt cgtggactgt tgcacagatc
 668 F G A K E L G K M V V D C C T D P
 2051 cagatgggcg ggctgtggat cgggcccggg cctggtgcca gatggtcggc
 685 D G R A V D R A R A W C E M V G
 2101 atccagtact tcagactgaa cccccagcta ggtccgaca tcatgctgga
 701 I Q Y F R L N P Q L G S D I M L D
 2151 cgaggtcagt gatgcagtgc tggcacaacgc cctctgggag accgaggtct
 718 E V S D A V L V N A L W E T E V Y
 2201 acatctatga gcaccgagag gagttccaga agcttgtcca gctgctgctg
 735 I Y E H R E E F Q K L V Q L L L
 2251 tctccctga
 751 S P *

D'aquesta seqüència cal observar la presència dels vuit ankirin repeats (E¹⁵¹-D¹⁸⁰ ; N¹⁸⁴-N²¹⁴ ; Q²¹⁹-N²⁴⁷ ; G²⁵²-H²⁸⁰ ; Y²⁸⁶-S³¹⁴ ; G³¹⁶-A³⁴⁵ ; H³⁴⁹-T³⁷⁸ ; D³⁸¹-A⁴¹⁰) que no es van introduir en les dues proteïnes de fusió expressades al nostre laboratori, les quals contenen només els aminoàcids indicats a continuació (LiPLA : D⁴⁵⁵-P⁷⁵² , siPLA : D⁴⁵⁵-D⁶⁷⁹), no obstant aquestes si que presenten el motiu lipasa (GTS⁴⁶⁵TG) essencial per catàlisi.

6.2.2. Material biològic i condicions de cultiu:

6.2.2.1. Soques bacterianes:

- *Escherichia coli* **DH5 α** (*supE44*, Δ *lac*, U169, (Φ 80, *lacZ* Δ M15), *hsd* R17, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*).

- *Escherichia coli* **BL21(DE3)** (F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* λ (DE3)

- *Escherichia coli* **BL21(DE3)pLysS** (F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* λ (DE3) [pLysS Cam^R]

- *Escherichia coli* **BL21(DE3) Rosetta 2**: (F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) *pRARE2*

6.2.2.2. Medi de Cultiu:

El medi de cultiu utilitzat pel creixement de *Escherichia coli* va ser el medi LB (Luria-Bertrani: NaCl 0,5 %, triptona 1%, extracte de llevat 0,5%). Aquest medi fou autoclavat. Aquest mateix medi va ser utilitzat pel cultiu sòlid en placa de Petri afegint 15 g/L d'agar abans d'autoclavar.

6.2.2.3. Solucions utilitzades:

- NETN (100mL):

2 mL TRIS·HCl 1M pH=8

2 mL NaCl 5 M

100 µL EDTA 0,5M

500 µL NP40 (Calbiochem)

Abans d'utilitzar-lo es van addicionar inhibidors de proteases i DTT (ditiotreitòl) per trencar els ponts disulfur.

- SDS-PAGE 2X(10 mL) :

2,5 mL TRIS·HCl 0,5 M pH =6,8

0,4 g SDS

2 mL glicerol

0,2 mL β-mercaptoetanol

0,1 mg blau de bromofenol

Aigua Mil·liQ

- Solució de tinció Blau de Comassie:

45 % MeOH

9,2 % Àcid acètic

0,24% Comassie Blue

Aigua destil·lada

- Solució de destinció:

7% Àcid Acètic

35% MeOH

58% H₂O destil·lada

- Running Buffer (Tampó per la cubeta de gels Acrilamida)

19 mM Glicina

0,02 M Tris

0,01 % SDS

- Gels acrilamida

Apilador (5% Acrilamida): 3,62 mL H₂O destil·lada, 625 µL TRIS·HCl pH=6,8 1M, 625 µL Acrilamida 40%, 50 µL SDS 10%, 50 µL APS 10% i 5 µL TEMED.

Separador (12% Acrilamida): 4,3 mL H₂O destil·lada, 2,5 mL TRIS·HCl pH=8,8 1,5M, 3 mL Acrilamida 40%, 100 µL SDS 10%, 100 µL APS 10% i 4 µL TEMED.

- Solució de Transferència (1L):

3 g Trizma Base

14 g Glicina

200 mL MeOH

H₂O destil·lada

- PBST :

10% PBS 10X (Na₂HPO₄ 0,8M, NaH₂PO₄ 0,2M NaCl 0,1M pH=7,6)

1 % Tween 20

H₂O destil·lada

6.2.2.4. Antibiòtics:

- Ampicil·lina: la concentració final en placa o en medi líquid era de 100 µg/mL, excepte en medi líquid en cultius d'expressió que era de 200 µg/mL.

- Cloramfenicol: la concentració final en la placa o en medi líquid és de 35 µg/mL

6.2.3. **Vectors i Construccions:**

6.2.3.1. Vectors:

pRSET-B¹¹¹:

Vector d'expressió derivat del pUC. Resistència a ampicil·lina. Destacar la presència d'un promotor T7 i un tag aminoterminal:

Promotor T7 : taatacgaactataggg

Lloc d'unió a encebador invers T7: ccaccgctgagcaataactag

Domini d'unió a columna d'afinitat : HHHHHH

Epítip d'unió a anticòs : DLYDDDDK

```

1 gatctcgatc ccgcgaaatt aatacgactc actatagggg gaccacaacg
51 gtttcctctc agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga gatatacata
                                                                M
101 tgcgggggttc tcatcatcat catcatcatg gtatggctag catgactggg
    R G S H H H H H H G M A S M T G
                                                                BamHI SacI
151 ggacagcaaa tgggtcggga tctgtacgac gatgacgata aggatccgag
    G Q Q M G R D L Y D D D D K D P S
    BglIII PvuII BstBI
    XhoI PstI KpnI NcoI EcoRI HindIII
201 ctcgagatct gcagctggta ccatggaatt cgaagcttga tccggctgct
    S R S A A G T M E F E A *
251 aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata
301 actagcataa

```

6.2.3.2. Construccions:

- pRSETsiPLA: Clonatge entre el vector pRSET-B i el fragment de PCR utilitzant els encebadors iPLA2F i iPLA2Rs de la taula 5.1 utilitzant els enzims de restricció XhoI i EcoRI.
- pRSETLiPLA: Clonatge entre el vector pRSET-B i el fragment de PCR utilitzant els encebadors iPLA2F i iPLA2RL de la taula 5.1 utilitzant els enzims de restricció XhoI i EcoRI.
-

6.2.4. **Reacció en Cadena de Polimerasa (PCR)**

iPLA2F	5'-agtcctcgaggacctcttcgactgggtg
iPLA2Rs	5'-gatcgaattctcagtcacgaccatctgcccag
iPLA2RL	5'-gatcgaattctcagggagacagcagcagctggac

Figura 98. Encebadors utilitzats en la reacció de PCR

En les reaccions de PCR es va treballar amb un volum final de 50 μ L amb la polimerasa comercial Platinum[®] Pfx DNA polimerasa (2,5 unitats/ μ L, GibCOBRL) utilitzant com a motlle un vector que contenia la seqüència de la fosfolipasa independent de calci (grup VIA) amb les següents condicions de temperatura (durant 15 cicles):

94°C - 2 minuts

95°C - 30 segons (desnaturalització)

65°C - 30 segons (unió de l'encebador)

68°C - 1 minut (extensió)

68°C - 5 minuts

Els fragments obtinguts es van purificar seguint el protocol del kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

6.2.5. Digestió de DNA amb enzims de restricció

El DNA obtingut i el vector pRSET-B es van digerir amb els enzims de restricció EcoRI i XhoI, utilitzant el tampó Y⁺Tango 2X, que ens va permetre portar a terme les dues digestions alhora; a més a més en la digestió del vector es va addicionar fosfatasa alcalina perquè el vector no es pogués relligar amb si mateix. Es deixà 150 minuts a 37°C.

A continuació es carregà en un gel Agarosa 1%, es retallà al gel i es purificà seguint el protocol de Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

6.2.6. Lligació de fragments de DNA:

Per a dur a terme la lligació s'utilitzà una concentració de fragment de 1,8 μ g/mL, una concentració de vector de 2,5 μ g/mL, amb tres unitats de T4 DNA Lligasa en un volum total de 20 μ L i es deixa tota la nit.

6.2.7. Transformació:

En condicions estèrils es barrejaren 10 ng de DNA amb 100 μ L de cèl·lules competents i s'incubà deu minuts en gel, cinc minuts a 37°C, dos minuts en gel; a continuació s'addicionà 1 mL LB i es deixà agitant 1 hora a 37°C, es va centrifugar cinc minuts a 3000 rpm, es va descartar la major part del sobrenedant i la resta es resuspengué i es plaquejà en una placa d'agar que contenia LB més antibiòtic.

6.2.8. Obtenció de cDNA a partir de les colònies d'una placa (Miniprep)

S'inocularen dos mL de medi de cultiu LB amb ampicil·lina amb una colònia d'una placa de transformació i es deixà créixer tota la nit agitant a 37°C. Seguidament es purificà seguint el procediment indicat en el kit comercial Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

6.2.9. Condicions d'expressió:

S'inoculà una colònia fresca en 2 mL LB amb antibiòtic i es va créixer tota la nit amb agitació a 37°C. A continuació s'inoculà la quantitat necessària en 25 mL LB amb antibiòtic per a una OD₆₀₀=0,1 i es va fer créixer a 37°C fins una OD₆₀₀=0,4.

De la resta de cultiu se n'agafaren 50 µL i es féu una dilució 1:10⁶ i d'aquesta se sembraren uns 100 µL en dues plaques una amb ampicil·lina i una altra sense, i es deixà creixent a 37°C, es comprovà que teníem el mateix nombre de colònies en les dues plaques, això ens assegurava que totes les colònies que teníem contenien el nostre plasmidi.

Un cop crescut l'inòcul s'addicionà IPTG a una concentració final 1mM. Es deixà el cultiu creixent 6 hores 37°C o 30°C segons l'experiment.

Posteriorment es centrifugà el cultiu a 3800 rpm, 4°C durant 6 minuts, es descartà el sobrenedant i es resuspengué el residu en 100 µL de NETN. En aquest punt es llisaren les cèl·lules per xoc tèrmic (excepte en un experiment que es féu mitjançant sonicació) refredant amb N₂ líquid i descongelant a 42°C durant quatre o cinc vegades.

Posteriorment se centrifugà a 14000 rpm, 4°C durant deu minuts, el residu es resuspengué amb 50 µL de NETN i s'addicionaren 50 µL de SDS-PAGE 2X, al sobrenedant s'hi adicionaren 100 µL de SDS-PAGE 2X. Es bulliren les mostres 5 minuts i es carregaren 30 µL en un gel acrilamida al 12%.

Un cop corregut el gel es tenyí durant 20 minuts amb solució de blau de Comassie.

6.2.10. Anàlisi per Western-Blot:

Un cop corregut el gel acrilamida, es retallà un fragment de membrana PVDF (Immobilon™ Transfer Membranes, mida de porus: 0,45 µm, Millipore) de la mida del gel i es rentà 10 segons en MeOH, 5 minuts en H₂O destil·lada i 2 minuts amb solució de transferència.

La transferència es va fer amb el sistema “*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*” (Biorad) durant 3 hores a 120mA.

A continuació la membrana es bloquejà amb una solució de PBST al 5% en llet en pols tota la nit a 4°C, es rentà la membrana 3 cops durant 10 minuts amb PBST i s’incubà 90 minuts amb l’anticòs primari (Anti-Xpress 1:5000), es rentà 3 cops més amb PBST i s’incubà 90 minuts amb l’anticòs secundari (Antiratolí 1:2000).

Per la reacció quimioluminiscent s’utilitzà el kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del proveïdor. Es va contactar i es revelà amb pel·lícules d’autoradiografia.

6.2.11. Expressió de siPLA amb l’addició de BEL

Es van inocular 20 µL d’un cultiu crescut de pRSETsiPLA en BL21(DE3)Rosetta™2 en 2 mL de medi de cultiu LB fresc amb ampicil·lina i cloramfenicol en cinc tubs diferents per tal de tenir una OD₆₀₀=0.1; es van deixar créixer fins una OD₆₀₀=0.4 aleshores es va addicionar als cinc tubs (res, 1 µL DMSO, 1 µL BEL 2 mM en DMSO, 1 µL BEL 20 mM en DMSO, 1 µL BEL 200 mM en DMSO) finalment es va addicionar IPTG per una concentració final de 1mM. Després de 6 hores es va centrifugar a 3800 rpm, 4°C durant 6 minuts, es va descartà el sobrenedant i el residu es va resuspendre amb 80 µL NETN i es van llisar les cèl·lules mitjançant un xoc tèrmic (igual que en l’apartat 6.2.9). Es van addicionar 160 µL SDS-PAGE 2X es bullí durant cinc minuts i es carregà en un gel d’acrilamida.

En aquest experiment no es va centrifugar per separar el residu el sobrenedant ja que només volíem veure si amb l’augment de l’inhibidor augmentava l’expressió de la proteïna de fusió.

6.3. Assaigs d'inhibició.

6.3.1. fosfolipasa independent de Calci (iPLA₂)

Per a realitzar aquest assaig es va utilitzar un substrat radioactiu (1-palmitoil-2-[³H]palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, Amersham, 100.000 cpm/assaig) a una concentració final en l'assaig de 100 µM. El tampó consistia en 100 mM HEPES, pH 7.5, i 5mM EDTA.

Per tal de preparar el medi, es va addicionar Tritón X-100 al substrat amb una relació molar de 4:1. Llavors s'addiciona el tampó i es preparen les micel·les mixtes escalfant a 40°C, vortejant, i col·locant en un bany d'aigua.

Després de preincubar la proteïna (100µg de proteïna homogenada per assaig) amb l'inhibidor (concentració final en l'assaig 25 µM) durant 30 minuts s'addiciona la dissolució del substrat i s'incuba 2 hores a 37°C.

S'atura la reacció addicionant 3.75 volums de cloroform/metanol (1:2). S'extreuen els lípids d'acord amb el procediment de Bligh i Dyer.

Es separa l'àcid palmític lliure (³H) mitjançant cromatografia en capa fina utilitzant una mescla d'eluent (n-hexà/dietil èter/àcid acètic 70:30:1). Es mesura la radioactivitat de la fracció corresponent a l'àcid.

6.3.2. fosfolipasa citosòlica dependent de Calci (cPLA₂)

En aquest cas s'utilitza com a substrat membrana citoplasmàtica amb àcid araquidònic radioactiu (100.000 cpm/assaig); aquestes membranes s'obtenen addicionant àcid araquidònic marcat sobre les cèl·lules U937 durant tota la nit; llavors es separen les membranes per ultracentrifugació. Les membranes s'innactiven abans de l'assaig (5 minuts a 60°C).

S'utilitza com a solució tamponadora HEPES 100 mM, pH 7.5, 1.3 mM de CaCl₂.

Després de preincubar la proteïna (100µg de proteïna homogenada per assaig) amb l'inhibidor (concentració final en l'assaig 25 µM) durant 30 minuts s'addiciona el substrat i s'incuba 1 hora a 37°C. Llavors es segueix el mateix procediment que en l'apartat anterior.

7. Bibliografia

- (1) Kudo, I.; Murakami, M. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, *68-69*, 3-58.
- (2) Balsinde, J.; Balboa, M. A.; Insel, P. A.; Dennis, E. A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 175-189.
- (3) Murakami, M.; Kudo, I. *J Biochem (Tokyo)* **2002**, *131*, 285-92.
- (4) Nigam, S.; Schewe, T. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1488*, 167-81.
- (5) Dennis, E. A. *J Biol Chem.* **1994**, *269*, 13057-60.
- (6) Pickard, R. T.; Chiou, X. G.; Strifler, B. A.; DeFelippis, M. R.; Hyslop, P. A.; Tebbe, A. L.; Yee, Y. K.; Reynolds, L. J.; Dennis, E. A.; Kramer, R. M.; Sharp, J. D. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 19225-31.
- (7) Ackermann, E. J.; Dennis, E. A. *Biochim Biophys Acta.* **1995**, *1259*, 125-136.
- (8) Balsinde, J.; Dennis, E. A. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 16069-72.
- (9) Tang, J.; Kriz, R. W.; Wolfman, N.; Shaffer, M.; Seehra, J.; Jones, S. S. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 8567-75.
- (10) Balboa, M. A.; Balsinde, J.; Jones, S. S.; Dennis, E. A. *J Biol Chem.* **1997**, *272*, 8576-80.
- (11) Ma, Z.; Ramanadham, S.; Kempe, K.; Chi, X. S.; Ladenson, J.; Turk, J. *J Biol Chem.* **1997**, *272*, 11118-27.
- (12) Chakraborti, S. *Cellular Signalling* **2003**, *15*, 637-665.
- (13) Lio, Y.; Dennis, E. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1392*, 320-332.
- (14) Ackermann, E. J.; Kempner, E. S.; Dennis, E. A. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 9227-33.
- (15) Larsson, P. K.; Claesson, H. E.; Kennedy, B. P. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 207-14.
- (16) Winstead, M. V.; Balsinde, J.; Dennis, E. A. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1488*, 28-39.
- (17) Balsinde, J.; Bianco, I. D.; Ackermann, E. J.; Conde-Frieboes, K.; Dennis, E. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 8527-31.
- (18) Lands, W. E.; Hart, P. *J Lipid Res.* **1964**, *15*, 81-7.
- (19) Balboa, M. A.; Varela-Nieto, I.; Killermann Lucas, K.; Dennis, E. A. *FEBS Lett* **2002**, *531*, 12-7.
- (20) Reynolds, L. J.; Morgan, B. P.; Hite, G. A.; Mihelich, E. D.; Dennis, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5172-5177.
- (21) Volwerk, J. J.; Pieterse, W. A.; de Haas, G. H. *Biochemistry* **1974**, *13*, 1446-54.
- (22) Yu, L.; Dennis, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8757-8763.
- (23) Plesniak, L. A.; Boegeman, S. C.; Segelke, B. W.; Dennis, E. A. *Biochemistry.* **1993**, *32*, 5009-16.
- (24) Plesniak, L. A.; Yu, L.; Dennis, E. A. *Biochemistry.* **1995**, *34*, 4943-51.
- (25) Gelb, M. H.; Jain, M. K.; Berg, O. G. *Faseb J.* **1994**, *8*, 916-924.
- (26) Schevitz, R. W.; Bach, N. J.; Carlson, D. G.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Dillard, R. D.; Draheim, S. E.; Hartley, L. W.; Jones, N. D.; Mihelich, E. D.; et al. *Nat Struct Biol.* **1995**, *2*, 458-65.
- (27) Chen, Y.; Dennis, E. A. *Biochim Biophys Acta.* **1998**, *1394*, 57-64.
- (28) Street, I. P.; Lin, H. K.; Lalibere, F.; Ghomashchi, F.; Wang, Z. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5935-5940.
- (29) Seno, K.; Okuno, T.; Nishi, K.; Murakami, Y.; Watanabe, F.; Matura, T.; Wada, M.; Fujii, Y.; Yamada, M.; Ogawa, T.; Okada, T.; Hashizume, H.; Kii, M.; Hara, S.; Hagishita, S.; Nakamoto, S.; Yamada, K.; Chikazawa, Y.; Ueno, M.; Teshirogi, I.; Ono, T.; Ohthani, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1041-1044.
- (30) Kokotos, G.; Six, D. A.; Loukas, V.; Smith, T.; Constantinou-Kokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kotsovolou, S.; Chiou, A.; Beltzner, C. C.; Dennis, E. A. *J Med Chem* **2004**, *47*, 3615-28.
- (31) Stephens, D.; Barbayianni, E.; Constantinou-Kokotou, V.; Peristeraki, A.; Six, D. A.; Cooper, J.; Harkewicz, R.; Deems, R. A.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. *J Med Chem.* **2006**, *49*, 2821-2828.
- (32) Walters, I.; Bennion, C.; Connolly, S.; Croshaw, P. J.; Hardy, K.; Hartopp, P.; Jackson, C. G.; King, S. J.; Lawrence, L.; Mete, A.; Murray, D.; Robinson, D. H.; Stein, L.; Wells, E.; John Withnall, W. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, *14*, 3645-9.

- (33) Connolly, S.; Bennion, C.; Botterell, S.; Croshaw, P. J.; Hallam, C.; Hardy, K.; Hartopp, P.; Jackson, C. G.; King, S. J.; Lawrence, L.; Mete, A.; Murray, D.; Robinson, D. H.; Smith, G. M.; Stein, L.; Walters, I.; Wells, E.; Withnall, W. J. *J Med Chem* **2002**, *45*, 1348-62.
- (34) Rando, R. R. *Science* **1974**, *185*, 320-324.
- (35) Krafft, G. A.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5459-5566.
- (36) Daniels, S. B.; Cooney, E.; Sofia, M. J.; Chakravarty, P. K.; Katzenellenbogen, J. A. *J Biol Chem* **1983**, *258*, 15046-53.
- (37) Hazen, S. L.; Zupan, L. A.; Weiss, R. H.; Getman, D. P.; Gross, R. W. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7227-7232.
- (38) Song, H.; Ramanadham, S.; Bao, S.; Hsu, F.; Turk, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 1061-1073.
- (39) Balsinde, J.; Dennis, E. A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31937-31941.
- (40) Fuentes, L.; Perez, R.; Nieto, M. L.; Balsinde, J.; Balboa, M. A. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 44683-90. Epub 2003 Sep 02.
- (41) Vaddadi, K. S.; Courtney, P.; Gilleard, C. J.; Manku, M. S.; Horrobin, D. F. *Psychiatry Res* **1989**, *27*, 313-23.
- (42) Horrobin, D. F.; Glen, A. I.; Vaddadi, K. *Schizophr Res* **1994**, *13*, 195-207.
- (43) Fenton, W. S.; Hibbeln, J.; Knable, M. *Biol Psychiatry* **2000**, *47*, 8-21.
- (44) Ghomashchi, F.; Loo, R.; Balsinde, J.; Bartoli, F.; Aritz-Castro, R.; Clark, J. D.; Dennis, E. A.; Gelb, M. H. *Biochimia et Biophysica Acta* **1999**, *1420*, 45-56.
- (45) Ackermann, E. J.; Conde-Frieboes, K.; Dennis, E. A. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 445-50.
- (46) Yu, L.; Deems, R. A.; Hajdu, J.; Dennis, E. A. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 2657-64.
- (47) Garrigues, B.; Bertrand, G.; Mafrand, J.-P. *Synthesis* **1984**, *10*, 870-872.
- (48) Kokotos, G.; Kotsovolou, S.; Verger, R. *Chembiochem* **2003**, *4*, 90-5.
- (49) Liang, T. C.; Abeles, R. H. *Biochemistry* **1987**, *26*, 7603.
- (50) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3207-3258.
- (51) Muñoz, L.; Rosa, E.; Bosch, M. P.; Guerrero, A. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3311-3313.
- (52) Lal, G. S.; Pez, G. P.; Syvret, R. G. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1737-1755.
- (53) Robinson, C. H.; Bruce, N. F.; Oliveto, E. P. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 975-980.
- (54) Umemoto, T.; Fukami, S.; Tomizawa, G.; Harasawa, K.; Kawada, K.; Tomita, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8563.
- (55) Santos, R. P.; Lopes, R. S. C.; Lopes, C. C. *Synthesis* **2001**, *6*, 845-848.
- (56) Corey, E. J.; Estreicher, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6294-6295.
- (57) Nef, J. U. *Liebigs Ann. Chem* **1894**, *280*, 264.
- (58) Ballini, R.; Petrini, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1017-1047.
- (59) Hayashi, T.; Senda, T.; Ogasawara, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10716-10717.
- (60) Denmark, S. E.; Matsubashi, H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3479-3486.
- (61) Colvin, E. W. *Silicon reagents in organic synthesis*; Academic Press: San Diego, 1988.
- (62) Wolinsky, J.; Thortenson, J. H.; Killinger, T. A. *J. Org. Chem* **1978**, *43*, 875-881.
- (63) Murphy, D. K.; Alumbaugh, R. L.; Rickborn, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2649-2653.
- (64) Rickborn, B.; Murphy, D. K. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3209.
- (65) Yu, S.-H.; Chung, S. K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2729-2747.
- (66) Murray, R. W.; Singh, M. S.; Williams, B. L.; Moncrieff, H. M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1830-1841.
- (67) de Haas, G. H.; Dijkman, R.; Ransac, S.; Verger, R. *Biochim Biophys Acta.* **1990**, *1046*, 249-57.
- (68) Bhatia, S. K.; Hajdu, J. *Tetrahedron Lett* **1988**, *29*, 31-34.
- (69) Bhatia, S. K.; Hajdu, J. *Lipids.* **1991**, *26*, 1424-30.
- (70) Vogler, W. R.; Olson, A. C.; Hajdu, J.; Shoji, M.; Raynor, R.; Kuo, J. F. *Lipids.* **1993**, *28*, 511-6.
- (71) Hajdu, J.; Sturtevant, J. M. *Chem Phys Lipids.* **1990**, *55*, 323-30.

- (72) García, M. L.; Pascual, J.; González, G.; Palomer, A.; Cabré, M.; Andreu, J. A.; Mauleón, D.; Carganico, G. *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 3165-3177.
- (73) Sanderson, P. E. *Med Res Rev* **1999**, *19*, 179-97.
- (74) Kim, U. T.; Bhatia, S. K.; Hajdu, Joseph *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 6521-6524.
- (75) Howarth, J.; Lloyd, D. G. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2000**, *46*, 625-627.
- (76) Gante, J. *Angew Chem Int Ed* **1994**, *33*, 1699-1720.
- (77) Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishima, H.; Matsuzaki, M.; Hamada, M. *J Antibiot (Tokyo)* **1970**, *23*, 259-62.
- (78) Herold, P. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 354.
- (79) Garner, P.; Parj, J. M.; Malecki, E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4395.
- (80) Timperley, C. M.; Waters, M. J. *J. Fluorine Chem.* **2001**, *109*, 103-111.
- (81) Georg, G. I.; Boge, T. C.; Cheruvallath, Z. S.; Harriman, G. C. B.; Hepperle, M.; Park, H.; Himes, R. H. *Bioorg Med Chem Lett* **1994**, *4*, 335.
- (82) Bertolini, G.; Pavich, G.; Vergani, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6031-6034.
- (83) Qin, Y.; Wang, C.; Huang, Z.; Xiao, X.; Jiang, Y. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8533-8536.
- (84) Egido-Gabas, M.; Serrano, P.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A. *Org Biomol Chem.* **2005**, *3*, 1195-201. Epub 2005 Mar 1.
- (85) Letourneux, Y.; Bourass, J.; Boucrot, P.; Elkihel, L.; Petit, J. Y. *Pharmacol Res* **1997**, *35*, 73-8.
- (86) Chandrakumar, N. S.; Hajdu, J. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1197-1202.
- (87) Triola, G.; Fabrias, G.; Casas, J.; Llebaria, A. *J Org Chem.* **2003**, *68*, 9924-32.
- (88) Triola, G.; Fabrias, G.; Dragusin, M.; Niederhausen, L.; Broere, R.; Llebaria, A.; van Echten-Deckert, G. *Mol Pharmacol.* **2004**, *66*, 1671-8. Epub 2004 Sep 15.
- (89) Triola, G.; Fabrias, G.; Llebaria, A. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2001**, *40*, 1960-1962.
- (90) Taguchi, M.; Sugimoto, K.; Goda, K.-i.; Akama, T.; Yamamoto, K.; Suzuki, T.; Tomishima, Y.; Nishiguchi, M.; Arai, K.; Takahashi, K.; Kobori, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 1963-1966.
- (91) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. *Medicinal Research Reviews* **2003**, *23*, 346-368.
- (92) Transue, T. R.; Gabel, S. A.; London, R. E. *Bioconjug Chem.* **2006**, *17*, 300-8.
- (93) 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.
- (94) Moore, W. J.; Luzzio, F. A. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 6599-6602.
- (95) Lao, K. Y. Y.; Hodgson, D. J.; Dawson, B.; Buist, P. H. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 2799-2802.
- (96) Skrede, S.; Sorensen, H. N.; Larsen, L. N.; Steineger, H. H.; Hovik, K.; Spydevold, O. S.; Horn, R.; Bremer, J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1997**, *1344*, 115-131.
- (97) Dijkstra, B. W.; Drenth, J.; Kalk, K. H. *Nature* **1981**, *289*, 604-6.
- (98) Ward, R. J.; de Azevedo, W. F., Jr.; Arni, R. K. *Toxicol* **1998**, *36*, 1623-33.
- (99) Lauber, K.; Bohn, E.; Krober, S. M.; Xiao, Y. J.; Blumenthal, S. G.; Lindemann, R. K.; Marini, P.; Wiedig, C.; Zobywalski, A.; Baksh, S.; Xu, Y.; Autenrieth, I. B.; Schulze-Osthoff, K.; Belka, C.; Stuhler, G.; Wesselborg, S. *Cell* **2003**, *113*, 717-30.
- (100) Grijalvo, S., Universitat de Barcelona, 2005.
- (101) Pettus, B. J.; Chalfant, C. E.; Hannun, Y. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585*, 114-125.
- (102) Zhang, Z.; Mandal, A. K.; Mital, A.; Popescu, N.; Zimonjic, D.; Moser, A.; Moser, H.; Mukherjee, A. B. *Mol Genet Metab.* **2000**, *70*, 301-9.
- (103) Chang, Y.; Choi, J.; Ding, S.; Prieschl, E. E.; Baumruker, T.; Lee, J.; Chung, S.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1856-1857.
- (104) Crawford, K. W.; Bittman, R.; Chun, J.; Byun, H.-S.; Bowen, W. D. *Cell. Mol. Biol.* **2003**, *49*, 1017-1023.

- (105) Ravid, T.; Tsaba, A.; Gee, P.; Rasooly, R.; Medina, E. A.; Goldkorn, T. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2003**, *284*, 1082-1092.
- (106) Kurinna, S. M.; Tsao, C. C.; Nica, A. F.; Jiffar, T.; Ruvolo, P. P. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7852-6.
- (107) Robert, J. *Curr Opin Investig Drugs.* **2004**, *5*, 1340-7.
- (108) Gonzalez-Roura, A.; Casas, J.; Llebaria, A. *Lipids.* **2002**, *37*, 401-6.
- (109) Amtmann, E. *Drugs Exp Clin Res.* **1996**, *22*, 287-94.
- (110) Lauktien, G.; Volk, F.; Frahm, A. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3457-3466.
- (111) Schoepfer, R. *Gene* **1993**, *124*, 83-5.

8. Annex

