



**DESSATURASES DE MEMBRANA: ESTUDIS MECANÍSTICS,  
CLONATGE I APLICACIONS BIOTECNOLÒGIQUES**

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

**SERGIO RODRÍGUEZ ROPERO**



**DEPARTAMENT DE QUÍMICA ORGÀNICA**

**FACULTAT DE QUÍMICA**

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Programa de Doctorat de Química Orgànica

Bienni 1999-2001

**DESSATURASES DE MEMBRANA: ESTUDIS MECANÍSTICS,  
CLONATGE I APLICACIONS BIOTECNOLÒGIQUES**

Memòria presentada per Sergio Rodríguez Roperó  
per a optar al títol de Doctor en Química

Barcelona, Març de 2003

**Directors:**

**Francesc Camps i Díez**

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

**Tutor:**

**Antoni Riera i Escalé**

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

**Gemma Fabriàs i Domingo**

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



**ÍNDEX**



## ÍNDIX

<b>1. ESTUDI DE LA 1,4-DESSATURASA QUE CATALITZA LA TRANSFORMACIÓ DE L'ÀCID (Z)-11-TETRADECENOIC EN L'ÀCID (E,E)-10,12-TETRADECADIENOIC</b>	<b>3</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS</b>	<b>3</b>
1.1.1. LES DESSATURASES	4
1.1.2. TIPUS DE DESSATURASES	5
1.1.3. CARACTERÍSTIQUES BIOQUÍMIQUES	7
1.1.3.1. Sistema de transport electrònic	7
1.1.3.2. Cofactor metàl·lic: presència de dos àtoms de ferro	8
1.1.3.3. Presència de tres regions conservatives d'histidines	9
1.1.3.4. Mecanisme catalític	10
1.1.4. ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT	12
1.1.5. LES DESSATURASES EN INSECTES	14
1.1.6. LA FEROMONA SEXUAL DE L'ESPÈCIE PLAGA <i>SPODOPTERA LITTORALIS</i>	15
1.1.7. OBJECTIUS	18
<b>1.2. ESTUDI DE LA CRIPTOREGIOQUÍMICA DE LA TRANSFORMACIÓ DE L'ÀCID (Z)-11-TETRADECENOIC EN L'ÀCID (E,E)-10,12-TETRADECADIENOIC CATALITZADA PER UNA 1,4-DESSATURASA</b>	<b>19</b>
1.2.1. DETERMINACIÓ DE LA CRIPTOREGIOQUÍMICA MITJANÇANT EL CÀLCUL DE L'EFECTE ISOTÒPIC PRIMARI (KIE)	20
1.2.2. SÍNTESI I METABOLITZACIÓ DELS 3-TIAÀCIDS DIDEUTERATS <b>34</b> I <b>35</b>	23
1.2.2.1. Síntesi dels anàlegs deuterats <b>34</b> , <b>35</b> i <b>38</b>	25
1.2.2.1.1. Obtenció dels intermedis cetònics <b>8</b> i <b>9</b>	26
1.2.2.1.1.1. Obtenció de la cetona <b>9</b>	26
1.2.2.1.1.2. Obtenció de la cetona <b>8</b>	30
1.2.2.1.2. Obtenció dels 3-tiaàcids dideuterats <b>34</b> i <b>35</b> i del corresponent 3-tiaàcid no deuterat <b>38</b>	32
1.2.2.2. Metabolització dels tiaàcids <b>34</b> , <b>35</b> i <b>38</b> . Resultats i discussió	33
1.2.3. SÍNTESI I METABOLITZACIÓ DEL 3-OXAÀCID <b>39</b> . RESULTATS I DISCUSSIÓ	36
1.2.3.1. Síntesi del 3-oxaàcid <b>39</b>	36
1.2.3.2. Metabolització del 3-oxaàcid <b>39</b>	36
1.2.4. SÍNTESI DELS SUBSTRATS POLIDEUTERATS <b>24</b> , <b>25</b> I <b>28</b> ; DETERMINACIÓ DE LA CRIPTOREGIOQUÍMICA	37
1.2.4.1. Síntesi dels àcids polideuterats <b>24</b> , <b>25</b> i <b>28</b>	37
1.2.4.2. Criptoregioquímica de la 1,4-dessaturasa. Resultats i discussió	40
<b>1.3. ESTEREOESPECIFICITAT</b>	<b>47</b>
1.3.1. MÈTODES DESCRITS PER A DETERMINAR L'ESTEREOESPECIFICITAT DE DESSATURASES	48
1.3.1.1. Mitjançant l'anàlisi dels sulfòxids obtinguts per oxidació de sulfurs	48
1.3.1.2. Mitjançant compostos deuterats enantiomèricament purs	50
1.3.2. SÍNTESI DELS SUBSTRATS DEUTERATS <b>55</b> I <b>56</b>	51
1.3.2.1. Síntesi dels àcids pentadeuterats <b>55</b> i <b>56</b>	52
1.3.2.1.1. Mètodes sintètics descrits a la literatura per obtenir metilcarbinols enantiomèricament purs	53
1.3.2.1.1.1. Mètodes de síntesi de 2-metilcarbinols basats en catàlisi química	53
1.3.2.1.1.2. Mètodes de síntesi de 2-metilcarbinols basats en catàlisi enzimàtica	56
1.3.2.1.2. Síntesi i resolució enzimàtica de <b>43</b> : obtenció de <b>44</b> i <b>45</b>	58
1.3.2.1.2.1. Resolució cinètica de racemats mitjançant lipases	59
1.3.2.1.2.1.1. Efecte del solvent	60

1.3.2.1.2.1.2.	Elecció de l'agent acilant.	60
1.3.2.1.2.1.3.	Efecte de l'adsorció de lipases sobre suports polimèrics	61
1.3.2.1.3.	Obtenció dels àcids polideuterats <b>55</b> i <b>56</b>	65
1.3.3.	ESTEREOESPECIFICITAT DE LA 1,4-DESSATURASA. RESULTATS I DISCUSSIÓ	67
<b>1.4.</b>	<b>ESTUDIS D'INHIBICIÓ DE LES DESSATURASES PRESENTS EN <i>S. LITTORALIS</i> MITJANÇANT CICLOPROPENS</b>	<b>71</b>
1.4.1.	INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	71
1.4.1.1.	Objectius	73
1.4.2.	SÍNTESI DELS ÀCIDS GRASSOS CICLOPROPÈNICS <b>76</b> , <b>77</b> i <b>78</b>	74
1.4.2.1.	Aproximacions sintètiques.	74
1.4.2.2.	Intent de síntesi de <b>76</b> , <b>77</b> i <b>78</b> a partir de trihalociclopropans de cadena llarga	75
1.4.2.2.1.	Síntesi del derivat vinílic a partir de precursors hidroxilats	76
1.4.2.2.2.	Síntesi del derivat vinílic a partir de precursors amb un grup nitril.	78
1.4.2.3.	Intent de síntesi de <b>76</b> , <b>77</b> i <b>78</b> a partir de trihalociclopropans de cadena curta	82
1.4.2.3.1.	Síntesi dels iodurs d'alquil <b>67</b> , <b>68</b> i <b>69</b>	83
1.4.2.3.2.	Síntesi dels trihalociclopropans <b>61</b> , <b>62</b> i <b>63</b>	83
1.4.2.3.3.	Formació dels derivats ciclopropènics <b>70</b> , <b>71</b> i <b>72</b>	84
1.4.2.3.4.	Formació dels àcids <b>76</b> , <b>77</b> i <b>78</b>	90
1.4.2.4.	Síntesi dels derivats ciclopropènics <b>82</b> i <b>83</b>	91
1.4.2.4.1.	Síntesi de l'èter ciclopropènic <b>83</b>	91
1.4.2.5.	Síntesi de l'amina ciclopropènica <b>82</b>	92
1.4.3.	EXPERIMENTS D'INHIBICIÓ DE DESSATURASES	92
1.4.3.1.	Efecte dels àcids <b>76</b> , <b>77</b> i <b>78</b> i dels alcohols <b>73</b> , <b>74</b> i <b>75</b> .	93
1.4.3.1.1.	Inhibició de la dessaturació en C11 de l'àcid mirístic i efecte sobre la seqüència biosintètica	93
1.4.3.1.2.	Inhibició de la dessaturació en C11 de l'àcid palmític	93
1.4.3.1.3.	Inhibició de les dessaturases dels monoens	94
1.4.3.1.4.	Determinació de les IC <sub>50</sub> de l'alcohol <b>73</b> sobre la Δ11 i la Δ9 dessaturasa	96
1.4.3.1.5.	Efecte dels compostos <b>82</b> i <b>83</b>	98
1.4.4.	DISCUSSIÓ	100

## **2. CLONATGE I EXPRESSIÓ FUNCIONAL DEL cDNA QUE CODIFICA LES ACIL-COA DESSATURASES PRESENTS EN *SPODOPTERA LITTORALIS*** 107

<b>2.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>107</b>
2.1.1.	APLICACIÓ DE LA BIOLOGIA MOLECULAR A L'ESTUDI DE LES DESSATURASES INTEGRADES A MEMBRANA D'INSECTES	107
<b>2.2.</b>	<b>OBJECTIUS</b>	<b>108</b>
<b>2.3.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>109</b>
2.3.1.	CLONATGE DEL cDNA QUE CODIFICA LES ACIL-COA DESSATURASES DE <i>S. LITTORALIS</i>	109
2.3.1.1.	Obtenció del material genètic i construcció de les biblioteques de cDNA 5'RACE-cDNA i 3'RACE-cDNA de glàndula feromonal i de cos gras	111
2.3.1.2.	Identificació de les regions centrals (CRs) dels gens que codifiquen les dessaturases presents a la glàndula feromonal i al cos gras de <i>S. littoralis</i>	115
2.3.1.3.	Obtenció de les seqüències completes dels gens que codifiquen les dessaturases presents a la glàndula feromonal i al cos gras de <i>S. littoralis</i>	125
2.3.2.	ASSAIGS FUNCIONALS	136
2.3.2.1.	Assaig funcional dels gens SLG-ORF22 i SLF-ORF	137
2.3.2.2.	Assaig funcional del gen SLG-ORF5	140
2.3.2.3.	Assaig funcional del gen SLG-ORF4	141
<b>2.4.</b>	<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>143</b>



### 3. SÍNTESI ENZIMÀTICA DE L'ÀCID (Z,E)-9,11-OCTADECADIENOIC (CLA) TOT UTILITZANT EL LLEVAT *S. CEREVISIAE*----- 153

<b>3.1. INTRODUCCIÓ</b> -----	<b>153</b>
3.1.1. ÀCIDS GRASSOS DIÈNICS CONJUGATS: ÀCID LINOLEIC CONJUGAT (CLA)-----	153
3.1.2. UTILITZACIÓ DEL LLEVAT <i>S. CEREVISIAE</i> COM A REACTOR BIOQUÍMIC PER A LA FORMACIÓ DEL CLA-----	156
<b>3.2. OBJECTIUS</b> -----	<b>157</b>
<b>3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> -----	<b>158</b>
3.3.1. SÍNTESI DELS ÀCIDS GRASSOS MONOINSATURATS <b>120-123</b> I <b>131-134</b> -----	158
3.3.1.1. Síntesi dels àcids de geometria ( <i>Z</i> ) <b>120-123</b> -----	158
3.3.1.2. Síntesi dels àcids de geometria ( <i>E</i> ) <b>131-134</b> -----	160
3.3.2. SÍNTESI ENZIMÀTICA D'ÀCIDS GRASSOS DIÈNICS MITJANÇANT <i>S. CEREVISIAE</i> . RESULTATS DELS EXPERIMENTS PRELIMINARS -----	161
<b>3.4. EXPERIMENTS FUTURS</b> -----	<b>168</b>

### 4. ESTUDI COMPARATIU DE LA BIOSÍNTESI DE LES FEROMONES SEXUALS DE *THAUMETOPOEA PITYOCAMPA* I *THAUMETOPOEA PROCESSIONEA*.----- 171

<b>4.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS</b> -----	<b>171</b>
4.1.1. INTRODUCCIÓ -----	171
4.1.1.1. La processionària del pi-----	172
4.1.1.2. La processionària del roure-----	174
4.1.2. OBJECTIUS -----	175
<b>4.2. RESULTATS</b> -----	<b>177</b>
4.2.1. SÍNTESI DE L'ÀCID <b>140</b> -----	177
4.2.2. ESTUDIS DE MARCATGE -----	179
4.2.3. FORMACIÓ DE L'ENÍ <b>V</b> EN <i>T. PROCESSIONEA</i> -----	184
4.2.4. CONVERSIÓ DELS ÀCIDS 11-HEXADECINOIC I ( <i>Z</i> )-13-HEXADECEN-11-INOIC EN ELS CORRESPONENTS ACETATS EN <i>T. PROCESSIONEA</i> -----	186
4.2.5. FORMACIÓ DE L'ÀCID ( <i>Z</i> )-9-TRIDECEN-11-INOIC ( <b>IX</b> ) A PARTIR DE L'ÀCID 11- TRIDECINOIC ( <b>170</b> ) EN <i>S. LITTORALIS</i> -----	188
<b>4.3. DISCUSSIÓ</b> -----	<b>191</b>

### 5. SÍNTESI D'ÈSTERS DEL COENZIM A EN FASE SÒLIDA ----- 199

<b>5.1. INTRODUCCIÓ</b> -----	<b>199</b>
<b>5.2. PROCEDIMENTS DESCRITS A LA LITERATURA PER SINTETITZAR DERIVATS DEL COENZIM A</b> -----	<b>200</b>
5.2.1. PROCEDIMENTS ENZIMÀTICS D'OBTENCIÓ D'ACILS-CoA -----	201
5.2.2. PROCEDIMENTS QUÍMICS D'OBTENCIÓ D'ACILS-CoA -----	201
<b>5.3. INTRODUCCIÓ A LA QUÍMICA EN FASE SÒLIDA</b> -----	<b>202</b>
<b>5.4. SÍNTESI DE DERIVATS DEL COENZIM A EN FASE SÒLIDA</b> -----	<b>206</b>
5.4.1. DESCRIPCIÓ DE LES RESINES ESCOLLIDES-----	207
5.4.1.1. Resines tipus PEGA -----	207
5.4.1.2. Resines tipus ArgoPore® -----	209
5.4.2. TRANSFORMACIÓ DE LES RESINES AMB FUNCIONALITAT -NH <sub>2</sub> EN RESINES -SH-----	209
5.4.3. PROVES DE PROTECCIÓ DEL GRUP TIOL DE L'ÀCID <i>P</i> -MERCAPTOBENZOIC -----	210
5.4.3.1. Formació de l'àcid 4-(tetrahidropiraniltio)benzoic ( <b>142</b> ) -----	210
5.4.3.2. Formació de l'àcid 4-( <i>tert</i> -butoxicarboniltio)benzoic ( <b>143</b> ) -----	212
5.4.3.3. Formació de l'àcid 4-(triltio)benzoic ( <b>144</b> )-----	213

5.4.4.	PROVES DE VIABILITAT DE LES REACCIONS EN FASE SÒLIDA SOBRE UN MODEL EN SOLUCIÓ: SÍNTESI DEL TIOACETAT DE <i>S</i> -OCTIL ( <b>141</b> ) PER TRANSTIOESTERIFICACIÓ SOBRE EL TIOACETAT DE <i>S</i> -4-(BENZILCARBAMOÏL)FENIL ( <b>147</b> )-----	214
5.4.4.1.	Formació del tioacetat de <i>S</i> -4-(benzilcarbamoïl)fenil ( <b>147</b> ) -----	215
5.4.4.2.	Transtioesterificació tot emprant l'1-octantiol com a model -----	216
5.4.5.	PREPARACIÓ DE LES RESINES PEGA-SH ( <b>154</b> ) I ARGOPORE <sup>®</sup> -SH ( <b>161</b> ) -----	218
5.4.5.1.	Anàlisi qualitativa i quantitativa de la càrrega de tiols: reactiu d'Ellman-----	220
5.4.6.	FORMACIÓ DELS DIFERENTS ACIL-COA -----	222
5.4.6.1.	Formació de les resines esterificades <b>155-159</b> i <b>162-166</b> -----	223
5.4.6.2.	Formació dels derivats d'acil-CoA <b>148</b> , <b>149</b> , <b>150</b> , <b>151</b> i <b>152</b> -----	224

## **6. PART EXPERIMENTAL**----- **229**

<b>6.1.</b>	<b>QUÍMICA</b> -----	<b>229</b>
6.1.1.	DADES GENERALS -----	229
6.1.2.	SÍNTESI DELS ÀCIDS [2,2,3,3,10,10- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ], -[2,2,3,3,13,13- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ] I [2,2,3,3,- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-TETRADECANOICS ( <b>24</b> , <b>25</b> i <b>28</b> )-----	233
6.1.2.1.	Síntesi del 8-bromooctan-1-ol ( <b>1</b> ) i del 6-bromo-1-hexan-1-ol ( <b>2</b> ) -----	233
6.1.2.2.	Síntesi del 9,11-dioxa-1-bromododecà ( <b>3</b> ) i del 7,9-dioxa-1-bromodecà ( <b>4</b> )-----	233
6.1.2.3.	Síntesi de les cetones <b>8</b> i <b>9</b> -----	234
6.1.2.3.1.	Síntesi de la 12,14-dioxa-2-pentadecanona ( <b>9</b> ) -----	234
6.1.2.3.1.1.	Síntesi del 2-(9,11-dioxadodecil)-3-oxo-butanoat d'etil ( <b>6</b> ) -----	234
6.1.2.3.1.2.	Síntesi de la 12,14-dioxa-2-pentadecanona ( <b>9</b> )-----	235
6.1.2.3.1.2.1.	Mitjançant Na/etilenglicol-----	235
6.1.2.3.1.2.2.	Mitjançant DMSO-LiCl -----	235
6.1.2.3.1.2.3.	Mitjançant DABCO/xilè-----	236
6.1.2.3.2.	Síntesi de la 12,14-dioxa-5-pentadecanona ( <b>8</b> ) -----	236
6.1.2.3.2.1.	Síntesi del 2-butil-1,3-ditià ( <b>5</b> )-----	236
6.1.2.3.2.2.	Síntesi del 2-butil-2-(7,9-dioxadecil)-1,3-ditià ( <b>7</b> )-----	237
6.1.2.3.2.3.	Síntesi de la 12,14-dioxa-5-pentadecanona ( <b>8</b> )-----	237
6.1.2.4.	Síntesi del [2- <sup>2</sup> H]-12,14-dioxa-2-pentadecanol ( <b>11</b> ) i del [5- <sup>2</sup> H]-12,14-dioxa-5-pentadecanol ( <b>10</b> )-----	238
6.1.2.5.	Síntesi del <i>p</i> -toluensulfonat de [2- <sup>2</sup> H]-12,14-dioxa-2-pentadecil ( <b>13</b> ) i del <i>p</i> -toluensulfonat de [5- <sup>2</sup> H]-12,14-dioxa-5-pentadecil ( <b>12</b> ) -----	239
6.1.2.6.	Síntesi del [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-undecan-1-ol ( <b>15</b> ) i del [7,7- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-undecan-1-ol ( <b>14</b> )-----	240
6.1.2.7.	Síntesi del [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-1-bromoundecà ( <b>17</b> ) i del [7,7- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-1-bromoundecà ( <b>16</b> )-----	241
6.1.2.8.	Síntesi del [12,12- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-1-tridecí ( <b>19</b> ), del [9,9- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-1-tridecí ( <b>18</b> ) i del 1-tridecí ( <b>27</b> )	241
6.1.2.9.	Síntesi del [13,13- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-2-tetradecinoat de metil ( <b>21</b> ), [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-2-tetradecinoat de metil ( <b>20</b> ) i del 2-tetradecinoat de metil ( <b>26</b> )-----	243
6.1.2.10.	Síntesi del [2,2,3,3,13,13- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-tetradecanoat de [1,1,1- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-metil ( <b>23</b> ), [2,2,3,3,10,10- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-tetradecanoat de [1,1,1- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-metil ( <b>22</b> ) i del [2,2,3,3- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-tetradecanoat de [1,1,1- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-metil ( <b>29</b> )-----	244
6.1.2.11.	Síntesi de l'àcid [2,2,3,3,13,13- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-tetradecanoic ( <b>25</b> ), l'àcid [2,2,3,3,10,10- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-tetradecanoic ( <b>24</b> ) i l'àcid [2,2,3,3- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-tetradecanoic ( <b>28</b> )-----	245
6.1.3.	SÍNTESI DELS ÀCIDS [13,13- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-TIATETRADECANOIC ( <b>34</b> ), [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-TIATETRADECANOIC ( <b>35</b> ) I 3-TIATETRADECANOIC ( <b>38</b> ) I DE L'ÀCID 3-OXATETRADECANOIC ( <b>39</b> )-----	246
6.1.3.1.	Síntesi dels àcids 3-tiatetradecanoics <b>34</b> , <b>35</b> i <b>38</b> -----	246
6.1.3.1.1.	Síntesi del [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-1-iodoundecà ( <b>30</b> ) i del [7,7- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-1-iodoundecà ( <b>31</b> )-----	246
6.1.3.1.2.	Síntesi de l'1-iodoundecà ( <b>36</b> ) -----	247
6.1.3.1.3.	Síntesi del [13,13- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-tiatetradecanoat de metil ( <b>32</b> ), [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-tiatetradecanoat de metil ( <b>33</b> ) i 3-tiatetradecanoat de metil ( <b>37</b> ) -----	247
6.1.3.1.4.	Síntesi dels àcids [13,13- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-tiatetradecanoic ( <b>34</b> ), [10,10- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-3-tiatetradecanoic ( <b>35</b> ) i 3-tiatetradecanoic ( <b>38</b> )-----	249

6.1.3.2. Síntesi de l'àcid 3-oxatetradecanoic (39)-----	250
6.1.4. SÍNTESI DELS ÀCIDS (R)-[2,2,3,3,13- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-TETRADECANOIC (55) I (S)-[2,2,3,3,13- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-TETRADECANOIC (56)-----	250
6.1.4.1. Síntesi del 10-bromodecan-1-ol (40)-----	250
6.1.4.2. Síntesi del 11-dodecin-1-ol (41)-----	251
6.1.4.3. Síntesi del 11-dodecinal (42)-----	251
6.1.4.4. Síntesi del 12-tridecin-2-ol (43)-----	252
6.1.4.5. Resolució enzimàtica del 12-tridecin-2-ol (43)-----	252
6.1.4.5.1. Formació dels èsters de Mosher.-----	252
6.1.4.5.2. Adsorció d'enzims sobre suports-----	253
6.1.4.5.3. Resolució enzimàtica-----	253
6.1.4.5.4. Obtenció del (R)-(-)-12-tridecin-2-ol (44)-----	254
6.1.4.6. Síntesi del (S)-(+)-metansulfonat de 12-tridecin-2-il (48) i del (R)-(-)-metansulfonat de 12-tridecin-2-il (47)-----	254
6.1.4.7. Síntesi del (R)-[12- <sup>2</sup> H]-1-tridecí (49) i del (S)-[12- <sup>2</sup> H]-1-tridecí (50)-----	255
6.1.4.8. Síntesi del (S)-[13- <sup>2</sup> H]-2-tetradecinoat de metil (52) i del (R)-[13- <sup>2</sup> H]-2-tetradecinoat de metil (51)-----	256
6.1.4.9. Síntesi del (S)-[2,2,3,3,13- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-tetradecanoat de [1,1,1- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-metil (54) i del (R)-[2,2,3,3,13- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-tetradecanoat de [1,1,1- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-metil (53)-----	256
6.1.4.10. Síntesi dels àcids (S)-[2,2,3,3,13- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-tetradecanoic (56) i (R)-[2,2,3,3,13- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-tetradecanoic (55)-----	257
6.1.5. SÍNTESI DELS ÀCIDS CICLOPROPÈNICS 76, 77 i 78-----	258
6.1.5.1. Síntesi del 9-bromononan-1-ol (58)-----	258
6.1.5.2. Síntesi dels derivats 2-(9-bromononiloxi)tetrahidropirà (64), 2-(10-bromodeciloxi)tetrahidropirà (65) i 2-(11-bromoundeciloxi)tetrahidropirà (66)-----	258
6.1.5.3. Intent de formació dels àcids 76, 77 i 78 a través de trihalociclopropans de cadena llarga-----	259
6.1.5.3.1. A partir de derivats tetrahidropiranílics-----	259
6.1.5.3.1.1. Síntesi del 2-(10-undeciniloxi)tetrahidropirà (84), 2-(11-dodeciniloxi)tetrahidropirà (85) i 12-(trideciniloxi)tetrahidropirà (86)-----	259
6.1.5.3.1.2. Intent de iodació del triple enllaç-----	261
6.1.5.3.2. Intent de formació a partir de derivats silílics-----	261
6.1.5.3.2.1. Síntesi del tert-butildifenil-10-undeciniloxisilà (87)-----	261
6.1.5.3.2.2. Intent de iodació del triple enllaç-----	261
6.1.5.3.3. Intent de formació a partir de derivats amb un grup nitril-----	262
6.1.5.3.3.1. Intent de formació del 10-iodo-10-undecenitril (91)-----	262
6.1.5.3.3.1.1. Síntesi de l'11-hidroxoundecanitril (88)-----	262
6.1.5.3.3.1.2. Síntesi de l'11-iodoundecanitril (89)-----	262
6.1.5.3.3.1.3. Intent de formació del 12-tridecinitril (90)-----	262
6.1.5.3.3.1.4. Síntesi del 12-tridecinitril (90) a partir de l'11-dodecin-1-ol (41)-----	263
6.1.5.3.3.1.5. Formació del 12-iodo-12-tridecenitril (91)-----	263
6.1.5.3.4. Síntesi de l'11-(2,2-dibromo-1-iodociclopropil)undecanitril (92)-----	264
6.1.5.3.5. Intent de formació del derivat ciclopropènic amb un grup nitril-----	264
6.1.5.4. Intent de formació dels àcids 76, 77 i 78 a través de trihalociclopropans de cadena curta-----	265
6.1.5.4.1. Síntesi del 2-(9-iodononiloxi)tetrahidropirà (67), 2-(10-iododeciloxi)tetrahidropirà (68) i 2-(11-iodoundeciloxi)tetrahidropirà (69)-----	265
6.1.5.4.2. Síntesi de l'1,1,2-tribromo-2-metilciclopropà (61), 1,1,2-tribromo-2-etilciclopropà (62) i 1,1,2-tribromo-2-propilciclopropà (63)-----	266
6.1.5.4.3. Síntesi del 2-[9-(2-propilcicloprop-1-enil)noniloxi]tetrahidropirà (70), 2-[10-(2-etilcicloprop-1-enil)deciloxi]tetrahidropirà (71) i 2-[11-(2-metilcicloprop-1-enil)undeciloxi]tetrahidropirà (72)-----	267
6.1.5.4.4. Síntesi del 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonan-1-ol (73), 10-(2-etilcicloprop-1-enil)decan-1-ol (74) i 11-(2-metilcicloprop-1-enil)undecan-1-ol (75)-----	268

6.1.5.4.5.	Síntesi dels àcids 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonanoic ( <b>76</b> ), 10-(2-etilcicloprop-1-enil)decanoic ( <b>77</b> ) i 11-(2-metilcicloprop-1-enil)undecanoic ( <b>78</b> )	270
6.1.6.	SÍNTESI DE LA 9-(2-PROPILCICLOPROP-1-ENIL)NONILAMINA ( <b>82</b> ) I DE L'1-(9-METOXINIL)-2-PROPILCICLOPROPÈ ( <b>83</b> )	271
6.1.6.1.	Síntesi de la 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonilamina ( <b>82</b> )	271
6.1.6.1.1.	Síntesi de l'1-bromo-8-iodooctà ( <b>79</b> )	271
6.1.6.1.2.	Síntesi del 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonanitril ( <b>81</b> )	271
6.1.6.1.3.	Síntesi de la 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonilamina ( <b>82</b> )	272
6.1.6.2.	Síntesi de l'1-(9-metoxinil)-2-propilciclopropè ( <b>83</b> )	272
6.1.7.	SÍNTESI DELS ÀCIDS OLEFÍNICS <b>120</b> , <b>121</b> , <b>122</b> , <b>123</b> , <b>131</b> , <b>132</b> , <b>133</b> i <b>134</b>	273
6.1.7.1.	Síntesi del <i>tert</i> -butildimetil-11-dodeciniloxisilà ( <b>104</b> )	273
6.1.7.2.	Síntesi dels àcids de configuració <i>Z</i> , <b>120</b> , <b>121</b> , <b>122</b> i <b>123</b>	274
6.1.7.2.1.	Síntesi del <i>tert</i> -butildimetil-11-trideciniloxisilà ( <b>105</b> ), <i>tert</i> -butildimetil-11-tetradeciniloxisilà ( <b>106</b> ), <i>tert</i> -butildimetil-11-pentadeciniloxisilà ( <b>107</b> ) i del <i>tert</i> -butildimetil-11-hexadeciniloxisilà ( <b>108</b> )	274
6.1.7.2.2.	Síntesi del ( <i>Z</i> )-11-tridecen-1-ol ( <b>116</b> ), ( <i>Z</i> )-11-tetradecen-1-ol ( <b>117</b> ), ( <i>Z</i> )-11-pentadecen-1-ol ( <b>118</b> ) i ( <i>Z</i> )-11-hexadecen-1-ol ( <b>119</b> )	275
6.1.7.2.3.	Síntesi dels àcids ( <i>Z</i> )-11-tridecenoic ( <b>120</b> ), ( <i>Z</i> )-11-tetradecenoic ( <b>121</b> ), ( <i>Z</i> )-11-pentadecenoic ( <b>122</b> ) i ( <i>Z</i> )-11-hexadecenoic ( <b>123</b> )	277
6.1.7.3.	Síntesi dels àcids de configuració <i>E</i> , <b>131</b> , <b>132</b> , <b>133</b> i 134	279
6.1.7.3.1.	Síntesi del 2-(11-trideciniloxi)tetrahidropirà ( <b>109</b> ), 2-(11-pentadeciniloxi)tetrahidropirà ( <b>110</b> ) i 2-(11-hexadeciniloxi)tetrahidropirà ( <b>111</b> )	279
6.1.7.3.2.	Síntesi del 2-(( <i>E</i> )-11-trideceniloxi)tetrahidropirà ( <b>124</b> ), 2-(( <i>E</i> )-11-pentadeceniloxi)tetrahidropirà ( <b>125</b> ) i 2-(( <i>E</i> )-11-hexadeceniloxi)tetrahidropirà ( <b>126</b> )	280
6.1.7.3.3.	Síntesi dels àcids ( <i>E</i> )-11-tridecenoic ( <b>131</b> ), ( <i>E</i> )-11-tetradecenoic ( <b>132</b> ), ( <i>E</i> )-11-pentadecenoic ( <b>133</b> ) i ( <i>E</i> )-11-hexadecenoic ( <b>134</b> )	281
6.1.8.	SÍNTESI DE L'ÀCID ( <i>Z,Z</i> )-11,13-[15,15,16,16,16- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-HEXADECADIENOIC ( <b>140</b> )	283
6.1.8.1.	Síntesi del 2-(11,13-tetradecadiiniloxi)tetrahidropirà ( <b>135</b> )	283
6.1.8.2.	Síntesi del [15,15,16,16,16- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-11,13-hexadecadiin-1-ol ( <b>137</b> )	283
6.1.8.3.	Síntesi del [15,15,16,16,16- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-11,13-hexadecadiinoat de metil ( <b>138</b> )	284
6.1.8.4.	Síntesi del ( <i>Z,Z</i> )-[15,15,16,16,16- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-11,13-hexadecadienoat de metil ( <b>139</b> )	285
6.1.8.5.	Síntesi de l'àcid ( <i>Z,Z</i> )-[15,15,16,16,16- <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-11,13-hexadecadienoic ( <b>140</b> )	286
6.1.9.	SÍNTESI DE DERIVATS DEL COENZIM A EN FASE SÒLIDA	286
6.1.9.1.	Síntesi del tioacetat de <i>S</i> -octil ( <b>141</b> ) per transtioesterificació sobre el tioacetat de <i>S</i> -4-(benzilcarbamoil)fenil ( <b>147</b> )	286
6.1.9.1.1.	Proves de protecció de l'àcid 4-mercaptobenzoic	286
6.1.9.1.1.1.	Síntesi de l'àcid 4-(tetrahidropiraniltio)benzoic ( <b>142</b> )	286
6.1.9.1.1.2.	Síntesi de l'àcid 4-( <i>tert</i> -butoxicarboniltio)benzoic ( <b>143</b> )	287
6.1.9.1.1.3.	Síntesi de l'àcid 4-(tritiltio)benzoic ( <b>144</b> )	287
6.1.9.1.2.	Síntesi del tioacetat de <i>S</i> -4-(benzilcarbamoil)fenil ( <b>147</b> )	288
6.1.9.1.2.1.	Síntesi de la 4-(tritiltio)- <i>N</i> -benzilbenzamida ( <b>145</b> )	288
6.1.9.1.2.2.	Síntesi de la <i>N</i> -benzil-4-mercaptobenzamida ( <b>146</b> )	288
6.1.9.1.2.3.	Síntesi del tioacetat de <i>S</i> -4-(benzilcarbamoil)fenil ( <b>147</b> )	289
6.1.9.1.3.	Síntesi del tioacetat de <i>S</i> -octil ( <b>141</b> ) per transtioesterificació	289
6.1.9.2.	Síntesi de derivats de CoASH mitjançant la reacció de transtioesterificació	290
6.1.9.2.1.	Síntesi de les resines PEGA ( <b>155</b> , <b>156</b> , <b>157</b> , <b>158</b> i <b>159</b> ) i ArgoPore <sup>®</sup> ( <b>162</b> , <b>163</b> , <b>164</b> , <b>165</b> i <b>166</b> )	290
6.1.9.2.1.1.	Síntesi de les resines PEGA-SH ( <b>154</b> ) i ArgoPore <sup>®</sup> -SH ( <b>161</b> )	290
6.1.9.2.1.2.	Síntesi de les resines modificades PEGA ( <b>155</b> , <b>156</b> , <b>157</b> , <b>158</b> i <b>159</b> ) i ArgoPore <sup>®</sup> ( <b>162</b> , <b>163</b> , <b>164</b> , <b>165</b> i <b>166</b> )	291
6.1.9.2.2.	Síntesi de l'acetil-CoA ( <b>148</b> ), 2-metilbutiril-CoA ( <b>149</b> ), ( <i>E</i> )-2-pentenoil-CoA ( <b>150</b> ), palmitoil-CoA ( <b>151</b> ) i 2-cloro-5-nitrobenzoil-CoA ( <b>152</b> )	291
<b>6.2.</b>	<b>BIOQUÍMICA</b>	<b>292</b>
6.2.1.1.	Insectes	292

6.2.1.2. Dissecció de les glàndules feromonals-----	292
6.2.1.3. Tractaments-----	292
6.2.1.3.1. Determinació de l'efecte isotòpic-----	292
6.2.1.3.2. Determinació de l'estereoselectivitat de la 1,4-dessaturasa -----	293
6.2.1.3.3. Experiments d'inhibició per ciclopropens-----	294
6.2.1.3.4. Experiments amb <i>T. processionea</i> -----	294
6.2.1.4. Obtenció d'extractes-----	294
6.2.1.5. Microreaccions-----	295
6.2.1.5.1. Metanolisi-----	295
6.2.1.5.2. Esterificació amb $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ -----	295
6.2.1.5.3. Derivatització d'olefines amb disulfur de dimetil (DMDS)-----	295
6.2.1.5.4. Derivatització de diens conjugats amb 4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-diona (MTAD) ---	295
6.2.1.5.5. Anàlisi instrumental -----	295
6.2.1.6. Anàlisi estadística dels resultats -----	296
<b>6.3. BIOLOGIA MOLECULAR-----</b>	<b>297</b>
6.3.1. DADES GENERALS -----	297
6.3.2. MEDIS UTILITZATS -----	298
6.3.2.1. Medis de cultiu en plaques d'agar-----	298
6.3.2.1.1. Plaques de LB -----	298
6.3.2.1.2. Plaques de YPD -----	298
6.3.2.1.3. Plaques de SD -----	298
6.3.2.2. Medis de cultiu líquids -----	299
6.3.2.2.1. Medi LB-----	299
6.3.2.2.2. Medi YPD-----	299
6.3.2.2.3. Medi SOS -----	299
6.3.2.2.4. Medi SD-----	299
6.3.2.2.5. Medi inductiu SD amb galactosa -----	299
6.3.3. CLONATGE DE LES DIFERENTS DESSATURASES-----	300
6.3.3.1. Aïllament i purificació del mRNA -----	300
6.3.3.2. Construcció de les dues biblioteques de cDNA -----	300
6.3.3.3. Unió dels diferents fragments de DNA als vectors PCR™ 4-TOPO, YEpOLEX i pYES2-----	300
6.3.3.4. Selecció de les colònies positives: PCR colonial-----	301
6.3.3.5. Purificació dels plasmidis-----	301
6.3.3.6. Digestió de les mostres de DNA mitjançant enzims de restricció-----	301
6.3.3.7. Reaccions de PCR -----	302
6.3.3.7.1. Amplificacions de les diferents regions centrals-----	302
6.3.3.7.2. Obtenció dels diferents ORFs -----	302
6.3.3.7.3. Amplificació dels diferents ORFs -----	303
6.3.3.8. Transformació de cèl·lules d' <i>E. coli</i> i de <i>S. cerevisiae</i> -----	304
6.3.4. ASSAIGS FUNCIONALS -----	304
6.3.4.1. Incubacions de <i>S. cerevisiae</i> amb plasmidis YEpOLEX -----	304
6.3.4.2. Incubacions de <i>S. cerevisiae</i> amb plasmidis pYES2-----	305
6.3.4.3. Incubacions amb les soques salvatges (W303a, NCS) i mutada ( $\Delta\text{Elo1}$ )-----	305
6.3.4.4. Preparació d'extractes i anàlisi instrumental-----	306
<b>7. CONCLUSIONS-----</b>	<b>309</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA-----</b>	<b>317</b>



## **ABREVIATURES**





## ABREVIATURES

Al llarg d'aquesta Tesi s'han utilitzat les següents abreviatures:

aa: aminoàcid.

AcOEt: acetat d'etil.

anh: anhidre.

aq: aquós.

atm: atmosfera.

Boc: *tert*-butoxicarbonil.

bp: parell de bases.

BSA: albúmina del sèrum boví.

CCF: cromatografia en capa fina.

cDNA: DNA complementari.

CG-EM: cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses.

CLA: àcid linoleic conjugat

CoA: coenzim A.

CoASH: coenzim A en forma de tiol.

CR: regió central

DABCO: 1,4-diazabicycle-[2.2.2]-octà.

dATP: 2'-desoxiadenosin-5'-trifosfat.

dCTP: 2'-desoxicitidin-5'-trifosfat.

dGTP: 2'-desoxiguanosin-5'-trifosfat.

dTTP: 2'-desoxitimidin-5'-trifosfat.

DHP: dihidropirà.

DIBAH: hidrur de diisobutil alumini.

DIEA: diisopropiletilamina.  
DIPC: diisopropilcarbodiimida.  
DMAP: 4-dimetilaminopiridina.  
DMDS: disulfur de dimetil.  
DMF: *N,N*-dimetilformamida.  
DMPU: 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1*H*)-pirimidinona.  
DMSO: dimetilsulfòxid.  
dT: timidina.  
DTNB: àcid 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoic.  
EDA: etilendiamina.  
EDC: hidrocloreur de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.  
EDTA: sal disòdica de l'àcid etilendiamintetraacètic.  
ee: excés enantiomèric.  
equiv: equivalents.  
Et<sub>3</sub>N: trietilamina.  
Et<sub>2</sub>O: èter dietílic.  
EtOH: etanol.  
FL: seqüència completa del gen.  
GP: Grup Protector.  
GRP: *primer* GeneRacer<sup>®</sup>.  
GRNP: *nested primer* GeneRacer<sup>®</sup>.  
G SNP: *nested primer* específic.  
GSP: *primer* específic.  
HMPA: hexametilfosforamida.  
HPLC: cromatografia de líquid d'alta eficàcia.  
IC<sub>50</sub>: concentració d'inhibidor que produeix un 50% d'inhibició.  
<sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>O: èter diisopropílic.  
IPTG: isopropil-β-(*D*)-tiogalactopiranòsid.  
IR: espectroscòpia d'infraroig.  
kb: kilobase.  
KIE: constant d'efecte isotòpic.  
LB: medi Luria-Bertani.  
M<sup>+</sup>: ió molecular.  
MeOH: metanol.

MOM: dimetoximetil.  
mRNA: RNA missatger.  
MsCl: clorur de mesil.  
MTPA: àcid (*S*)-(-)-metoxitri fluorometilacètic.  
MTAD: 4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-diona.  
*m/z*: relació massa-càrrega.  
NAC: *N*-acetilcisteïna.  
NBS: *N*-bromosuccinimida.  
*n*-BuLi: *n*-butil liti.  
OD<sub>600</sub>: densitat òptica a 600 nm.  
ORF: seqüència del gen que codifica l'enzim (open reading frame).  
PBAN: neuropèptid activador de la biosíntesi de feromona.  
PCR: reacció de polimerasa en cadena.  
PDC: dicromat de piridini.  
PEG: polietilenglicol.  
p.f.: punt de fusió.  
Ph: grup fenil.  
p/p: pes/pes.  
p/v: pes/volum.  
PPL: lipasa pancreàtica de porc.  
PPTS: *p*-toluensulfonat de piridini.  
*p*-TsOH: àcid *p*-toluensulfònic.  
RACE: amplificació ràpida dels extrems del cDNA.  
<sup>1</sup>H-RMN: ressonància magnètica nuclear d'hidrogen.  
<sup>13</sup>C-RMN: ressonància magnètica nuclear de carboni.  
RML: *Rizhomicor miehei*.  
SDVB: polímer d'estirè divinilbenzè.  
SIM: monitorització selectiva d'ions.  
SPOS: síntesi orgànica en fase sòlida.  
ta: temperatura ambient.  
TAE: tampó tris-acetat sòdic-EDTA.  
TBAF: fluorur de tetrabutylamoni.  
TBDMS: *tert*-butildimetilsilil.  
TBDMSCl: clorur de *tert*-butildimetilsilil.

TBDMSTf: triflat de *tert*-butildimetilsilil.

TBDPS: *tert*-butildifenilsilil.

TBDPSCl: clorur de *tert*-butildifenilsilil.

*tert*-BuLi: *tert*-butil liti.

TEMPO: 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinóxid.

TFA: àcid trifluoroacètic.

T<sub>h</sub>: temperatura d'hibridació.

THF: tetrahidrofurà.

THP: tetrahidropirani.

T<sub>m</sub>: temperatura de fusió de cadenes de DNA.

TMSCl: clorur de trimetilsilil.

Tr: tritol.

t<sub>R</sub>: temps de retenció.

UV: ultraviolat.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoïl-β-(*D*)-galactopiranosid.

YNB: base nitrogenada de llevat (yeast nitrogen base).

YPD: extracte de llevat-peptona-dextrosa (yeast extract-peptone-dextrose).

14:Ac: acetat de tetradecanil.

(*Z*)-11-14:Ac: acetat de (*Z*)-11-tetradecenil.

(*E*)-11-14:Ac: acetat de (*E*)-11-tetradecenil.

(*Z*)-9-14:Ac: acetat de (*Z*)-9-tetradecenil.

(*Z*)-11-16:Ac: acetat de (*Z*)-11-hexadecenil.

(*Z,E*)-9,11-14:Ac: acetat de (*Z,E*)-9,11-tetradecadienil.

(*E,E*)-10,12-14:Ac: acetat de (*E,E*)-10,12-tetradecadienil.

(*Z,E*)-9,12-14:Ac: acetat de (*Z,E*)-9,12-tetradecadienil.

(*Z*)-11-13:Acid: àcid (*Z*)-11-tridecenoic.

(*E*)-11-13:Acid: àcid (*E*)-11-tridecenoic.

(*Z,E*)-9,11-13:Acid: àcid (*Z,E*)-9,11-tridecadienoic.

(*E,E*)-10,12-13:Acid: àcid (*E,E*)-10,12-tridecadienoic.

(*Z*)-11-14:Acid: àcid (*Z*)-11-tetradecenoic.

(*E*)-11-14:Acid: àcid (*E*)-11-tetradecenoic.

(*Z*)-9-14:Acid: àcid (*Z*)-9-tetradecenoic.

(*Z*)-11-16:Acid: àcid (*Z*)-11-hexadecenoic.

(*Z,E*)-9,11-14:Acid: àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic.

(*E,E*)-10,12-14:Acid: àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic.

(*Z,E*)-9,11-18:Acid: àcid (*Z,E*)-9,11-octadecadienoic.

(*E,Z*)-10,12-18:Acid: àcid (*E,Z*)-10,12-octadecadienoic.

d<sub>3</sub>14:Acid: àcid [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-tetradecanoic.

d<sub>27</sub>14:Acid: àcid mirístic perdeuterat.

d<sub>3</sub>16:Acid: àcid [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-hexadecanoic.

d<sub>31</sub>16:Acid: àcid palmític perdeuterat.

d<sub>3</sub>(*Z*)-11-14:Acid: àcid [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-(*Z*)-11-tetradecenoic.

d<sub>3</sub>(*E*)-11-14:Acid: àcid [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-(*E*)-11-tetradecenoic.

d<sub>25</sub>(*E*)-11-14:Acid: àcid (*E*)-11-tetradecenoic perdeuterat.

d<sub>9</sub>(*Z*)-11-16:Acid: àcid [13,13,14,14,15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>]-(*Z*)-11-hexadecenoic.

d<sub>5</sub>(*Z,Z*)-11,13-16:Acid: àcid [15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-(*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic.

d<sub>29</sub>(*E*)-11-16:Acid: àcid (*E*)-11-hexadecenoic perdeuterat.

(*Z*)-11-13:Me: (*Z*)-11-tridecenoat de metil.

(*E*)-11-13:Me: (*E*)-11-tridecenoat de metil.

(*Z,E*)-9,11-13:Me: (*Z,E*)-9,11-tridecadienoat de metil.

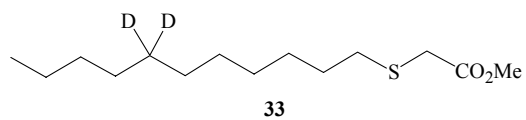
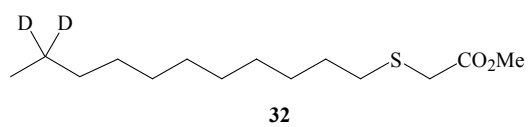
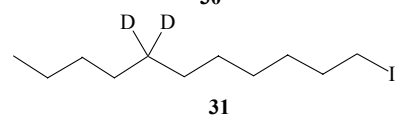
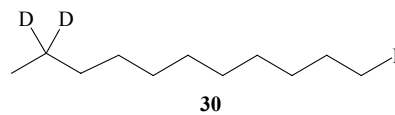
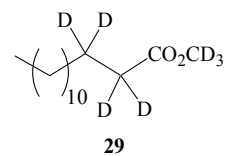
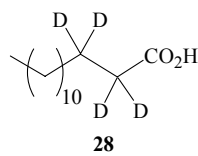
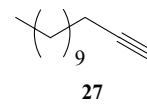
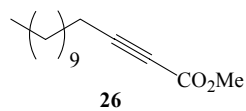
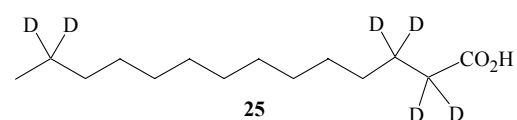
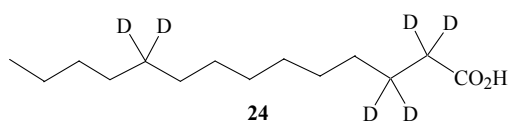
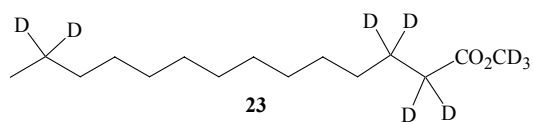
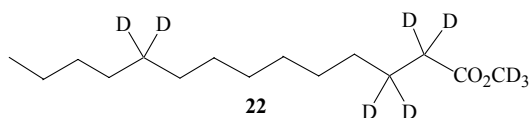
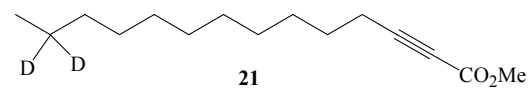
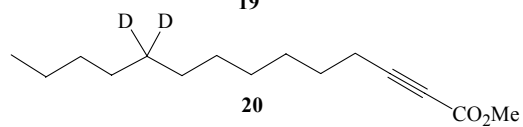
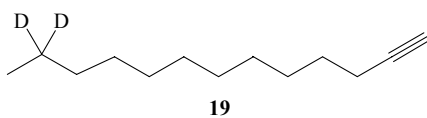
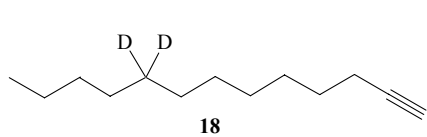
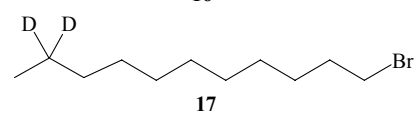
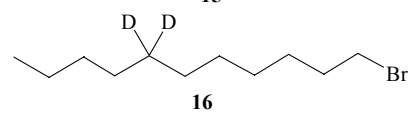
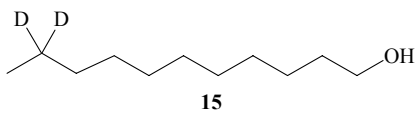
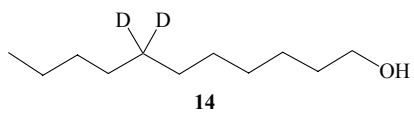
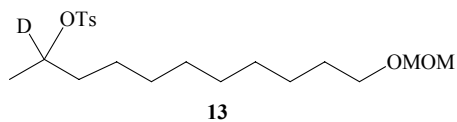
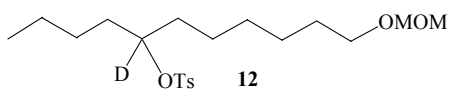
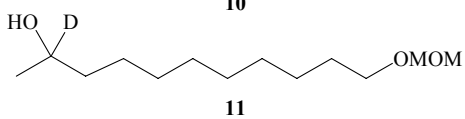
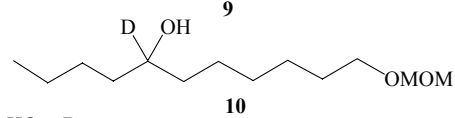
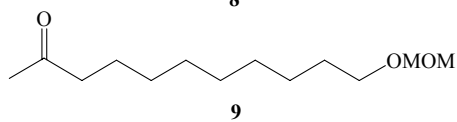
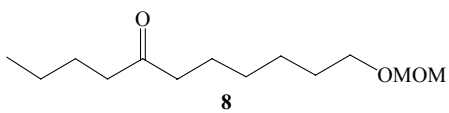
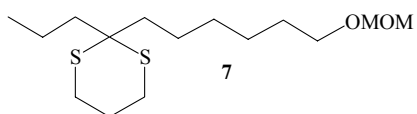
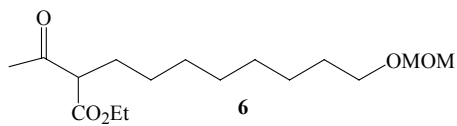
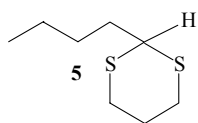
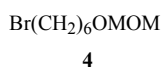
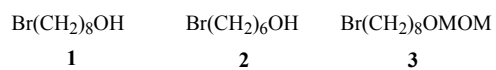
(*E,E*)-10,12-13:Me: (*E,E*)-10,12-tridecadienoat de metil.

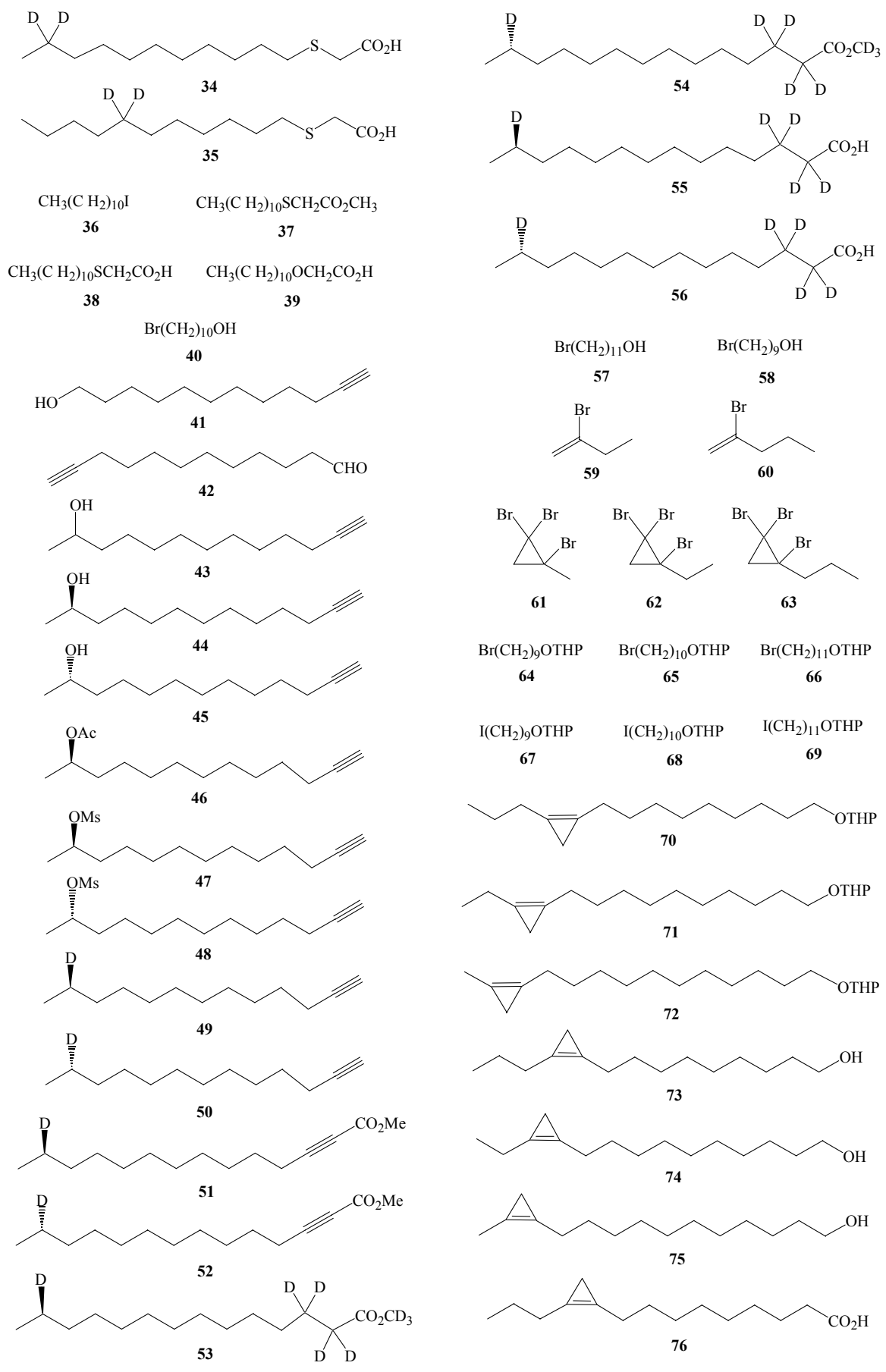
(*Z*)-9,11,11-13:Me: (*Z*)-9-tridecen-11-inoat de metil.  
(*Z*)-11-14:Me: (*Z*)-11-tetradecenoat de metil.  
(*Z,E*)-9,11-14:Me: (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoat de metil.  
(*Z*)-11-15:Me: (*Z*)-11-pentadecenoat de metil.  
(*Z,E*)-9,11-15:Me: (*Z,E*)-9,11-pentadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-9,13-15:Me: (*Z,E*)-9,13-pentadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-11,13-15:Me: (*Z,E*)-11,13-pentadecadienoat de metil.  
(*Z*)-11,13,13-15:Me: (*Z*)-11-pentadecen-13-inoat de metil.  
(*Z*)-11-16:Me: (*Z*)-11-hexadecenoat de metil.  
(*Z,E*)-9,11-16:Me: (*Z,E*)-9,11-hexadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-11,13-16:Me: (*Z,E*)-11,13-hexadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-9,13-16:Me: (*Z,E*)-9,13-hexadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-9,13-17:Me: (*Z,E*)-9,13-heptadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-11,13-17:Me: (*Z,E*)-11,13-heptadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-9,11-18:Me: (*Z,E*)-9,11-octadecadienoat de metil.  
(*Z,E*)-11,13-18:Me: (*Z,E*)-11,13-octadecadienoat de metil.  
d<sub>3</sub>16:Me: [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-hexadecanoat de metil.  
d<sub>3</sub>16:Me: hexadecanoat de metil perdeuterat.  
d<sub>3</sub>(*Z*)-11-16:Me: [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-(*Z*)-11-hexadecenoat de metil.  
d<sub>9</sub>(*Z*)-11-16:Me: [13,13,14,14,15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>]-(*Z*)-11-hexadecenoat de metil.  
d<sub>29</sub>(*Z*)-11-16:Me: (*Z*)-11-hexadecenoat de metil perdeuterat.  
d<sub>3</sub>(*Z,Z*)-11,13-16:Me: [14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-(*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoat de metil.  
d<sub>7</sub>(*Z,Z*)-11,13-16:Me: [13,14,15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-(*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoat de metil.

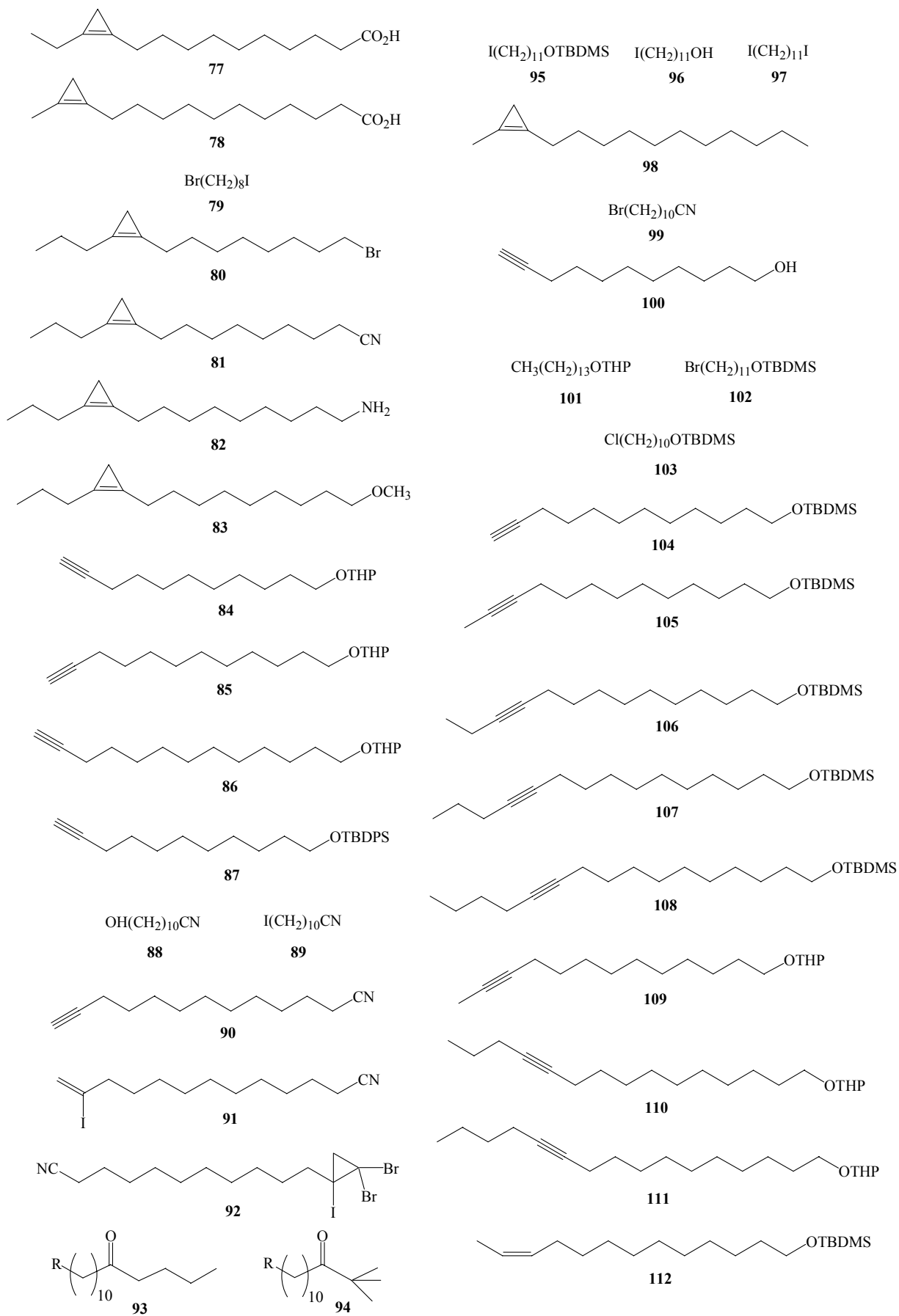
## **ANNEX DE FÓRMULES**

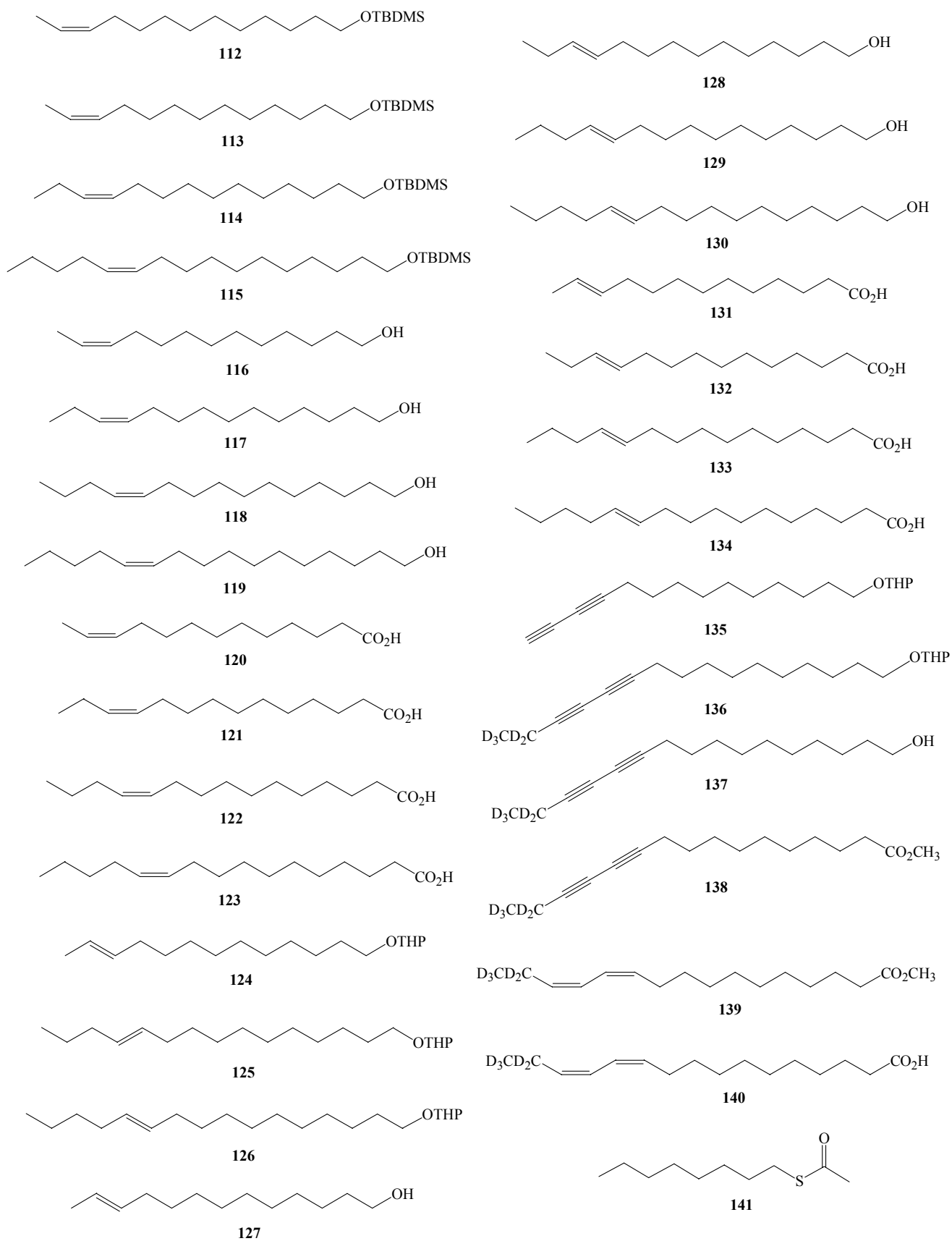


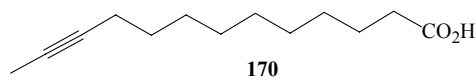
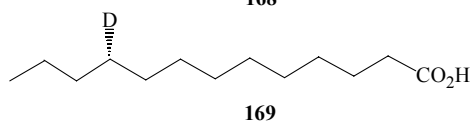
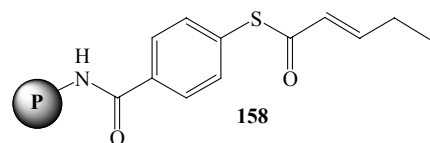
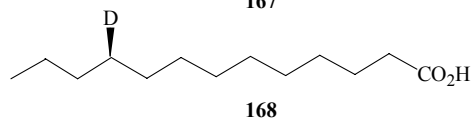
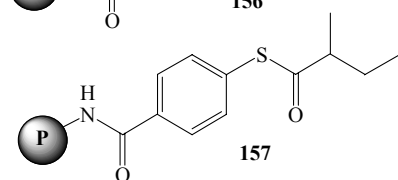
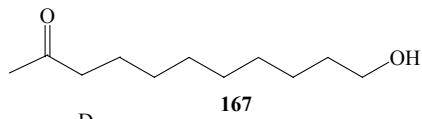
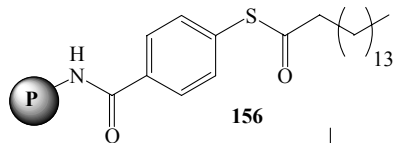
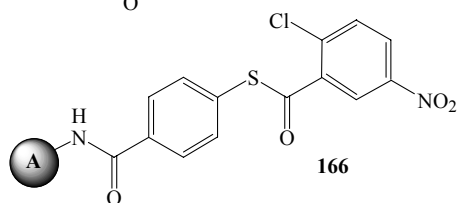
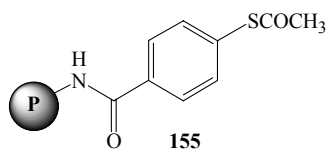
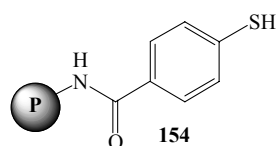
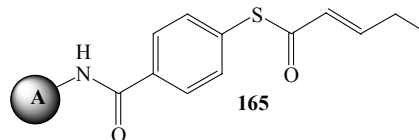
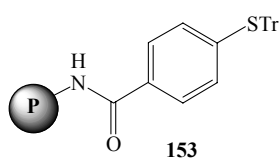
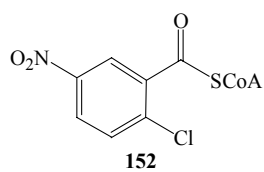
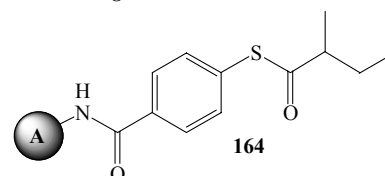
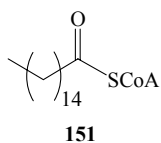
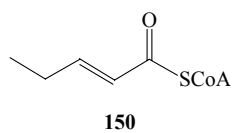
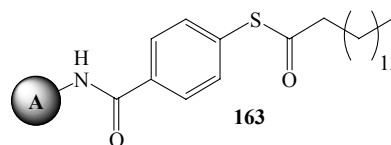
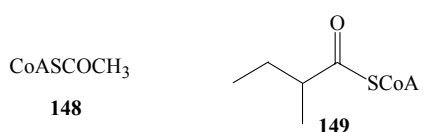
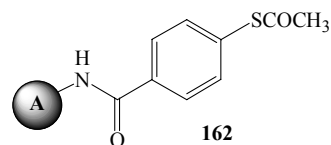
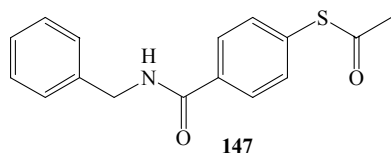
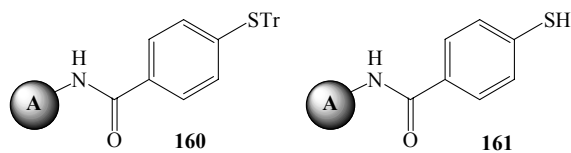
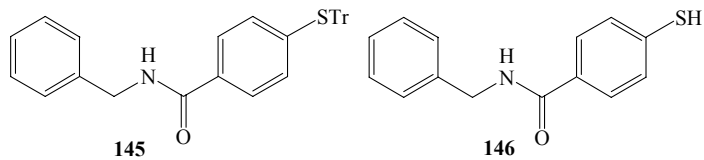
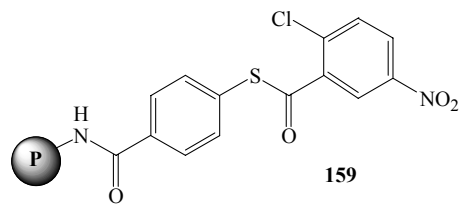
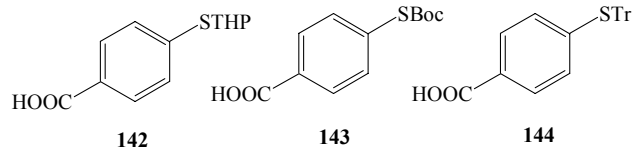














***1.- ESTUDI DE LA 1,4-DESSATURASA QUE CATALITZA  
LA TRANSFORMACIÓ DE L'ÀCID (Z)-11-TETRADECENOIC  
EN L'ÀCID (E,E)-10,12-TETRADECADIENOIC***





# **1. ESTUDI DE LA 1,4-DESSATURASA QUE CATALITZA LA TRANSFORMACIÓ DE L'ÀCID (Z)-11-TETRADECENOIC EN L'ÀCID (E,E)-10,12-TETRADECADIENOIC**

## **1.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS**

El comportament reproductor en moltes espècies d'insectes implica l'alliberament per part de la femella d'uns compostos químics volàtils, anomenats feromones sexuals, els quals són detectats de forma molt específica, a gran distància i en concentracions ínfimes pel mascle, permetent la còpula i la reproducció de l'insecte.

La producció de cada component de la mescla feromonal està subjecte al concurs de reaccions químiques altament específiques les quals tenen lloc a la glàndula feromonal de la femella, glàndula localitzada a prop de l'ovipositor, a la part final de l'abdomen.

Generalment els precursors d'aquestes mescles feromonals són els àcids grassos i els enzims implicats en la seva biosíntesi són: a) l'acetil-CoA carboxilasa i la sintasa d'àcids grassos; b) depenent del grup funcional final present a la feromona es poden trobar reductases, acetiltransferases, oxidases o combinacions d'aquestes; c) dessaturases específiques les quals produeixen tant els àcids grassos monoinsaturats com els poliinsaturats. L'ordre en el qual actuen aquests enzims, determinarà el contingut feromonal final, tot establint-se de forma unívoca una comunicació química altament específica per a una determinada espècie<sup>[1, 2]</sup>.

La sintasa d'àcids grassos de cèl·lules eucariotes és un complex multienzimàtic que transforma l'acetat de partida predominantment en l'àcid hexadecanoic (palmític), sense cap intermediari discernible, tot i que l'àcid octadecanoic és sovint el producte majoritari en alguns insectes. Els àcids grassos d'un nombre superior d'àtoms de carboni són sintetitzats mitjançant enzims d'allargament de cadena. Les cadenes més

curtes s'aconsegueixen mitjançant diversos mecanismes, entre ells la  $\beta$ -oxidació, tot obtenint, en qualsevol cas, àcids grassos amb un nombre parell d'àtoms de carboni.

Generalment, els complexos feromonals presenten funcionalització a la cadena. L'acetat, l'alcohol, i l'aldehid són formes reduïdes dels àcids grassos. La reducció, mitjançant reductases més o menys específiques, forma l'alcohol, el qual pot ésser esterificat al corresponent acetat mitjançant acetiltransferases, o bé oxidat a l'aldehid, etapa catalitzada per oxidases.

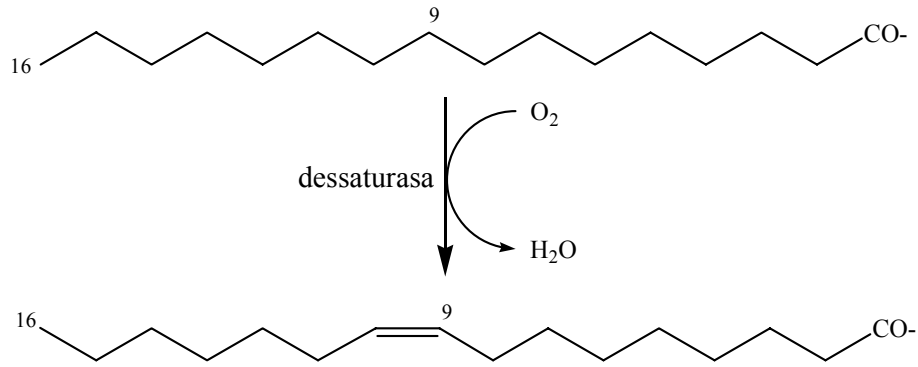
Una altra de les característiques més importants d'aquests semioquímics és la presència de dobles enllaços de diferent configuració en diverses posicions. Aquests dobles enllaços estan formats a partir de l'àcid gras corresponent mitjançant l'actuació d'uns enzims anomenats dessaturases, els quals, bàsicament, eliminen un parell d'àtoms d'hidrogen per formar un doble enllaç. Degut a la seva especificitat, aquests sistemes de dessaturació són molt importants en la composició final de la mescla feromonal; en aquest sentit és possible que un compost amb un doble enllaç de geometria *Z* esdevingui atractiu, mentre que el mateix compost de geometria *E* no presenti cap efecte apreciable sobre el mascle, o presenti inclús un efecte antagònic, de tipus inhibidor.

En la present Tesi doctoral s'abordarà l'estudi, des de diferents punts de vista, d'aquest tipus d'enzim, claus en la major part d'éssers vius.

### **1.1.1. Les dessaturases**

Les dessaturases d'àcids grassos són enzims que catalitzen la introducció de dobles enllaços en una cadena alifàtica mitjançant l'abstracció de dos hidrògens i el concurs d'oxigen molecular, el qual és reduït completament a aigua<sup>[3]</sup> (Figura 1.1). Tant la sintasa d'àcids grassos dels cloroplasts de les plantes com les més complexes presents al citoplasma dels animals, llevats i fongs produeixen àcids grassos saturats, els quals són convertits en àcids grassos insaturats mitjançant la introducció de dobles enllaços en reaccions catalitzades per aquestes dessaturases. Tanmateix, alguns bacteris, com l'*Escherichia coli*, presenten una sintasa d'àcids grassos capaç d'introduir dobles enllaços durant la biosíntesi d'aquests a través de precursors olefínics<sup>[4]</sup>.

La distribució d'aquestes dessaturases és gairebé universal. L'enzim ha estat trobat a tots els organismes exceptuant alguns bacteris com la ja esmentada *E. coli*.



**Figura 1.1.** Dessaturació de l'àcid palmític catalitzada per la  $\Delta 9$  desaturasa per formar l'àcid (Z)-9-palmitoleic.

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

Aquesta reacció enzimàtica no només és important en la formació de les feromones sexuals d'insectes. La desaturació d'àcids grassos és essencial per garantir un funcionament correcte de les membranes<sup>[5]</sup>. A temperatures fisiològiques, els lípids polars que contenen només àcids grassos saturats no poden formar la bicapa lipídica, que és l'estructura fonamental de les membranes biològiques. La introducció d'un número apropiat d'insaturacions en aquests àcids grassos fa decreixer la temperatura de transició de l'estat gel (sòlid) a la fase líquida-cristal·lina i proporciona a la membrana la fluïdesa necessària per portar a terme nombrosos processos bioquímics com ara l'activació d'un gran nombre d'enzims lligats a aquesta.

### 1.1.2. Tipus de desaturases

Existeixen dues classes de desaturases d'àcids grassos evolutivament diferenciades<sup>[6]</sup>:

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

Les dessaturases solubles són molt més estables que les de membrana; aquest fet fa que s'hagin pogut aïllar amb més facilitat i el seu estudi hagi estat més complet, tot permetent l'obtenció de la seva estructura de raigs X[7, 8]. La segona classe està molt més estesa a la natura. El fet de ser-hi presents en llevat i en cianobacteris suggereix que probablement van sorgir primer i que les dessaturases solubles del citosol són una adquisició recent. Tot i això, degut a les dificultats de caire tècnic que implica l'obtenció de grans quantitats de proteïna de membrana purificada, el seu estudi ha estat molt poc desenvolupat. El clonatge del primer gen de dessaturasa, la  $\Delta 9$  estearoil-CoA dessaturasa ( $\Delta X$  on X representa el número de carboni on s'insereix el doble enllaç respecte l'extrem carboxilat) que catalitza la transformació de l'àcid esteàric a àcid oleic, va ser possible gràcies a l'ingent treball de purificació portat a terme per Strittmater i col[9]. Actualment, sense tenir encara una estructura de raigs X d'aquest tipus de proteïna, és molta la informació que s'ha recopilat gràcies a l'adveniment de la biologia molecular.

Els àcids grassos com a tal no són admesos com a substrat d'aquests enzims, és a dir, no són dessaturats *in vivo*, sinó que són modificats pel seu extrem carboxilat mitjançant la unió en forma d'èster a una molècula portadora. Tot atenent als diferents tipus de molècula hom pot trobar 3 tipus de dessaturases[10]:

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

### **1.1.3. Característiques bioquímiques**

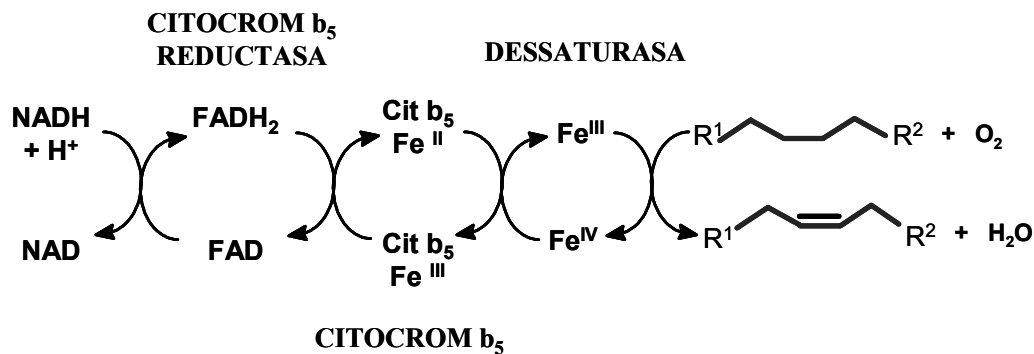
L'abstracció d'hidrògens en una cadena alifàtica no activada, tan enormement difícil químicament, requereix el trencament d'un enllaç C-H aïllat. L'enllaç C-H d'un grup metilè és un dels més estables en els sistemes vius, no en va els éssers estan formats per cadenes hidrocarbonades, afortunadament estables. L'energia de trencament d'aquest enllaç és de 98 Kcal·mol<sup>-1</sup>. Aquesta energia està fora de l'abast de les reaccions catalitzades únicament per aminoàcids. Per tant, es fa necessària la presència d'un cofactor metàl·lic per aprofitar el poder oxidant de l'oxigen i trencar aquest enllaç tot iniciant la modificació de la cadena. Sorprenentment, en canvi, s'abstreuen dos hidrògens, però no s'introdueix cap molècula d'oxigen a la cadena. Bloomfield i Bloch<sup>[11]</sup> van mostrar que la conversió d'un enllaç simple a un de doble, a més d'oxigen, requereix una cadena de transport d'electrons. Això indica que el procés de dessaturació és un procés oxidatiu en eucariotes.

#### **1.1.3.1. Sistema de transport electrònic**

Tant les dessaturases integrades a membrana en plastidis com les solubles depenen d'una proteïna ferredoxina [2Fe-2S] soluble com a agent donador d'electrons<sup>[12]</sup>. Cada doble enllaç requereix 2 electrons, cedits pel NADPH.

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

Les dessaturases unides a membrana generalment utilitzen el citocrom b<sub>5</sub>, el qual rep els electrons del NADH, o en part del NADPH, via dues flavoproteïnes lligades a membrana com són la NADH:citocrom b<sub>5</sub> oxidoreductasa i, probablement molt menys important en aquest context, la NADPH:citocrom P<sub>450</sub> oxidoreductasa<sup>[13]</sup>. L'esquema de formació de dobles enllaços catalitzada per aquests enzims es mostra a la Figura 1.2.



**Figura 1.2** Formació de dobles enllaços catalitzada per dessaturases. Es mostren els components de la cadena de transport electrònic.

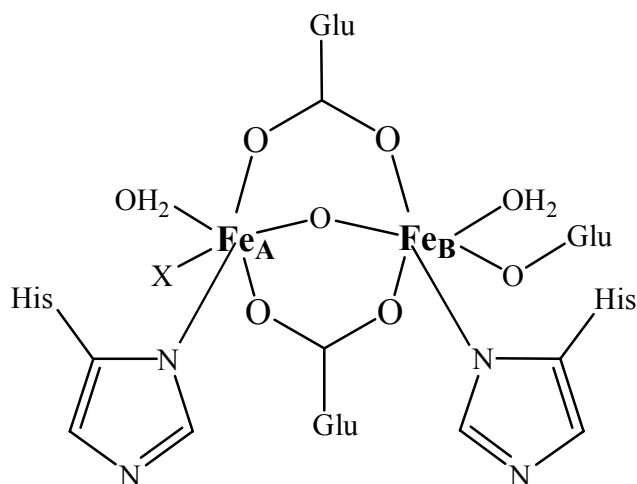
Una altra diferència entre aquests dos sistemes de dessaturació són els potencials electroquímics dels portadors d'electrons implicats. Per a la ferredoxina:NADPH oxidoreductasa, el potencial ( $E^0$ ) és de  $-420$  mV, mentre que per a la NADH:citocrom  $b_5$  oxidoreductasa, el potencial és de  $-24$  mV. Tanmateix, en el sistema lligat a la membrana del reticle endoplasmàtic, la freqüència d'interacció és augmentada perquè el moviment dels components està restringit a les dues dimensions, mentre que en el sistema soluble del citoplasma, el moviment està estès a les 3 dimensions i per tant la probabilitat d'interacció disminueix[6].

### 1.1.3.2. Cofactor metàl·lic: presència de dos àtoms de ferro

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

Els primers estudis portats a terme sobre aquests enzims[9, 14, 15] van demostrar que la seva activitat era sensible a agents quelants de metalls, inhibida per cianur, a més de l'azida sòdica, tot essent insensible al CO, resultat que suggeria que no es tractava d'un cofactor de tipus hemo. L'aïllament del cDNA que codifica la  $\Delta^9$  estearoil-ACP dessaturasa va permetre la sobreexpressió de la mateixa en *E. coli* i la purificació de suficient quantitat per a la seva caracterització biofísica[16]. Les anàlisis d'aquestes dades van revelar la presència de ferro, concretament de dos àtoms de ferro per mol de dessaturasa.

Estudis més avançats tot utilitzant les espectroscòpies de Mössbauer<sup>[17]</sup> i de Raman<sup>[8]</sup> en combinació amb seqüències descrites d'aminoàcids, han demostrat que, efectivament, aquests enzims presenten una agrupació de dos àtoms de ferro units entre sí per un pont de tipus oxo (Fe-O-Fe) o hidroxu (Fe-OH-Fe) situats a l'interior d'una esfera de coordinació formada per lligands nitrogenats i oxigenats. S'estaria parlant, per tant, d'un complex de tipus  $\mu$ -oxo-diferro. Els lligands coordinants són de tipus bidentat: els aminoàcids glutàmic i aspàrtic per l'oxigen i la histidina pel nitrogen (Figura 1.3).



**Figura 1.3** Estructura proposada del complex  $\mu$ -oxo-diferro; s'aprecien els diferents residus d'histidina i d'àcid glutàmic que formen part de l'esfera de coordinació.

Aquests tipus d'agrupació s'ha trobat en diferent enzims els quals catalitzen reaccions molt similars. Els complexos de  $\mu$ -oxo-diferro probablement catalitzen la dessaturació amb obtenció de geometria *trans*<sup>[18, 19]</sup>, conjugació<sup>[20]</sup>, hidroxilació<sup>[6]</sup>, epoxidació, acetilació<sup>[21]</sup>, descarbonilació<sup>[22]</sup>, a més de la clàssica formació de dobles enllaços de geometria *cis*<sup>[8]</sup>. A part dels grups acil, metà<sup>[23]</sup> i anells aromàtics, altres substrats inclouen esterols<sup>[24]</sup>, esfingolípids<sup>[19]</sup>, aldehids<sup>[22]</sup>, etc.

### 1.1.3.3. Presència de tres regions conservatives d'histidines

Excepte per les dessaturases que empren l'ACP com a molècula portadora, les quals presenten una seqüència aminoacídica no relacionada amb les altres, tant les acil-CoA dessaturases com les acil-lípids dessaturases en tots els organismes presenten tres regions altament conservades riques en histidines (8 en total)<sup>[25, 26]</sup>. És de ressaltar

que tant la  $\Delta 9$  dessaturasa de rata i de paparra com les  $\Delta 6$ ,  $\Delta 12$  i  $\Delta 15$  dessaturases de plantes superiors i cianobacteris presenten les tres mateixes regions de seqüència primària que contenen residus d'histidina (regions Ia, Ib i II).

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

Martin i col[25], tot treballant amb dessaturases de llevat i de rata, van proposar un model en el qual cada proteïna presenta grans dominis hidrofòbics, cadascun capaç de travessar la membrana endoplasmàtica dos cops, de tal forma que els tres dominis hidrofílics restants, els quals contenen les tres regions de residus d'histidina, resideixen en la cara citoplasmàtica de la membrana del reticle endoplasmàtic.

Qualsevol mutació en un dels 8 residus d'histidina fa que l'organisme no pugui viure a no ser que se li facilitin els àcids grassos insaturats necessaris pel seu desenvolupament; és a dir, es perd tota l'activitat de dessaturació. De la mateixa forma, si es porten a terme mutacions en qualsevol dels altres residus no conservatius d'histidina, l'organisme és capaç de créixer ja que és capaç d'efectuar la dessaturació[26]. Això suggereix que les histidines juguen un rol vital en el mecanisme catalític. Una de les possibilitats és que actuïn com a lligands dels àtoms de ferro del centre actiu. La presència de residus d'histidina propers en l'espai permet aquest fet. Existeixen suficients residus d'aquest aminoàcid en aquestes seqüències com per a actuar de lligands de dos àtoms de ferro.

#### **1.1.3.4. Mecanisme catalític**

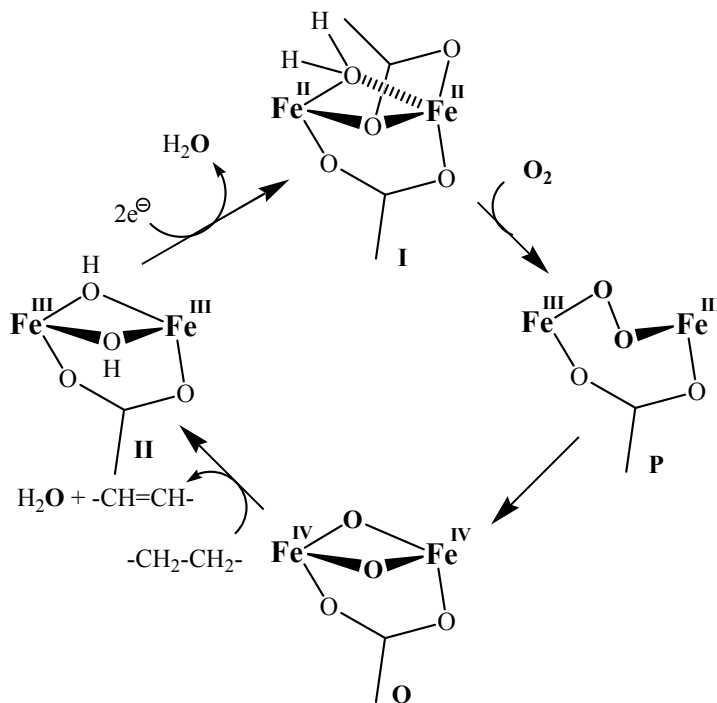
El mecanisme catalític encara no està del tot clar. Estudis realitzats sobre l'enzim metà monooxigenasa (MMO), responsable de l'oxidació del metà a metanol[27] mitjançant la participació d'una agrupació de tipus  $\mu$ -oxo-diferro, demostren la participació d'una espècie altament oxidant com és el Fe(IV).

El mecanisme catalític complet és el que es mostra a la Figura 1.4, tot substituint la molècula de metà per una cadena alifàtica[23].

En estat no actiu, la primera forma que hom troba és **II**, en la qual els dos àtoms de ferro presenten un estat d'oxidació (III) i estan units per un pont d'oxigen formant el



complex  $\mu$ -oxo-diferro. L'activació és iniciada per la cèssió de 2 electrons per part del NADH mitjançant la NADH:citocrom  $b_5$  oxidoreductasa, donant la forma reduïda **I** on cada ferro té un estat d'oxidació de (II).

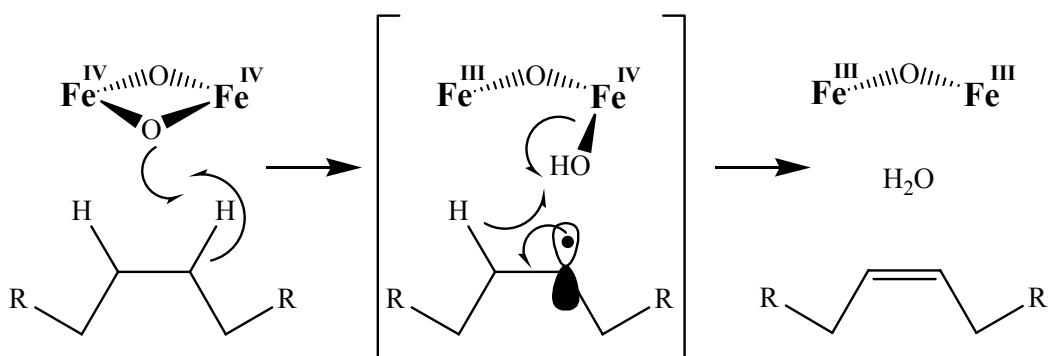


**Figura 1.4** Mecanisme proposat per la formació de dobles enllaços catalitzada per dessaturases, on es poden apreciar els diferents estats d'oxidació del ferro que es troba coordinat amb residus de Glu. No es mostren els residus d'histidina.

Posteriorment, una molècula d'O<sub>2</sub> s'uneix als dos centres metàl·lics donant lloc a un complex  $\mu$ -peroxo (**P**), on els ferros tornen a presentar un estat d'oxidació (III), el qual pateix una reorganització per donar pas al complex catalíticament actiu i de valència alta bis- $\mu$ -oxo-diferro (**Q**), on els àtoms de ferro es troben en un inusual estat d'oxidació (IV). Aquesta forma altament oxidant és la responsable de l'abstracció dels dos àtoms d'hidrogen els quals, en combinació amb un dels àtoms d'oxigen, donarà lloc a una molècula d'aigua, mentre que el segon àtom d'oxigen procedent de l'O<sub>2</sub> molecular es queda formant part del complex  $\mu$ -oxo-diferro (**II**), el qual, mitjançant el concurs de dos electrons, alliberarà una segona molècula d'aigua, tot formant **I** i reiniciant novament el cicle.

Respecte el mecanisme d'abstracció dels hidrògens, semblaria que el més plausible podria ser un de tipus radicalari. En la dessaturació anaeròbica, es forma un

intermedi hidroxilat el qual, posteriorment, és deshidratat i isomeritzat a geometria *cis* o *trans*, segons el cas. Tanmateix, en el cas de la dessaturació d'àcids grassos de forma aeròbica no s'ha pogut detectar aquest compost hidroxilat. Experiments recents mostren que el mecanisme hidroxilació/dessaturació és inconsistent amb els experiments de marcatge obtinguts amb àcids grassos fluorats sobre la  $\Delta 9$  estearoil-CoA dessaturasa de llevat. En canvi, evidències per un mecanisme d'abstracció directa han estat obtingudes amb la mateixa dessaturasa mitjançant estudis d'efecte isotòpic[28]. S'ha observat un efecte isotòpic màxim en la posició 9, però no en la posició 10, resultat que suggereix una abstracció seqüencial d'hidrògens tot començant a la posició 9 i, per tant, tot i que encara manquen algunes evidències, no és gratuït aventurar un mecanisme radicalari com el proposat en la Figura 1.5.



**Figura 1.5** Mecanisme proposat per a la dessaturació de cadenes alifàtiques seguint un model radicalari.

#### 1.1.4. Especificitat de substrat

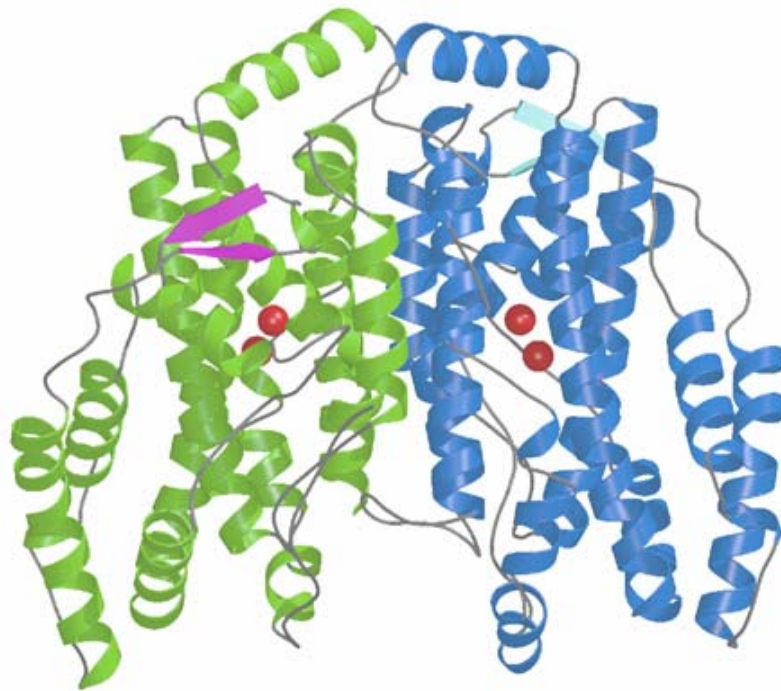
Les dessaturases presenten la capacitat de reconèixer el número de carbonis que conté el substrat, la posició on s'insertarà el nou doble enllaç, i la existència d'altres dobles enllaços preformats a la cadena. El reconeixement de la longitud de l'àcid gras està determinat, principalment, per les propietats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

En contrast amb els enzims solubles, com l'acil-ACP dessaturasa, en els quals la regioespecificitat està determinada respecte el carboni relatiu al carboxilat terminal (és a dir, parlem de  $\Delta X$  dessaturases), les proteïnes de membrana han evolucionat donant fins a tres mètodes diferents de marcatge del doble enllaç emergent[6]:

- La posició del doble enllaç està determinada a partir de l'extrem carboxílic terminal (com en el cas de les dessaturases ACP). Per exemple, la  $\Delta 9$  estearoïl-CoA dessaturasa de rata, insectes i llevat, així com la  $\Delta 6$  dessaturasa de cianobacteris.
- Alguns cianobacteris amb enzims del tipus  $\Delta 15$  posicionen el doble enllaç tot començant pel metil terminal. Parlem, doncs, de les  $\omega 3$  estearoïl-CoA dessaturases.
- Altres espècies no fan servir cap dels dos marcatges, sinó que comencen a comptar a partir d'un doble enllaç ja format.

Ara bé, com s'acomoda el substrat dins l'enzim? És evident que els carbonis on té lloc l'abstracció dels hidrògens han d'estar disposats de manera que restin a prop dels àtoms de ferro. La determinació de l'estructura cristal·lina proporciona una visió global única de l'enzim, en contrast amb la informació que es pugui extreure espectroscòpicament. En el cas de les dessaturases solubles d'àcids grassos, donada la seva elevada estabilitat, s'ha pogut determinar aquesta estructura cristal·lina, concretament la corresponent a la llavor de garrofer, la  $\Delta 9$  estearoïl-ACP dessaturasa [7].

A la Figura 1.6 es mostra l'estructura tridimensional (2 subunitats) de la proteïna on es poden apreciar els àtoms de Fe (2 àtoms per cada subunitat) situats al centre actiu de l'enzim, dins d'un entorn altament simètric. L'estructura cristal·lina confirma la coordinació dels àtoms metàl·lics mostrada en la Figura 1.3. Cada ferro interacciona amb residus de glutàmic i d'histidina i, a més, es troba un residu de glutàmic que coordina els dos àtoms de ferro. Sembla ser que dins de l'estructura terciària de l'enzim existeix una espècie de canal hidrofòbic que representa el lloc d'unió del substrat. Aquest canal s'estén des de la superfície cap a l'interior de cada subunitat, i la forma d'aquest canal situaria la porció d'àcid gras a dessaturar molt a prop del centre difèrric. A més, aquest canal es plega al centre metàl·lic just en un punt corresponent a la inserció del doble enllaç entre la posició 9 i 10, tot justificant l'estereoquímica Z observada en aquesta dessaturació.



---

**Figura 1.6** Estructura tridimensional de la  $\Delta 9$  estearoïl-ACP dessaturasa de garrofer. Les esferes vermelles representen els àtoms de Fe del centre actiu, contigu al canal hidrofòbic on s'acomoda la cadena alifàtica en el procés de dessaturació.

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

#### 1.1.5. Les dessaturases en insectes

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

L'elevada especificitat de les feromones sexuals ha estat demostrada en moltes espècies de lepidòpters. Aquesta especificitat és normalment aconseguida mitjançant mescles, més que amb un únic compost. La màxima resposta en el comportament depèn, no només de la presència de tots els components de la mescla feromonal<sup>[29]</sup>, sinó, i el

que és més important, de l'adequada i precisa proporció entre els diversos components<sup>[30]</sup>. Estudis realitzats sobre la biosíntesi de feromones sexuals en lepidòpters, han mostrat que una combinació d'un nombre reduït de dessaturases juntament amb l'allargament o escurçament de la cadena, pot produir la major part dels components feromonals identificats fins a la data<sup>[2]</sup>.

Aquestes dessaturases pertanyen a la família de les proteïnes integrades a membrana i, per tant, presenten unes característiques, tant a nivell estructural com a nivell mecànic, similars a les descrites en l'apartat 1.1.3. En lepidòpters, i fins a la data, es coneixen bàsicament 7 tipus d'aquests enzims: són la  $\Delta 5$ , la  $\Delta 9$ , la  $\Delta 10$ , la  $\Delta 11$ , la  $\Delta 12$ , la  $\Delta 13$  i la  $\Delta 14$ , destacant, per la seva importància i la seva abundància en moltes espècies, la que forma el doble enllaç en la posició 11 de la cadena i la que actua sobre la posició 9.

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

#### **1.1.6. La feromona sexual de l'espècie plaga *Spodoptera littoralis***

La *S. littoralis* (Figura 1.7) és una arna de l'ordre Lepidoptera, pertanyent a la família dels noctuïds. És una espècie polífaga que representa una important plaga del cotó, blat de moro, alfals, tomàquet, patata i altres tipus de collites hortícoles de la zona de la vessant Mediterrània.



---

**Figura 1.7** Fotografia d'una femella de *S. littoralis*.

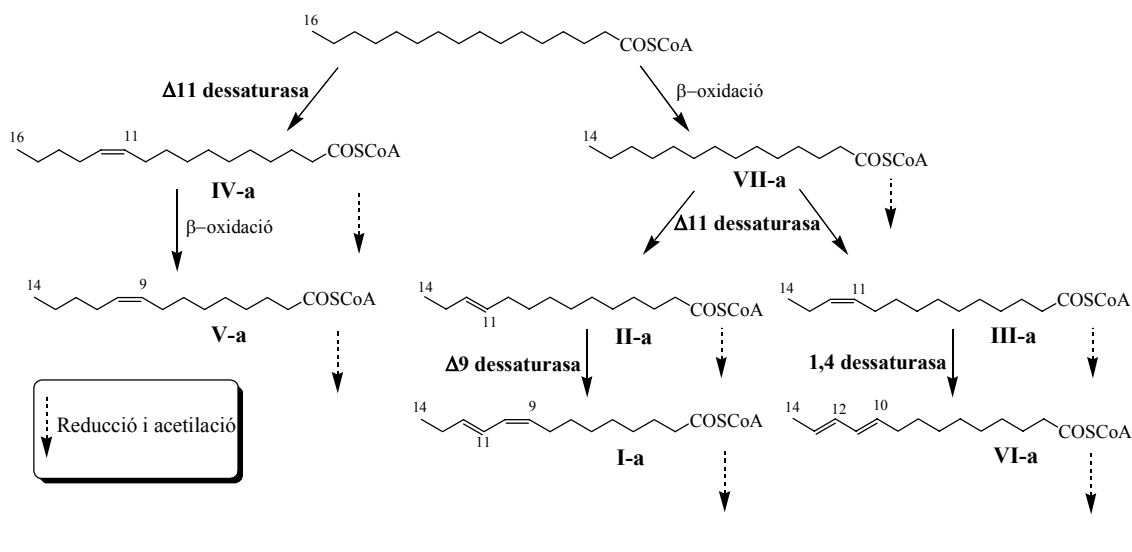
Degut a les importants repercussions econòmiques d'una plaga d'aquesta índole, la composició del seu complex feromonal ha estat àmpliament estudiada[31, 32]. Durant molts anys, en el nostre grup de treball s'ha investigat la biosíntesi de la seva feromona sexual per tal de poder desenvolupar un control integrat d'aquesta plaga en camps de conreu. Se sap que la seva mescla feromonal, tot depenent de la regió, la conformen diferents acetats, tant saturats com insaturats, en proporcions determinades, essent el diè conjugat (*Z,E*)-9,11-14:Ac (**I**) el component actiu majoritari present en totes les mescles. Altres acetats presents són el 14:Ac (**VII**), els acetats monoinsaturats, (*Z*)-11-14:Ac (**III**), (*E*)-11-14:Ac (**II**), (*Z*)-11-16:Ac (**IV**) i (*Z*)-9-14:Ac (**V**), el diinsaturat no conjugat (*Z,E*)-9,12-14:Ac (no present en la colònia criada al nostre laboratori) i el diè conjugat (*E,E*)-10,12-14:Ac (**VI**) (veure Taula 1.1).

**Taula 1.1** Compostos identificats en extractes de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis*.

Acetat de (Z,E)-9,11-tetradecadienil	<b>(I)</b>	(Z,E)-9,11-14:Ac
Acetat de (E)-11-tetradecenil	<b>(II)</b>	(E)-11-14:Ac
Acetat de (Z)-11-tetradecenil	<b>(III)</b>	(Z)-11-14:Ac
Acetat de (Z)-11-hexadecenil	<b>(IV)</b>	(Z)-11-16:Ac
Acetat de (Z)-9-tetradecenil	<b>(V)</b>	(Z)-9-14:Ac
Acetat de (E,E)-10,12-tetradecadienil	<b>(VI)</b>	(E,E)-10,12-14:Ac
Acetat de tetradecil	<b>(VII)</b>	14:Ac
Acetat de (Z,E)-9,12-tetradecadienil	---- <sup>a</sup>	(Z,E)-9,12-14:Ac

<sup>a</sup>Diè no detectat en la colònia criada als nostres laboratoris, però present en altres poblacions de la mateixa espècie.

La biosíntesi de la mescla feromonal de l'espècie criada en els nostres laboratoris es mostra a la Figura 1.8 i comença a partir de l'àcid palmític activat en forma de tioèster de CoA<sup>[32, 33]</sup>. Aquest àcid segueix dues vies diferents, tot produint l'àcid mirístic per acció d'una  $\beta$ -oxidació i el (Z)-11-16:Acid (**IV-a**) per acció d'una dessaturasa de membrana, concretament una  $\Delta$ 11 dessaturasa; posteriorment aquest és  $\beta$ -oxidat tot rendint el (Z)-9-14:Acid (**V-a**). L'àcid mirístic és sotmès a dessaturació mitjançant la  $\Delta$ 11 dessaturasa tot proporcionant una mescla d'àcids monoènics: el (Z)-11-14:Acid (**III-a**) i el (E)-11-14:Acid (**II-a**). L'àcid **II-a** és dessaturat en la posició 9 per una  $\Delta$ 9 dessaturasa per donar el precursor del compost actiu majoritari del complex feromonal, en aquest cas un diè conjugat, el (Z,E)-9,11-14:Acid (**I-a**), i l'àcid **III-a** és sotmès a l'acció d'una 1,4-dessaturasa única<sup>[34]</sup>, la qual converteix un doble enllaç aïllat dins una cadena alifàtica en dos dobles enllaços conjugats per mitjà d'una reacció del tipus deshidrogenació-1,4. Així, el (Z)-11-14:Acid (**III-a**), per acció d'aquest enzim, dona el diè conjugat (E,E)-10,12-14:Acid (**VI-a**). Finalment, mitjançant enzims de tipus reductasa, es transformen els tioèsters de CoA en els corresponents alcohols, els quals són acetilats per acetiltransferases, tot conduint a la mescla feromonal que serà alliberada per la femella per atreure al mascle.



**Figura 1.8** Biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*.

### 1.1.7. Objectius

Els objectius que es plantegen en aquest primer capítol estan destinats a completar els estudis de les dessaturases que intervenen en la ruta biosintètica que condueix al complex feromonal en l'espècie plaga *S. littoralis*. Concretament:

1. Estudi de la criptoregioquímica d'una de les dessaturases que intervenen en la composició de la mescla final. Aquesta és la 1,4-dessaturasa que catalitza el pas de dessaturació de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic a àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic.
2. Estudi de l'estereoespecificitat d'aquesta dessaturasa en la susdita transformació.
3. Estudi de l'efecte de diversos anàlegs ciclopropènics sobre la inhibició de les dessaturases de *S. littoralis*. En aquest sentit s'esperava que una diferent activitat inhibidora permetés discernir el número de dessaturases que intervenen en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*.



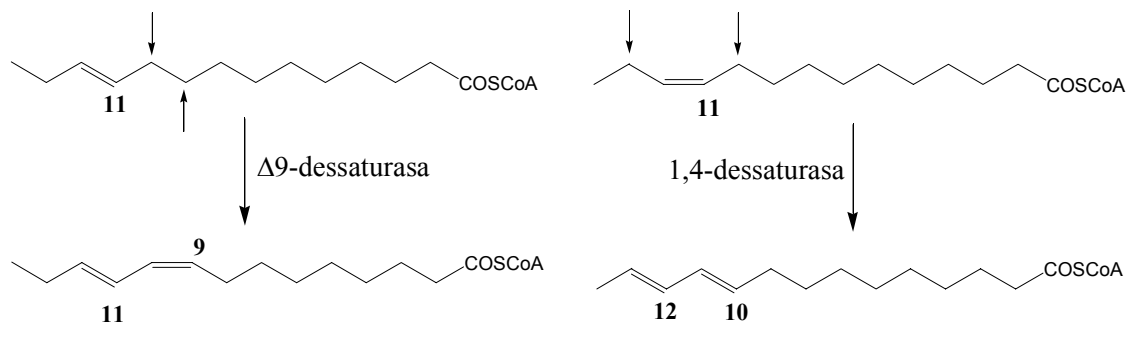
## **1.2. ESTUDI DE LA CRIPTOREGIOQUÍMICA DE LA TRANSFORMACIÓ DE L'ÀCID (Z)-11-TETRADECENOIC EN L'ÀCID (E,E)-10,12-TETRADECADIENOIC CATALITZADA PER UNA 1,4-DESSATURASA**

Com ja s'ha comentat en l'apartat 1.1.1, les acil-CoA dessaturases són uns enzims dependents d'oxigen, que contenen unitats de ferro no hemo, implicats en la introducció de dobles enllaços d'una forma regio i estereoespecífica en cadenes alifàtiques d'àcids grassos<sup>[6]</sup>. Encara que moltes d'aquestes dessaturases utilitzen cadenes saturades per introduir aquests dobles enllaços, també es poden trobar a la natura enzims que fan servir substrats insaturats. Normalment, el compost poliinsaturat que en resulta presenta dobles enllaços no conjugats i d'una configuració *Z*. Tanmateix, àcids grassos que contenen dobles enllaços conjugats amb qualsevol de les dues configuracions possibles, *E* o *Z*, també han estat trobats, tant en algues<sup>[35]</sup>, com en plantes<sup>[20]</sup> com en insectes<sup>[36-38]</sup>. En insectes, la glàndula feromonal conté dessaturases capaces de catalitzar la formació d'àcids grassos amb dobles enllaços conjugats, com l'àcid (*E,Z*)-10,12-hexadecadienoic en l'espècie *Manduca sexta*<sup>[36]</sup>, l'àcid (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic de l'espècie *Thaumetopoea pityocampa*<sup>[39]</sup> o l'àcid (*E,E*)-8,10-dodecadienoic a l'espècie *Cydia pomonella*<sup>[37]</sup> entre altres.

La barreja feromonal de l'insecte *S. littoralis* és un exemple especialment interessant ja que conté dos sistemes diènics conjugats diferents, com són els àcids (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic<sup>[32, 40]</sup> i el (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic<sup>[33]</sup> (vegeu Figura 1.8). Aquest darrer és el precursor d'un component minoritari del complex feromonal, descrit per primer cop per Dunkelblum i col<sup>[31]</sup>, però assignat incorrectament com l'àcid (*Z,Z*)-9,11-tetradecadienoic. Va ser mitjançant estudis conduïts al nostre grup de recerca que es va determinar l'estructura real d'aquest compost<sup>[33]</sup>.

Tal com es veu a la Figura 1.8, un cop es disposa dels dos isòmers *E* i *Z* dels àcids tetradecenoics, l'isòmer *E* és dessaturat en la posició 9 tot formant l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic<sup>[32]</sup>, mentre que l'isòmer *Z* és transformat en el diè conjugat (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic<sup>[33]</sup>. En la dessaturació sobre l'isòmer *E*, tant la localització com la geometria del doble enllaç inicial es mantenen en el diè format, mentre que la dessaturació de l'isòmer *Z* implica la formació d'una segona insaturació amb una transposició concomitant del doble enllaç inicial (Figura 1.9). Es parla doncs, de l'activitat d'una 1,4-dessaturasa. Aquests enzims es poden trobar, a banda d'insectes

com la nostra espècie d'estudi, en plantes, com la *Calendula officinalis*, la qual produeix l'àcid calèndic, (*E,E,Z*)-8,10,12-octadecatrienoic, a partir de l'àcid linoleic, (*Z,Z*)-9,12-octadecadienoic[41, 42].



**Figura 1.9** Formació dels diferents diens conjugats, dependent de la geometria de l'olefina inicial en *S. littoralis*. Les fletxes a la cadena indiquen els carbonis on es situaran els nous dobles enllaços.

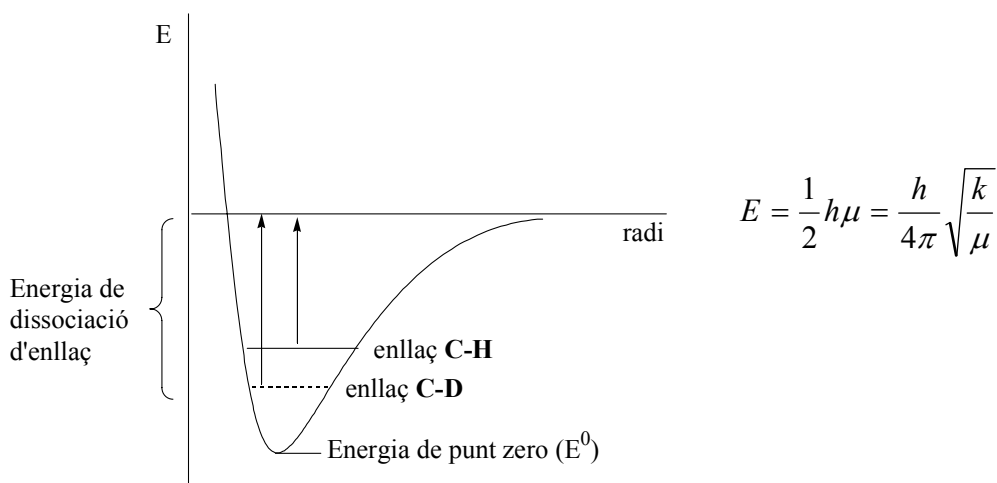
### 1.2.1. Determinació de la criptoregioquímica mitjançant el càlcul de l'efecte isotòpic primari (KIE)

La formació d'un doble enllaç entre dos carbonis mitjançant dessaturases no és un procés estocàstic, sinó que té lloc en un ordre establert dins la cadena hidrocarbonada, fruit de la capacitat que tenen aquests enzims de diferenciar dos carbonis *a priori* químicament idèntics. Com a criptoregioquímica s'entén la posició dins de la cadena alifàtica on té lloc l'oxidació inicial per proporcionar el doble enllaç[28] i que les dessaturases són capaces de discernir de forma absoluta.

La criptoregioquímica es pot arribar a conèixer mitjançant el càlcul de l'anomenat efecte isotòpic primari en experiments competitius tot utilitzant anàlegs deuterats i s'ha aplicat en molts estudis sobre dessaturases, tant solubles[42-44] com integrades a membrana[28, 45, 46].

La substitució d'un àtom en particular pel seu isòtop, en aquest cas l'hidrogen pel deuteri, comporta una sèrie de canvis en les propietats tant físiques (com el punt d'ebullició, espectroscòpia de masses, espectroscòpia d'infraroig, espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear) com químiques (canvi en la cinètica de la reacció) del compost subjecte a estudi. L'explicació cal trobar-la en l'energia de dissociació de l'enllaç C-H respecte de l'enllaç C-D. L'energia d'una vibració i d'altra són diferents. Aquesta energia (*E*), segons la llei de Hooke de l'oscil·lador harmònic, depèn de la

massa relativa dels àtoms ( $\mu$ ), de la constant de Planck ( $h$ ) i d'una constant  $k$  tal i com es pot veure a la Figura 1.10 i Equació 1.1.



**Figura 1.10 i Equació 1.1** Energia de dissociació dels enllaços C-H i C-D, i equació que la defineix.

Quant més gran sigui la massa de l'àtom, més s'aproparà l'energia de dissociació ( $E$ ) a l'energia de punt zero ( $E^0$ ), i per tant més energia serà necessària per trencar aquest enllaç. Donat que la massa de l'àtom d'hidrogen és menor que la de l'àtom de deuteri, l'energia de dissociació de l'enllaç C-H és menor que la corresponent a l'enllaç C-D; per tant, el primer enllaç es trencarà més fàcilment que el segon. A més, segons l'equació d'Arrhenius, l'efecte és més elevat a temperatura ambient que a temperatures altes. A temperatura ambient, la relació entre les constants de dissociació de l'enllaç amb hidrogen i les corresponents amb deuteri (constant d'efecte isotòpic, KIE) és aproximadament de 7,5 (Equació 1.2).

$$KIE = \frac{k_H}{k_D} = \frac{Ae^{-E(C-H)/RT}}{Ae^{-E(C-D)/RT}} = 7,5$$

**Equació 1.2** Relació de les constants de dissociació de l'enllaç C-H respecte del C-D, segons l'equació d'Arrhenius.

A efectes mecanístics, l'existència d'efecte isotòpic indica que hi ha un enllaç C-H que es trenca en una etapa lenta de la reacció. Si, pel cas de les dessaturases, l'abstracció d'un hidrogen en una posició determinada és l'etapa limitant de la velocitat

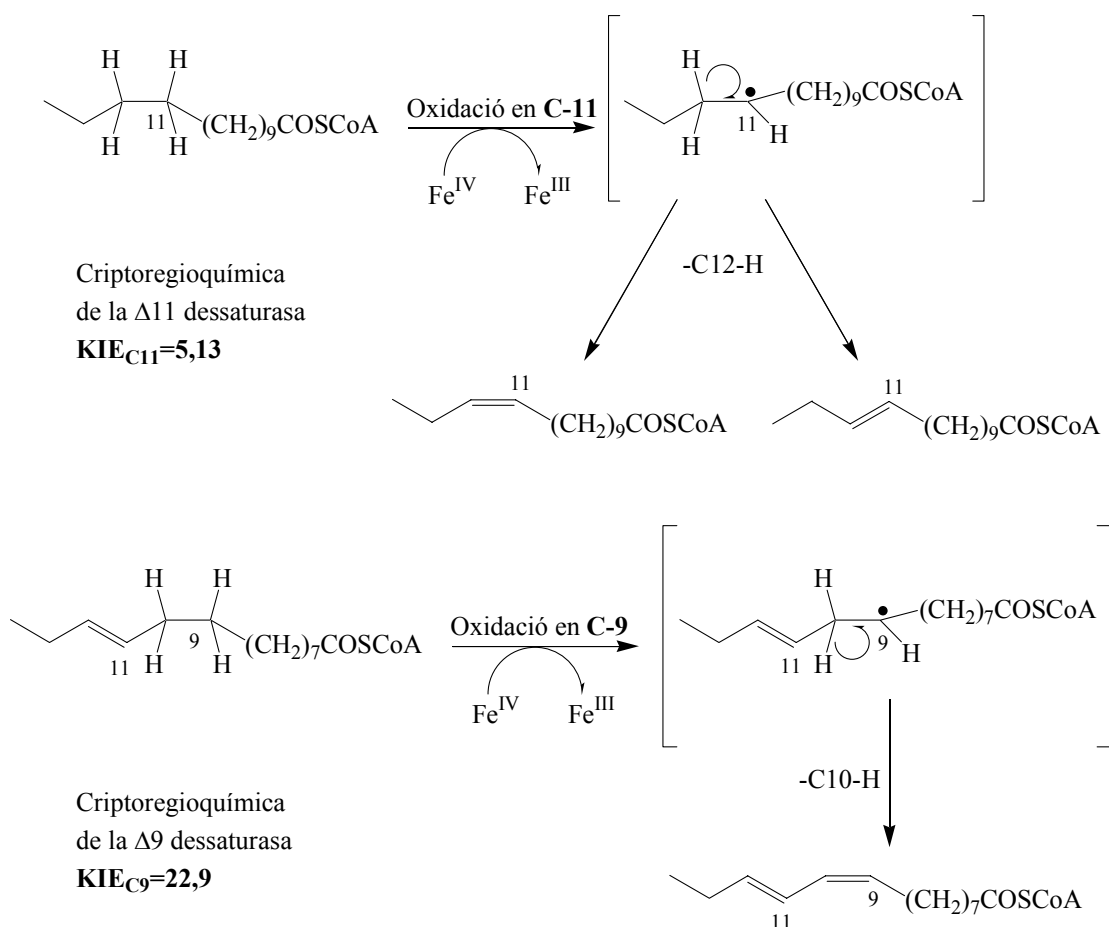
de la reacció, com que l'energia de dissociació de l'enllaç C-H és menor que la de l'enllaç C-D, s'abstraurà més ràpidament un hidrogen que no pas un deuteri, tot exhibint un efecte isotòpic primari elevat; és a dir, una KIE al voltant de 7. Si, per contra, l'etapa limitant no afecta aquell carboni, els dos àtoms, tant l'hidrogen com el deuteri s'abstrauran a velocitats similars. Per tant, no existirà efecte isotòpic i la KIE serà al voltant d'1.

En el cas de l'espècie que ens ocupa, en el nostre grup de treball s'ha dut a terme la determinació de la criptoregioquímica, tant per la  $\Delta 11$  dessaturasa<sup>[46]</sup> que dona lloc als àcids (*Z*) i (*E*)-11-tetradecenoics i l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic, com per la  $\Delta 9$  dessaturasa<sup>[45]</sup>, que forneix l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic.

Pel que respecta a la  $\Delta 11$  dessaturasa, s'ha trobat que l'eliminació d'un hidrogen en el carboni 11, però no pas en el carboni 12, és sensible a la substitució per deuteri, tot mostrant que el pas limitant d'aquesta dessaturació és l'abstracció d'un hidrogen en la posició 11, seguit d'una eliminació ràpida d'un hidrogen en 12, tal com s'observa a la Figura 1.11, amb uns valors de  $KIE_{C11} = 5,13 \pm 0,52$  i  $KIE_{C12} = 1,11 \pm 0,03$ .

El cas de la  $\Delta 9$  dessaturasa resulta més espectacular, ja que mitjançant l'estudi de l'efecte isotòpic cinètic sobre substrats deuterats, es va arribar a la conclusió que l'etapa limitant de la velocitat era l'abstracció d'un hidrogen en la posició 9 de la cadena de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic, tot proporcionant un intermedi homoal·lílic poc estable, que immediatament col·lapsa, perdent ràpidament un hidrogen de la posició 10 per donar el diè conjugat de geometria (*Z,E*)<sup>[45]</sup> (Figura 1.11). Allò que resulta extraordinari és el valor de la  $KIE_{C9}$ , que va resultar ser de  $22,9 \pm 2,8$ , mentre que la  $KIE_{C10}$  era de  $1,0 \pm 0,1$ . Un valor de KIE de 22, triplicava els valors normals d'aquestes constants, tot suggerint la implicació d'un efecte túnel, que explicaria com pot l'enzim realitzar una reacció tan altament energètica com és el trencament d'un enllaç C-H.

Com es pot veure doncs, el desxiframent de la criptoregioquímica resulta ser una eina molt important per tal d'intentar entendre el mecanisme d'acció de les dessaturases.



**Figura 1.11** Criptoregioquímica de la  $\Delta 11$  i la  $\Delta 9$  acil-CoA dessaturases de *S. littoralis*.

Per tal de completar els estudis mecanístics sobre els enzims implicats en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*, es va decidir desxifrar la criptoregioquímica de la 1,4-dessaturasa, que forneix el diè minoritari, l'acetat de (*E,E*)-10,12-tetradecadienil. Els següents apartats tractaran de la síntesi dels precursors deuterats utilitzats per a realitzar aquest estudi.

### 1.2.2. Síntesi i metabolització dels 3-tiaàcids dideuterats 34 i 35

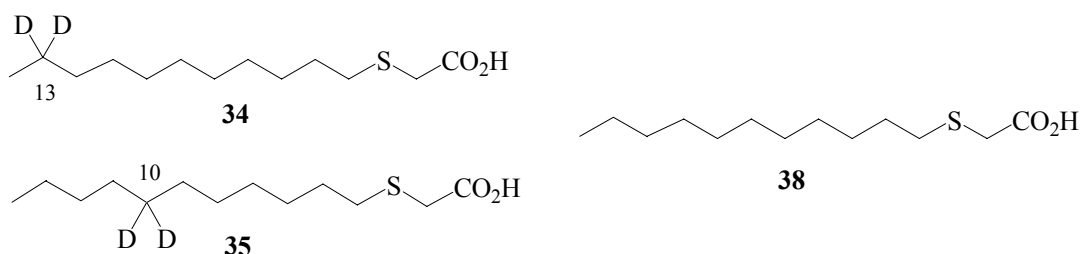
Segons la Figura 1.9, l'àcid diènic (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic s'origina per abstracció d'un hidrogen en la posició 10 i d'un altre en la posició 13. Així doncs, per tal de determinar la KIE, era necessari sintetitzar anàlegs dideuterats tant en la posició 10 com en la posició 13.

En fer servir aquest mètode per trobar les KIE, les interferències degudes a productes endògens no deuterats ( $d_0$ ) presents a la glàndula feromonal han de ser eliminades. Això s'aconsegueix de diverses formes: mitjançant l'ús d'àcids grassos no naturals que puguin ser acceptats com a substrats de l'enzim[45, 46], amb la utilització d'anàlegs que continguin un àtom de sofre en forma de sulfur lluny del lloc de dessaturació[28, 43, 44] o amb anàlegs polideuterats.

A més, donat que les anàlisis dels productes finals es realitzen mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (CG-EM), aquestes petites variacions en l'estructura suposen variacions importants tant en els temps de retenció d'aquests substrats sintètics respecte dels anàlegs endògens, com en el diferent pes molecular, de manera que aquestes anàlisis són més senzilles.

Es va decidir, en primera instància, sintetitzar anàlegs dideuterats, tant a la posició C10 com C13, que portessin un àtom de sofre, en aquest cas, en posició 3, concretament, els àcids **34**, **35** i **38** (Figura 1.12).

L'àtom de sofre és bioisostèric del grup metilè. Quan un àtom de sofre substitueix un grup  $-CH_2-$ , dins d'una cadena carbonada, l'estructura geomètrica de la molècula és alterada només de forma lleugera. L'enllaç C-S és aproximadament un 10% més llarg que el corresponent C-C. D'aquesta forma, la longitud total d'una cadena d'àcid gras que contingui un àtom de sofre s'incrementa només un 3%. Això fa que les propietats químiques dels tiaàcids siguin molt similars a les exhibides pels àcids grassos ordinaris. De fet, en aquest context, els 3-tiaàcids són probablement els més pròxims en quant a estructura i propietats químiques. Això permet la incorporació d'aquests substrats modificats en moltes reaccions metabòliques de la mateixa manera que els àcids grassos no modificats[47], facilitant, a més, el seguiment per CG-EM.



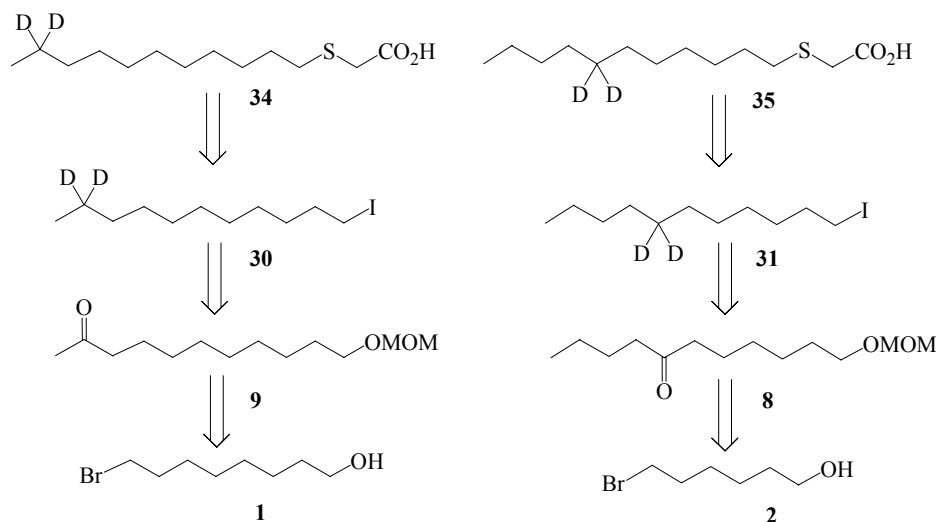
**Figura 1.12** Substrats dideuterats amb un àtom de sofre en la posició 3.

Val a dir que es sintetitza la cadena alifàtica saturada i no amb el doble enllaç *Z* en la posició 11 ja que aquests substrats, un cop administrats a l'insecte, són acceptats i dessaturats per la  $\Delta^{11}$  dessaturasa<sup>[48]</sup> tot donant els dos monoens (*E* i *Z*). Serà el monoè *Z* dideuterat portant l'àtom de sofre en 3 preparat *in vivo*, doncs, el veritable substrat de la 1,4-dessaturasa.

Evidentment, donat que es determinen les KIE intermoleculars en experiments competitius amb substrats no deuterats exògens a l'insecte, la síntesi de l'anàleg no deuterat mantenint el sofre en 3 (**38**) és també necessària.

### 1.2.2.1. Síntesi dels anàlegs deuterats 34, 35 i 38

L'anàlisi retrosintètica proposada per **34** i **35** (**38** es sintetitza de manera anàloga partint del corresponent iodur d'alquil **36**) es mostra a la Figura 1.13.



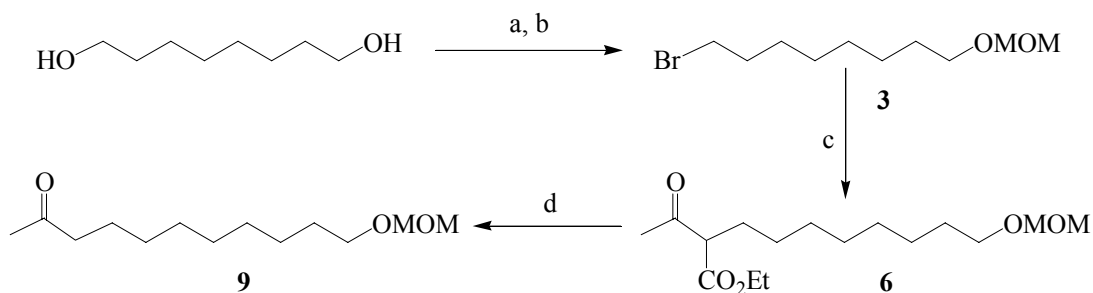
**Figura 1.13** Anàlisi retrosintètica proposada per a la formació dels compostos **34** i **35**.

Així, partint dels corresponents bromoalcohols protegits, de longitud de cadena adequada, com són l'1-bromooctanol (**1**) pel cas de la síntesi de **34** i l'1-bromohexanol (**2**) pel cas de **35**, s'arriba als intermedis claus com són les cetones **8** i **9**. Aquestes cetones, mitjançant una seqüència ben establerta de 3 reaccions, serveixen per introduir els dos àtoms de deuteri. Per desprotecció d'aquests alcohols i subsegüent transformació en un bon grup de sortida, com és un iodur (**30** i **31**) es tenen els sintons adequats per un ulterior atac nucleofílic per la unitat de sofre, que en aquest cas és el 3-mercaptoacetat de metil. Posterior saponificació d'aquests èsters dona lloc als àcids desitjats **34** i **35**.

### 1.2.2.1.1. Obtenció dels intermedis cetònics 8 i 9

#### 1.2.2.1.1.1. Obtenció de la cetona 9

L'obtenció de la cetona **9** es mostra a la Figura 1.14.



**Reactius i condicions:** (a) HBr 48%, toluè, 130°C, 3 h (86%); (b) (MeO)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, LiBr, *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, ta, 16 h, (97%); (c) Na/EtOH/acetacetat d'etil, 90°C, 26 h, (60%); (d) Na/EtOH/etilenglicol, 90°C, 30 min (60%).

**Figura 1.14** Esquema de preparació de la cetona **9**.

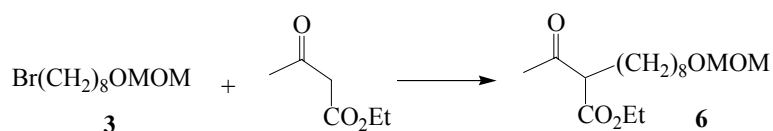
L'octandiòl es transforma en el corresponent bromooctanol **1**, mitjançant monobromació amb HBr concentrat en el si de toluè a reflux. La reacció es basa en el fet de l'existència de dues fases. El diòl, més soluble en la fase aquosa, és transformat en el corresponent compost monobromat, més hidrofòbic. Aquest, per tant, passa a la fase orgànica on la concentració d'àcid és menor. D'aquesta forma, es pot minimitzar la bromació total dels dos alcohols de la cadena, tot i que quan més petita és aquesta, més augmenta la producció de dibromoderivat. Així, 17,1 mmol d'1,8-octandiòl en 40 mL de toluè es fan reaccionar amb 137 mmol de HBr del 47% a 130°C. Un cop realitzat el tractament de la reacció, el cru es purifica tot obtenint 14,8 mmol (86%) d'**1**. Aquest alcohol es protegeix en forma d'èter metoximetílic (MOM) per procediments ben establerts a la literatura<sup>[49]</sup>.

Un cop es disposava del derivat bromat protegit, calia afegir la unitat cetònica. Tot i que en el nostre grup de treball aquest pas es porta a terme mitjançant l'alquilació de ditians<sup>[45, 46]</sup>, seguint el mètode descrit per Seebach i Corey<sup>[50]</sup>, en aquest cas es va pensar buscar una altra alternativa que evités l'ús d'aquest derivats de sofre de característiques organolèptiques tan desagradables. Es va pensar que una bona alternativa seria l'alquilació de  $\beta$ -cetoèsters, procés descrit per primer cop per Marvel i



Hager<sup>[51]</sup>, i posterior eliminació del grup –CO<sub>2</sub>Et (descarbetoxilació), tot seguint la metodologia descrita per Krapcho i Lovey<sup>[52]</sup>.

Es van realitzar diferents proves d'alquilació de l'acetoacetat d'etil, emprant en tots els casos etòxid sòdic (generat in situ amb Na/EtOH) com a base, aprofitant l'acidesa dels protons en α respecte a un grup cetona i un grup èster. En aquests assaigs, primer es genera la base dissolent el sodi en EtOH absolut i posteriorment s'afegeix el β-cetoèster, portant el sistema a reflux (≈ 45-60 min). En aquests moments s'addiciona el derivat bromat **3**. Es van experimentar diferents relacions estequiomètriques entre els dos reactius (mantenint la relació èster/Na 1:1) i diferents temps de reacció, tal com es mostra a la Taula 1.2.



**Taula 1.2** Assaigs d'alquilació de l'acetoacetat d'etil amb **3**.

Equivalents <sup>a</sup> acetoacetat d'etil	temps (h)	Rendiment <b>6</b> (%)
1	26	60 (73) <sup>b</sup>
0,9	24	56 (60)
1,1	48	57 (64)
1,5	30	56 (67)
0,5	24	46

<sup>a</sup>Per tots els casos, es refereix a la utilització d'1 equivalent de **3**. <sup>b</sup>Entre parèntesis es dona el rendiment basat en el producte de partida recuperat.

En cap dels casos la reacció no es va poder portar a una conversió del 100%. A més, el rendiment moderat suggereix l'existència d'altres subproductes, com els de dialquilació o els d'O-alquilació.

Així, tot considerant la primera entrada de la taula com la millor, sobre una solució formada per 2 mmol de Na en EtOH s'afegeixen, sota atmosfera d'argó, 2 mmol d'acetoacetat d'etil. Es porta la mescla de reacció a reflux i s'addicionen 2 mmol de **3**. Es deixa a reflux durant 26 h i el cru es purifica per acabar obtenint **6**, amb un rendiment del 60% (73% en base a **3** recuperat).

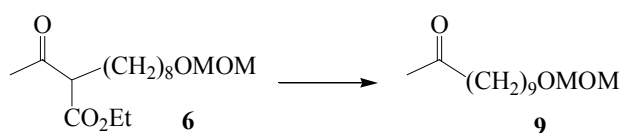
Un cop es va tenir **6**, era necessari eliminar el grup  $-\text{CO}_2\text{Et}$ , per tal d'aconseguir la cetona **9**. Per realitzar aquesta reacció de descarbetoxilació, es van seguir 3 tipus de procediments sintètics, descrits per Krapcho i col[52, 53], per Huang i col[54] i per Aneja i col[55].

En el primer mètode, descrit tant per a  $\beta$ -cetoèsters, com per a dièsters i  $\alpha$ -cianoèsters, el compost a descarbetoxilar s'escalfa, en presència d'una sal (generalment LiCl o NaCN) en el si de DMSO- $\text{H}_2\text{O}$  a reflux.

En el segon mètode utilitzat, el grup  $-\text{CO}_2\text{Et}$  és eliminat en escalfar el producte en presència d'1,4-diazabicyclo-[2.2.2]-octà (DABCO) en el si de xilè a reflux.

En el darrer cas, l'eliminació es produeix en fer reaccionar el  $\beta$ -cetoèster amb etilenglicol en presència d'etòxid sòdic a 85-90°C.

Els resultats de les proves realitzades seguint els diferents procediments es troben recollits a la Taula 1.3.



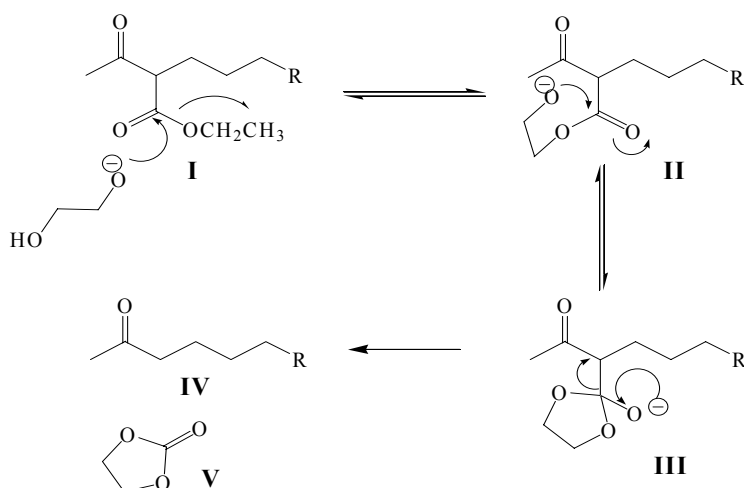
**Taula 1.3** Obtenció de **9** per diferents mètodes de descarbetoxilació.

Mètode	Condicions	Temperatura (°C)	Rendiment (%)
Krapcho	DMSO- $\text{H}_2\text{O}$ , LiCl (2 equiv), 4 h	200-210	26 <sup>a</sup>
	DMSO- $\text{H}_2\text{O}$ , LiCl (2 equiv), 24 h	140-150	--- <sup>b</sup>
Huang	DABCO (10 equiv), xilè, 24 h	150-155	29
	DABCO (15 equiv), xilè, 24 h		45
	DABCO (20 equiv), xilè, 24 h		44
Aneja	Etilenglicol, EtOH, Na, 30 min	85-90	56 <sup>c</sup>
			48 <sup>d</sup>
			60 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>**6** descarbetoxila però també es desprotegeix tot donant la hidroxicetona **167**. <sup>b</sup>CCF molt complicada per l'aparició de diversos productes. <sup>c</sup>Tractament de la reacció: extracció directa del cru amb hexà, rentat amb etilenglicol,  $\text{H}_2\text{O}$  i assecat. <sup>d</sup>Tractament de la reacció: addició de 50 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , extracció amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i extracció en continu durant dos dies de la fase aquosa. <sup>e</sup>Tractament de la reacció: addició de solució saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , extracció amb hexà, rentat i assecat.

Finalment, degut al millor rendiment, menor temps de reacció i menor temperatura, es va escollir el mètode d'Aneja<sup>[55]</sup> per tal d'obtenir la cetona **9**. D'aquesta forma, sobre 2,4 mmol de Na en EtOH absolut, sota atmosfera d'argó, s'afegeixen 4 mL d'etilenglicol acabat de destil·lar. Després de 15 min a 85-90°C s'addicionen 0,66 mmol del cetoèster **6** i es continua l'agitació durant 30 min més. Un cop acabada, es tracta la reacció i el cru es purifica tot fornint la cetona **9** amb un 60% de rendiment.

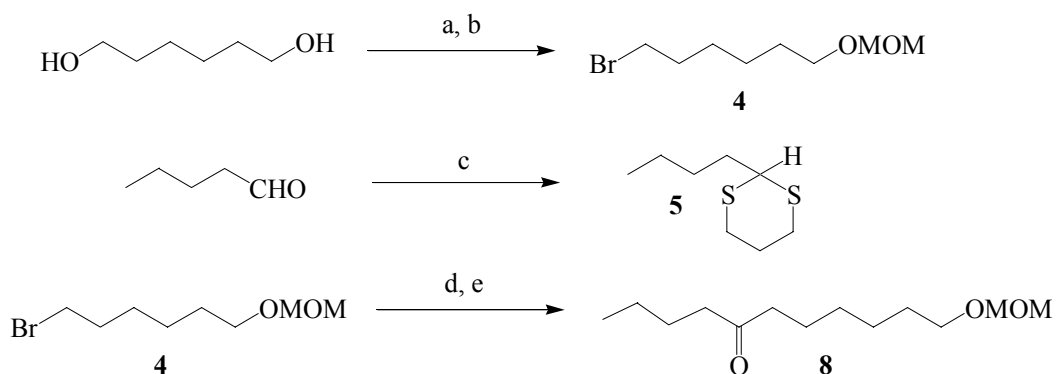
El mecanisme de la reacció es mostra a la Figura 1.15. En ell es pot apreciar com l'anió de l'etilenglicol ataca la funció èster (**I**) tot alliberant-se etòxid i formant-se un èster d'hidroxiètil intermedi (**II**). Aquest hidroxil, en forma d'alcòxid, ataca intramolecularment el carbonil de l'èster per donar un intermedi cíclic de 5 baules (**III**), el qual es trenca alliberant la cetona desitjada (**IV**) i el carbonat cíclic (1,3)-dioxolan-2-ona (**V**).



**Figura 1.15** Mecanisme de descarboxilació de  $\beta$ -cetoèsters catalitzat per etilenglicol.

### 1.2.2.1.1.2. Obtenció de la cetona 8

Donat que el rendiment d'obtenció de **9** pel mètode d'alquilació d'un  $\beta$ -cetoèster seguit de descarbetoxilació no va donar un rendiment molt satisfactori (36% des del bromoalcohol **3**), es va considerar la formació de la cetona **8** pel procediment d'alquilació de ditians<sup>[50]</sup> seguit al nostre laboratori en altres treballs. Per tant, la cetona **8** es va sintetitzar tal i com es mostra a la Figura 1.16.



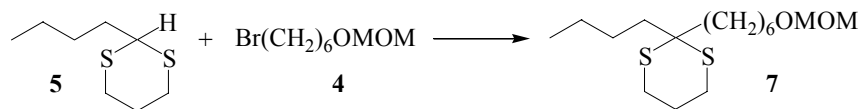
*Reactius i condicions:* (a) HBr 48%, toluè, 110°C, 90 min, (86%); (b) (MeO)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, LiBr, *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, ta, 16 h, (96%); (c) BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, AcOH, SH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SH, CHCl<sub>3</sub>, 80°C, 16 h (93%); (d) *n*-BuLi, THF, -30°C, 90 min/ **4**, THF, -78°C, 1 h, (81%); (e) NBS, acetona-H<sub>2</sub>O, -20°C, 5 min (85%).

**Figura 1.16** Formació de la cetona **8** mitjançant alquilació de ditians.

En aquest cas, es requeria l'obtenció de l'1-bromohexanol **4** protegit en forma d'èter metoximetílic (MOM). Es parteix, per tant, de l'1,6-hexandiòl, el qual és sotmès a monobromació sota les condicions descrites en l'apartat 1.2.2.1.1.1. Aquest bromoalcohol **2** es va protegir en forma d'èter metoximetílic per mètodes estàndards, tot obtenint **4**.

El 2-butil-1,3-ditià (**5**) va ser format per protecció del pentanal amb 1,3-propanditiol en presència de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, AcOH en CHCl<sub>3</sub> a reflux segons el procediment descrit per Seebach i col<sup>[56]</sup>.

Ara que ja es disposava de **4** i de **5** es van realitzar les proves d'alquilació del ditià segons el mètode de Seebach<sup>[50]</sup>. Els resultats es mostren a la Taula 1.4.



Taula 1.4 Assaigs d'alquilació de **5** amb **4**.

Equiv de <b>5</b>	Equiv de <i>n</i> -BuLi	Condicions 1 <sup>a</sup>	Condicions 2 <sup>b</sup>	Rdt (%)
1,0	1,05	-40°C → -25°C (2 h)	-78°C → -30°C (2 h) -30°C → ta (16 h)	--- <sup>c</sup>
1,3	2,6	-30°C (90 min)	-78°C (1 h) → ta (16 h)	35
1,3	2,0	-30°C (90 min)	-78°C (1 h) → ta (16 h)	81
1,7	1,1 <sup>d</sup>	-20°C (90 min)	-78°C → -30°C (90 min) -30°C → ta (16 h)	65 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>Condicions per a la formació de l'anió del ditià. <sup>b</sup>Addició del bromoderivat **4** (1 equiv) i subsegüent alquilació amb l'anió de **5**. <sup>c</sup>Traces de **7**. <sup>d</sup>Es fa servir com a base una solució de *tert*-BuLi 1,5 M en pentà. <sup>e</sup>Conversió del 60% segons cromatografia de gasos (CG).

Com es pot observar pels resultats obtinguts, tant un excés gran de base (2 equiv) respecte de **5** com l'ús d'una quantitat equimolar (1 equiv) no van donar resultats satisfactoris. En el segon cas només es van detectar traces de producte final. L'ús de *tert*-BuLi no va millorar aquests resultats. Tot seguint la millor entrada, sobre una solució de ditià **5** (2,1 mmol) en THF sec, refredada a -30°C, s'addicionen, sota atmosfera d'argó, 3,3 mmol d'una solució 1,34 M de *n*-BuLi en hexà. La mescla de reacció s'agita durant 90 min i es refreda de nou a -78°C. S'afegeixen 1,69 mmol de **4** i després d'1 h a -78°C es permet que assoleixi temperatura ambient tot deixant en reacció 16 h. El cru es purifica tot aconseguint el tioacetal **7** desitjat (81%).

Malgrat tot, com s'ha pogut comprovar al nostre grup de treball, aquesta reacció no és gaire reproduïble, tot conduint a rendiments força baixos en molts dels casos. El darrer pas va consistir en el trencament del tioacetal per donar la cetona **8** buscada. Això s'aconseguí per mitjà de la reacció del tioacetal amb una mescla de *N*-bromosuccinimida (NBS) en acetona humida segons un procediment descrit per Corey<sup>[57]</sup>.

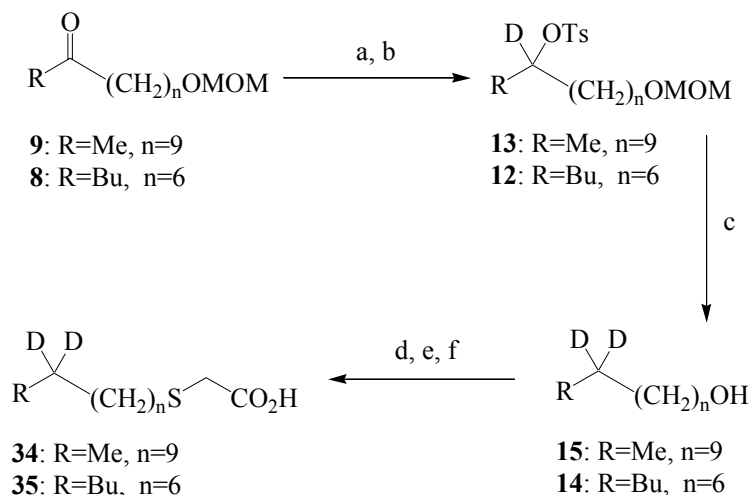
Per tant, com a resum dels resultats, es pot afirmar que la cetona **8** s'obté amb un rendiment del 69% des de **4**, bastant millor que el 36% obtingut en la ruta del cetoèster,

la qual, a més, només és aplicable de forma directa per a obtenir metilcetones (l'alquilació sobre les dues posicions adjacents al grup carbonil també és possible [58]), mentre que amb els ditians, la posició de la cetona la determina l'aldehid escollit per fer el tioacetal, i és doncs, més versàtil.

#### 1.2.2.1.2. *Obtenció dels 3-tiaàcids dideuterats 34 i 35 i del corresponent 3-tiaàcid no deuterat 38*

La introducció de les marques de deuteri consta de tres passos. Reducció de la cetona amb NaBD<sub>4</sub> seguint un mètode descrit per Prestwitch[59], activació de l'alcohol secundari obtingut per tosilació[60] i desplaçament del grup tosiloxi amb deuterur emprant LiAlD<sub>4</sub> segons el procediment de Brown i Krishnamurthy[61].

Un cop es disposa dels dos deuteris introduïts a la cadena, es desprotegeix l'alcohol seguint procediments estàndards[49] i es transforma aquest en el corresponent iodur[62], per tal d'obtenir un bon grup de sortida pel subsegüent atac nucleòfil amb l'anió del 2-mercaptoacetat de metil tot seguint un mètode posat a punt per Khurana i Sahoo[63]. La saponificació final de l'èster metílic rendeix els àcids finals **34** i **35** (Figura 1.17).

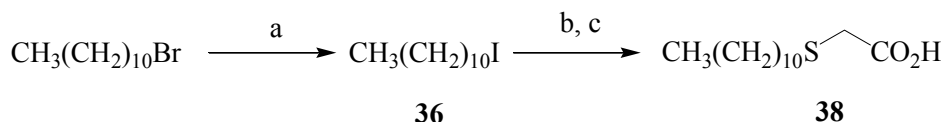


*Reactius i condicions:* (a) NaBD<sub>4</sub>/MeOH, 0°C, 1 h, (**11**, 95%; **10**, 92%); (b) N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·HCl, Et<sub>3</sub>N, *p*-TsCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 90 min (**13**, 73%; **12**, 73%); (c) LiAlD<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, ta, 3 h, seguit d'hidròlisi amb HCl(10%), MeOH, ta, 16 h (**15**, 78%; **14**, 80%); (d) PPh<sub>3</sub>, imidazole, I<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, 0°C, 1 h (**30**, 96%; **31**, 84%); (e) HSCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, ta, 1 h, (**32**, 88%; **33**, 93%); f) KOH, MeOH, ta, 16 h, (**34**, 75%; **35**, 87%).

**Figura 1.17** Preparació dels 3-tiaàcids dideuterats **34** i **35**.

Per a l'obtenció del derivat no deuterat es parteix, anàlogament, de l'1-iodoundecà (**36**) format a partir de l'1-bromoundecà, seguit d'atac del tiolat i saponificació final per fornir l'àcid **38**, sota les mateixes condicions que en els casos anteriors (Figura 1.18).

El contingut final de deuteri en els precursors **34** i **35** es va determinar mitjançant CG-EM dels èsters metílics formats per reacció dels corresponents àcids amb  $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ .



Reactius i condicions: (a) NaI, acetona, 70°C, 16 h, (92%); (b)  $\text{HSCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, ta, 1 h, (85%); (c) KOH, MeOH, ta, 16 h, (89%).

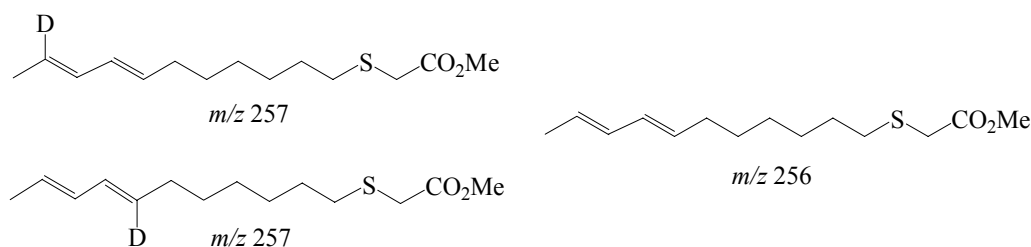
**Figura 1.18** Obtenció del 3-tiaàcid no deuterat **38**.

De la mateixa forma, l'existència del grup  $-\text{CD}_2-$  en la posició 13 de la cadena en l'àcid **34** va ser confirmada per la presència d'un senyal a 21,8 ppm (quintet,  $J=19,0$  Hz) i l'existència del grup  $-\text{CD}_2-$  del carboni 10 de l'àcid **35** pel senyal a 28,0 ppm (quintet,  $J=20,0$  Hz) en els espectres de RMN de  $^{13}\text{C}$  d'aquests compostos.

#### 1.2.2.2. *Metabolització dels tiaàcids 34, 35 i 38. Resultats i discussió*

Els experiments de competició entre els substrats **38** i **34** o **35** es van realitzar *in vivo* tot seguint el procediment detallat a la part experimental.

En les anàlisis per CG-EM-SIM, es seleccionaren les masses moleculars corresponents als diens esperats ( $m/z$  257 pels èsters deuterats procedents de les dessaturacions de **34** i **35** i  $m/z$  256 per l'èster no deuterat procedent de **38**, tal com es veu a la Figura 1.19.



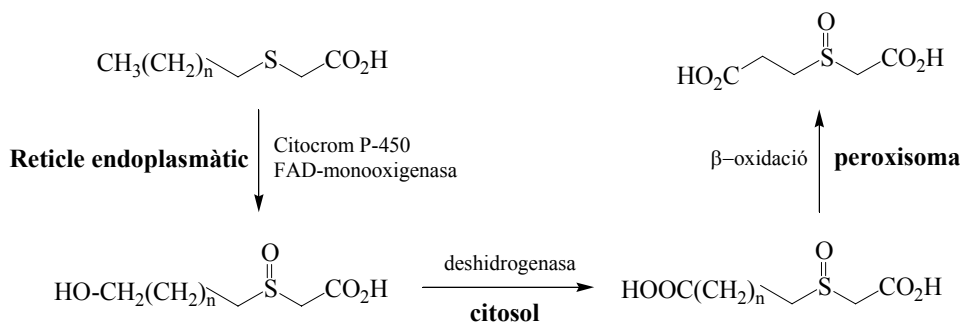
**Figura 1.19** Ions moleculars corresponents als diens formats per dessaturació dels precursors **34**, **35** i **38**.

Sorprenentment, aquests productes no es detectaren en cap cas. Tampoc es detectaren els èsters metílics dels àcids monènics (*E*)-11 ni (*Z*)-11-tiatetradecenoics, precursors dels diens. Sí que s'observaren, en canvi, tots els components naturals de la glàndula feromonal de l'insecte, així com els tiàcids saturats de partida, tot demostrant que, malgrat que s'havia produït la incorporació dels substrats, aquests no s'havien transformat en cap producte insaturat. És a dir, no havien estat substrat de la  $\Delta 11$  dessaturasa.

Quina explicació es pot donar a aquest fet? Una revisió acurada de la literatura científica mostrarà que en alguns casos, els tiaànàlegs de productes naturals poden actuar com a inhibidors enzimàtics. Aquest és el cas de l'àcid 13-tiaaraquidònic<sup>[64]</sup> el qual inhibeix la biosíntesis de leucotriens a través de la inactivació de la 5-lipooxigenasa, i de l'àcid 9-tiaoctadecanoic, el qual inhibeix la ciclopropè sintasa<sup>[65]</sup>. En altres casos, els tiaàcids poden reemplaçar els substrats naturals. En aquest sentit, es coneix que els àcids 5-, 6-, 7-, 12- i 13-tiaoctadecanoics són dessaturats als corresponents àcids (*Z*)-9-tiaoctadecenoics per la  $\Delta 9$  esteroil-CoA dessaturasa de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[66]</sup>. En la mateixa *S. littoralis*, l'àcid 13-tiatetradecanoic és incorporat i dessaturat en C11 i després en C9, mentre que els àcids 9-, 10-, 11- i 12-tiatetradecanoics no es dessaturen<sup>[67]</sup>. Ara bé, en tots aquests casos, l'àtom de sofre està situat a prop del centre oxidatiu de l'enzim, mentre que en el cas dels àcids **34**, **35** i **38**, l'àtom de sofre està prou allunyat de les posicions que es dessaturen.

S'ha suggerit que els 3-tiaàcids, en cèl·lules d'hepatòcits, són metabolitzats per  $\omega$ -oxidació després d'oxidació de l'àtom de sofre a sulfòxid mitjançant una flavin-monooxigenasa<sup>[47]</sup>, tal com es mostra a la Figura 1.20.





**Figura 1.20** Catabolisme dels 3-tiaàcids grassos en cèl·lules d'hepatòcits de rata.

Aquesta oxidació inicial de l'àtom de sofre, evitaria la posterior activació de l'àcid com a èster de CoA, impossibilitant doncs, si aquesta reacció es produís en cèl·lules d'insecte, que els àcids sintetitzats s'incorporessin a la biosíntesi de la feromona sexual. Tanmateix, aquesta ruta de degradació és sempre un camí minoritari i per regla general, els 3-tiaàcids de cadena llarga es dessaturen, com és el cas de la dessaturació en C9 de l'àcid 3-tiaesteàric[68].

Segons Høvik i col[69], mentre que l'àcid 9-tiaesteàric actua com a inhibidor en la dessaturació de l'àcid [1-<sup>14</sup>C]-esteàric a àcid [1-<sup>14</sup>C]-oleic, el corresponent àcid amb l'àtom de sofre en posició 3 no té cap efecte. Tanmateix, i això és potser més important, la presència de l'àcid esteàric sí que inhibeix d'una forma gairebé total la dessaturació de l'àcid [2-<sup>14</sup>C]-3-tiaesteàric, mostrant una marcada preferència de l'enzim pel substrat natural. Aparentment, doncs, la presència dels àtoms de sofre en les posicions 9 o 10 no altera l'afinitat de la dessaturasa pel substrat, mentre que aquesta disminueix notablement si s'introdueix el sofre en la posició 3.

Aquests precedents podrien explicar els nostres resultats. Donat que la glàndula feromonal presenta quantitats importants de tots els substrats naturals de les dessaturases, com són l'àcid palmític i l'àcid mirístic, aquests podrien competir de forma molt efectiva amb els 3-tiaàcids **34**, **35** i **38** tot impedit la seva unió al lloc actiu de l'enzim, degut, possiblement, a una interacció poc favorable entre l'àtom de sofre i algun residu aminoacídic present al canal hidrofòbic de l'enzim. Com a conclusió, tot i que aquests àcids s'incorporen, no són dessaturats als corresponents monoens (i per tant, no s'obtenen els diens que d'ells es deriven), probablement perquè no poden competir

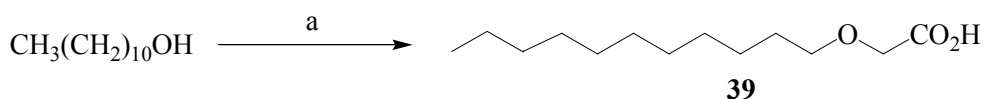
amb els substrats naturals (àcids mirístic i palmític) presents al teixit glandular, que mostren una afinitat molt superior a la dels 3-tiaàcids per la  $\Delta 11$  dessaturasa.

### 1.2.3. Síntesi i metabolització del 3-oxaàcid **39**. Resultats i discussió

Per tal d'obtenir evidències a favor de l'efecte electrònic com a causa de la manca d'afinitat de  $\Delta 11$  dessaturasa pels 3-tiaàcids, es va sintetitzar el 3-oxaàcid **39**, el qual, d'acord amb la hipòtesi plantejada, no s'hauria de dessaturar en la posició 11.

#### 1.2.3.1. Síntesi del 3-oxaàcid **39**

Aquest compost es va obtenir amb molt bon rendiment a partir de l'1-undecanol mitjançant un acoblament amb diazoacetat d'etil catalitzat per  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ <sup>[70]</sup> i posterior saponificació de l'èster a àcid, tal com es mostra a la Figura 1.21.



*Reactius i condicions:* (a)  $\text{N}_2\text{CHCO}_2\text{Et}$ ,  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h, ta, seguit de  $\text{KOH}$  2,5 M,  $\text{EtOH}$ , 16 h, ta (90%)

**Figura 1.21** Síntesi del 3-oxaàcid **39** a partir de l'1-undecanol.

#### 1.2.3.2. Metabolització del 3-oxaàcid **39**

Els assaigs biològics es van realitzar *in vivo*, de la mateixa manera que pels compostos **34**, **35** i **38**, si bé en les anàlisis per CG-EM-SIM es van seleccionar els ions  $m/z$  244,  $m/z$  242 i  $m/z$  240, corresponents al substrat de partida i als productes monoènic i diènic, respectivament.

Tal com succeí amb els 3-tiaàcids, els productes de dessaturació de **39** no es detectaren en cap cas, tot i que es confirmà la presència del substrat de partida, fet que indicava una correcta incorporació de **39**. És a dir, com en el cas dels 3-tiaàcids, **39** tampoc és substrat de la  $\Delta 11$  dessaturasa.

Donat que la presència de parells d'electrons en la posició 3 de la cadena hidrocarbonada semblava reduir l'afinitat dels àcids grassos per la  $\Delta 11$  dessaturasa, es

va decidir abandonar aquest tipus de compostos per tal de desxifrar la criptoregioquímica de la 1,4-dessaturasa.

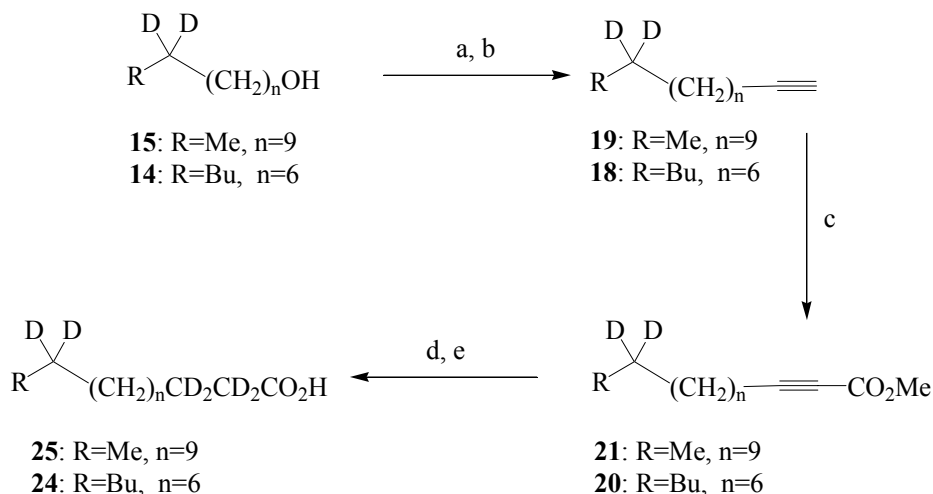
#### **1.2.4. Síntesi dels substrats polideuterats 24, 25 i 28; determinació de la criptoregioquímica**

##### ***1.2.4.1. Síntesi dels àcids polideuterats 24, 25 i 28***

En un esforç per aprofitar el màxim possible els productes ja preparats, es va optar per sintetitzar substrats polideuterats, que és un dels 3 mètodes emprats per mesurar la KIE segons es va explicar a l'apartat 1.2.2.

Es va partir dels alcohols dideuterats **14** i **15** i es van afegir 4 àtoms més de deuteri. En realitzar càlculs per determinar les KIEs tot emprant compostos polideuterats amb una cadena hidrocarbonada idèntica a la dels substrats endògens, per tal que hi hagi una discriminació per espectrometria de masses, és necessari la presència de, com a mínim, 3 àtoms de deuteri, per tal d'evitar les interferències degudes a l'ió  $M^{+}+2$  del substrat natural. En el cas que ens ocupa, degut al mètode sintètic escollit, que consistia en la reducció amb deuteri d'un triple enllaç conjugat a un èster, es van inserir 4 àtoms de deuteri més, a part dels dos ja preexistents, tot conduint a compostos hexadeuterats pel cas de **24** i **25** i tetradeuterats pel cas **28**. Les reaccions de formació dels corresponents àcids hexadeuterats estan representades a la Figura 1.22, tot essent l'etapa clau la reducció del triple enllaç conjugat amb  $Mg/CD_3OD$ , mètode desenvolupat per Hutchins i col[71].

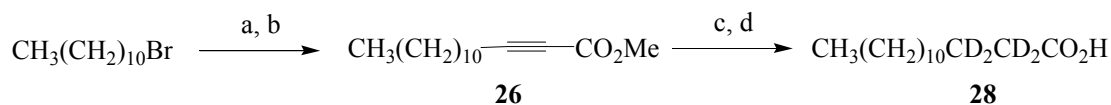
La primera reacció que es va portar a terme va ser la transformació dels alcohols en els corresponents derivats bromats. Això es va aconseguir utilitzant NBS en DMF[72]. En un procediment típic, 2 equiv de NBS s'addicionen sobre una solució 0,5 M del corresponent alcohol en DMF seca. La solució s'escalfa a 50°C durant 15 min i es para tot afegint MeOH (1 mL/mmol) per tal d'eliminar l'excés de reactiu. Després del tractament de la reacció, el cru es purifica i s'obtenen els bromurs amb rendiments pròxims al 75%.



*Reactius i condicions:* (a) NBS, DMF, 50°C, 15 min, (**17**, 70%; **16**, 74%); (b) acetilè, Li, NH<sub>3</sub>, DMSO, ta, 90 min, (**19**, 60%; **18**, 58%); (c) *n*-BuLi, THF, -78°C, 30 min, llavors ClCO<sub>2</sub>Me, THF, ta, 1 h, (**21**, 77%; **20**, 78%); (d) Mg, CD<sub>3</sub>OD, ta, 24 h, (**23**, 70%; **22**, 72%); (e) KOH, MeOD, ta, 16 h, (**25**, 70%; **24**, 72%).

**Figura 1.22** Esquema d'obtenció dels àcids hexadeuterats **24** i **25**.

Un cop es disposava dels corresponents bromurs d'alquil deuterats **16** i **17**, aquests es van alquilar amb acetilur de liti[73, 74] en NH<sub>3</sub>/DMSO com a solvent per fornir els alquins terminals. Així, s'obtenen els corresponents alquins amb rendiments moderats. La mateixa reacció, però emprant l'1-bromoundecà com a material de partida va fornir l'alquí **27**, el qual després generarà l'àcid tetradeuterat **28** tal com es veu a la Figura 1.23.



*Reactius i condicions:* (a) acetilè, Li, NH<sub>3</sub>, DMSO, ta, 90 min, (**27**, 82%); (b) *n*-BuLi, THF, -78°C, 30 min, llavors ClCO<sub>2</sub>Me, THF, ta, 1 h, (**26**, 87%); (c) Mg, CD<sub>3</sub>OD, ta, 24 h, (**29**, 68%); (d) KOH, MeOD, ta, 16 h, (**28**, 74%).

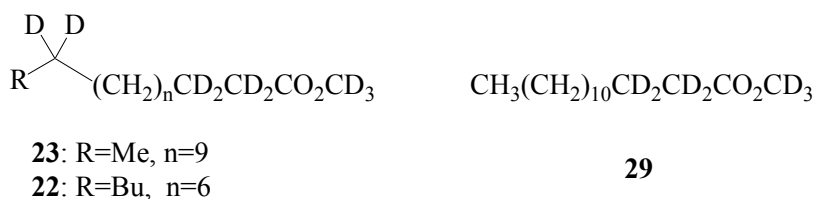
**Figura 1.23** Esquema d'obtenció de l'àcid tetradeuterat **28**.

Un cop foren preparats els tres alquins **18**, **19** i **27**, s'havien de funcionalitzar amb un grup carboxilat. Aquesta modificació funcional es va realitzar mitjançant l'atac de l'acetilur, format amb *n*-BuLi, sobre un electròfil adequat, que en aquest cas va ser el cloroformiat de metil[75]. La reacció procedeix tractant una solució 0,5 M de l'alquí en

qüestió en THF, a  $-78^{\circ}\text{C}$ , amb  $n\text{-BuLi}$  (1,2 equiv) durant 30 min. Passat aquest temps s'addiciona el  $\text{ClCO}_2\text{Me}$  (1 equiv) i s'escalfa a temperatura ambient. El cru obtingut un cop tractada la reacció es purifica tot obtenint els corresponents èsters  $\alpha,\beta$ -insaturats amb bons rendiments. Com a subproducte de reacció es detectava el pentanoat de metil, fruit de l'atac del  $n\text{-BuLi}$  sobre el cloroformiat de metil, el qual era convenientment separat.

Per tant, ara es disposava dels substrats preparats per a introduir les marques de deuteri. El procediment escollit va ser la reducció selectiva d'un triple enllaç conjugat a un èster, procés desenvolupat per Hutchins i col[<sup>71</sup>] l'any 1989. La reacció és una doble transferència d'electrons del metall, en aquest cas magnesi, al sistema  $\pi$  del triple enllaç, on el  $d_4$ -metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , o si es vol obtenir un compost no deuterat, el  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), actua com a donador de deuteris. La reacció no funciona amb el grup àcid o alcohol lliures, probablement degut a la ràpida generació dels anions carboxilat i alcoxilat, que eviten la transferència d'electrons vers el sistema  $\pi$ .

Donat que a la reacció es fa servir  $\text{CD}_3\text{OD}$  com a solvent, es produeix la transesterificació amb l'èster metílic present a la molècula, de manera que s'obté l'agrupació altament deuterada  $-\text{CD}_2\text{CD}_2\text{CO}_2\text{CD}_3$  (Figura 1.24) la qual no mostra cap senyal característica del grup  $\text{COOCH}_3$  a 3,73 ppm en la ressonància magnètica nuclear d'hidrogen. Tanmateix, l'espectre d'infrarroig sí que exhibeix la vibració corresponent a l'*stretching* simètric del grup  $\text{C}=\text{O}$  a  $1739\text{ cm}^{-1}$ , fet que confirma la presència dels grups èsters.



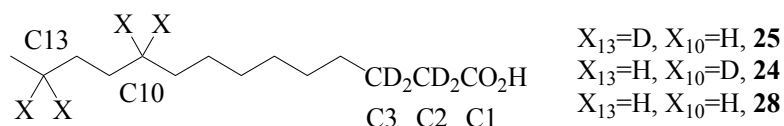
**Figura 1.24** Estructura dels èsters metílics deuterats **22**, **23** i **29**.

Finalment, la saponificació final d'aquests èsters amb una solució 2,5 M de  $\text{KOH}$  en  $\text{CH}_3\text{OD}$  va conduir als àcids polideuterats **24**, **25** i **28**. En aquest cas, també es va emprar metanol deuterat per evitar el possible intercanvi dels deuteris en  $\alpha$  al grup èster amb els protons àcids del  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

La presència de deuteri en els precursors sintetitzats va ser confirmada per CG-EM dels corresponents èsters metílics (formats per reacció dels àcids amb una solució de  $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ ), tot essent el pic molecular ( $M^+$ ) per **24** i **25**,  $m/z=248$ , i  $m/z=246$  per **28**.

A més, la presència dels àtoms de deuteri en C2 i C3 en tots els precursors va ser confirmada per la multiplicitat i les constants d'acoblament dels corresponents senyals a 33,4 i 23,8 ppm en els espectres de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Donat que l'*spin* del deuteri és  $n=1$ , cada grup  $-\text{CD}_2-$  apareix com un quintet en l'espectre de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

De la mateixa forma, l'existència del grup  $-\text{CD}_2-$  en la posició 13 de la cadena per l'àcid **25** va ser confirmada per la presència d'un senyal a 21,8 ppm (quintet,  $J=19,0$  Hz) i el grup  $-\text{CD}_2-$  del carboni 10 de l'àcid **24** va ser assignat al senyal a 24,2 ppm (quintet,  $J=20,0$  Hz) en els espectres de RMN de  $^{13}\text{C}$  d'aquests compostos (Taula 1.5).



**Taula 1.5** Desplaçaments químics i multiplicitats dels compostos **24**, **25** i **28** en RMN de  $^{13}\text{C}$ .

Compost	Àtom de carboni							
	C1	C2	C3	C4-C9, C11,	C10	C12	C13	C14
<b>28</b>	180,5	33,4 <sup>a</sup>	23,8 <sup>a</sup>	29,7; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,1; 28,8		31,9	22,6	14,1
<b>25</b>	180,2	33,4 <sup>c</sup>	23,8 <sup>b</sup>	29,7; 29,6; 29,4; 29,1; 28,8		31,7	21,8 <sup>b</sup>	13,8
<b>24</b>	180,6	33,4 <sup>a</sup>	23,8 <sup>a</sup>	29,5; 29,4; 29,2; 29,1; 28,8	24,2 <sup>a</sup>	31,8	22,6	14,1

<sup>a</sup>Quintet,  $J = 20,0$  Hz; <sup>b</sup>Quintet,  $J = 19,0$  Hz; <sup>c</sup>Quintet,  $J = 18,0$  Hz.

#### 1.2.4.2. Criptoregioquímica de la 1,4-dessaturasa. Resultats i discussió

Com ja s'ha explicat abans, l'efecte isotòpic primari cinètic intermolecular (KIE) es determina en experiments de competició entre un substrat no endogen i el mateix substrat dideuterat sobre cadascun dels àtoms de carboni que es dessaturen. En el nostre cas, els precursors són els àcids mirístics marcats **24**, **25** i **28**, els quals, després de ser activats dins de les cèl·lules als corresponents èsters de CoA, són transformats, en idèntica proporció, en els respectius (*Z*)-11-tetradecenoats.

En aquest cas, els assaigs es realitzaren *in vitro*, tot seguint el protocol detallat a la part experimental. Els extractes lipídics metanolitzats s'analitzen per CG-EM-SIM tot

seleccionant un rang de masses de 238 a 250, el qual inclou els ions moleculars dels tetradeconoats i (*E,E*)-10,12-tetradecadienoat de metil endògens i dels productes deuterats, tant saturats, com monoinsaturats i diinsaturats, així com les masses  $M^{+1}$ ,  $M^{+2}$ ,  $M^{+1}$  i  $M^{+2}$  per a cada compost.

La integració dels ions corresponents a tots els isotopòmers de l'èster metílic de l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic format va proporcionar les dades necessàries per a determinar les KIEs i, subsegüentment, va permetre determinar el carboni on té lloc l'oxidació inicial o criptoregioquímica en la reacció de dessaturació.

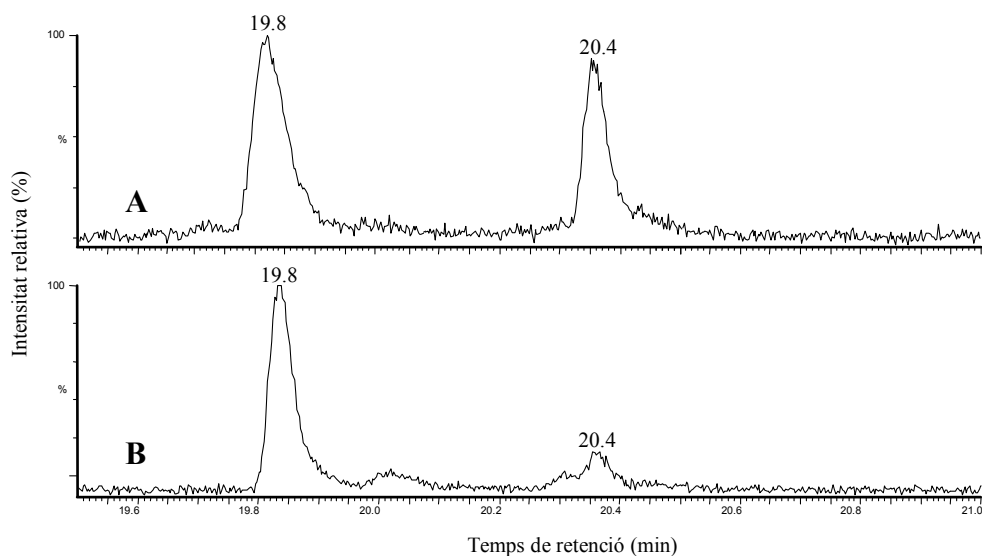
Així, l'efecte isotòpic va ser determinat mitjançant el càlcul de les relacions que existeixen entre el diè format procedent del substrat tetradeuterat (**28**) i el format procedent dels anàlegs hexadeuterats (**24** i **25**) segons l'Equació 1.3[28], que es determinen a partir de l'abundància dels ions moleculars dels diversos isotopòmers del (*E,E*)-10,12-tetradecadienoat de metil ( $d_4=242$  i  $d_5=243$ ).

$$\text{KIE} = \frac{k_H}{k_D} = [d_4 (\text{diè})/d_5 (\text{diè})] / [d_4 (\text{substrat})/d_6 (\text{substrat})]$$

---

**Equació 1.3** Equació utilitzada per calcular els efectes isotòpics.

El procediment analític emprat requereix efectuar algunes correccions. Així, l'àrea de l'ió a  $m/z$  242 inclou l'abundància de l'ió  $M^{+1}$  del diè pentadeuterat, mentre que l'àrea de l'ió a  $m/z$  243 inclou l'abundància de l'ió  $M^{+1}$  del diè tetradeuterat. Aquests darrers valors van ser obtinguts mitjançant l'anàlisi dels cromatogrames de CG-EM d'extractes de glàndules feromonals incubades amb cadascun dels substrats per separat. Els cromatogrames es mostren a la Figura 1.25.



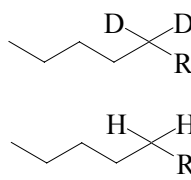
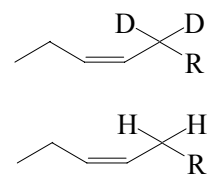
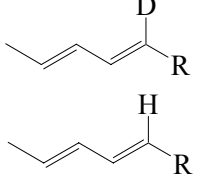
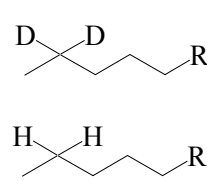
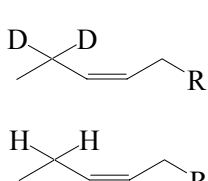
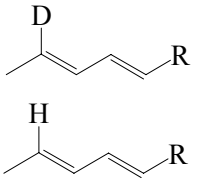
**Figura 1.25** Cromatogrames de CG-EM corresponents als extractes procedents de glàndules incubades amb (A) l'àcid **25** i **28** i (B) l'àcid **24** i **28**, tot seleccionant en ambdós casos l'ió  $m/z$  243. Es pot apreciar que l'àrea corresponent al pic a un  $t_R=20,4$  min és força superior en el cas de l'àcid **25** (A), que en el cas de **24** (B), tot exhibint un efecte isotòpic important en l'abstracció dels àtoms de deuteri en la posició 10 i no pas en la 13.

Els resultats obtinguts en els experiments de competició es presenten a la Taula 1.6. Com es pot veure, s'observà un efecte isotòpic gran per a la ruptura de l'enllaç C-H de la posició C10, mentre que l'efecte isotòpic és negligible en l'abstracció de l'hidrogen en la posició C13.

Tot seguint la mateixa metodologia prèviament validada en l'estudi d'altres dessaturases[28, 44-46] s'ha determinat el lloc inicial d'oxidació (criptoregioquímica) en la transformació de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic en l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic mitjançant la 1,4-dessaturasa de l'espècie plaga *S. littoralis*.



**Taula 1.6** Transformació de **24**, **25** i **28** en els àcids  $d_4$  i  $d_6$  (*Z*)-11-tetradecenoics i en els àcids  $d_4$  i  $d_5$  (*E,E*)-10,12-tetradecadienoics en els experiments de competició.

Relació substrats <sup>a</sup>	$\xrightarrow{\Delta 11}$	Relació substrats 1,4-dessaturasa <sup>a</sup>	$\xrightarrow{1,4}$	Relació productes 1,4-dessaturasa <sup>a</sup>	KIE
 <p>1,2</p>		 <p>1,2 ± 0,2<sup>b</sup></p>		 <p>1,2 ± 1,6<sup>b</sup></p>	10,2 ± 1,6 <sup>b</sup>
 <p>1,1</p>		 <p>1,1 ± 0,3<sup>b</sup></p>		 <p>1,3 ± 0,2<sup>b</sup></p>	1,2 ± 0,2 <sup>b</sup>

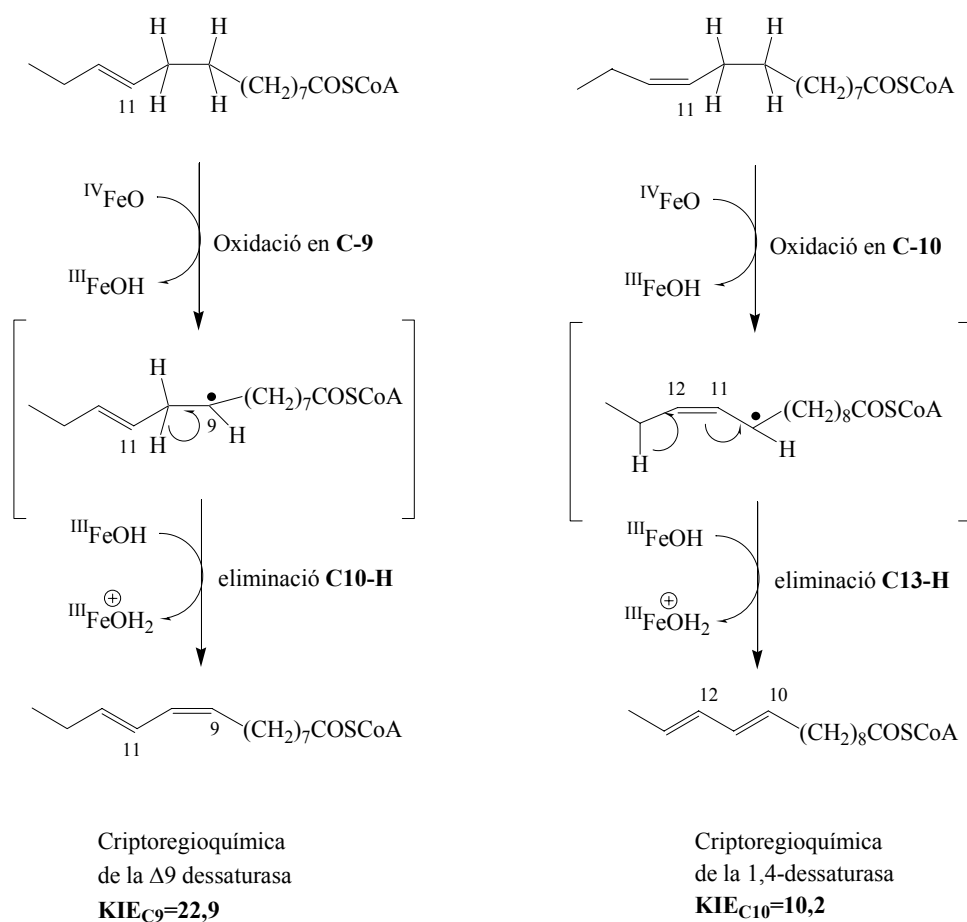
<sup>a</sup>Relació entre els substrats  $d_4$  i  $d_6$  utilitzats en la solució aplicada, entre els àcids  $d_4$  i  $d_6$  (*Z*)-11-tetradecenoics formats per acció de la  $\Delta 11$  dessaturasa i entre els diens  $d_4$  i  $d_5$  formats per la 1,4-dessaturasa. <sup>b</sup>Pels substrats inicials, la relació correspon a la determinació d'una mostra de partida mitjançant derivatització amb  $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ . Per tots els metabòlits, els resultats s'expressen mostrant els valors mitjans ± la desviació estàndard de tres experiments diferents. Les KIEs estan calculades tal com es descriu a l'Equació 1.3;  $\text{R}=(\text{CH}_2)_6(\text{CD}_2)_2\text{COOH}$ .

Els resultats obtinguts en la determinació de les KIEs en experiments competitius mostren que l'abstracció d'un hidrogen en el carboni 10, però no l'eliminació de l'hidrogen en la posició C13, és sensible a la substitució per deuteri. En concordança amb el model proposat per Buist i col[28], aquests resultats són consistents amb la hipòtesi segons la qual aquesta reacció de dessaturació implica un primer pas lent, sensible a la substitució per deuteri, com és el trencament de l'enllaç C-H en el C10, amb la formació probable d'un intermedi al·lílic inestable, seguit d'una abstracció ràpida d'hidrogen sobre el C13 i d'una reorganització concomitant del doble enllaç inicial[76].

Els estudis de criptoregioquímica confirmen que la formació del (*E,E*)-10,12-tetradecadienoat a partir del corresponent (*Z*)-11-tetradecenoat està catalitzada per una dessaturasa i no es tracta simplement d'un procés d'isomerització catalitzat per isomerases, sense la participació de cap intermedi oxidat, del diè (*Z,E*)-9,11-

tetradecadienoat al diè (*E,E*)-10,12-tetradecadienoat, tal com succeeix en determinades algues marines amb enzims que isomeritzen àcids grassos poliinsaturats en els seus corresponents àcids grassos conjugats[35, 77].

Per altra banda, els estudis conduïts prèviament al nostre grup sobre la dessaturació de l'altre isòmer, l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic, per la  $\Delta 9$  dessaturasa mostren que l'etapa lenta determinant de la velocitat és la ruptura de l'enllaç C-H de la posició C9[45], seguit de la formació d'un intermedi homoa·l·ílic i una pèrdua ràpida de l'hidrogen sobre C10, tal com es mostra a la Figura 1.26.



**Figura 1.26** Comparació entre els mecanismes de formació de l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic a partir de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic[76] i de l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic a partir de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic[45]. També es mostren els diferents valors de KIEs obtinguts per aquestes dessaturacions.

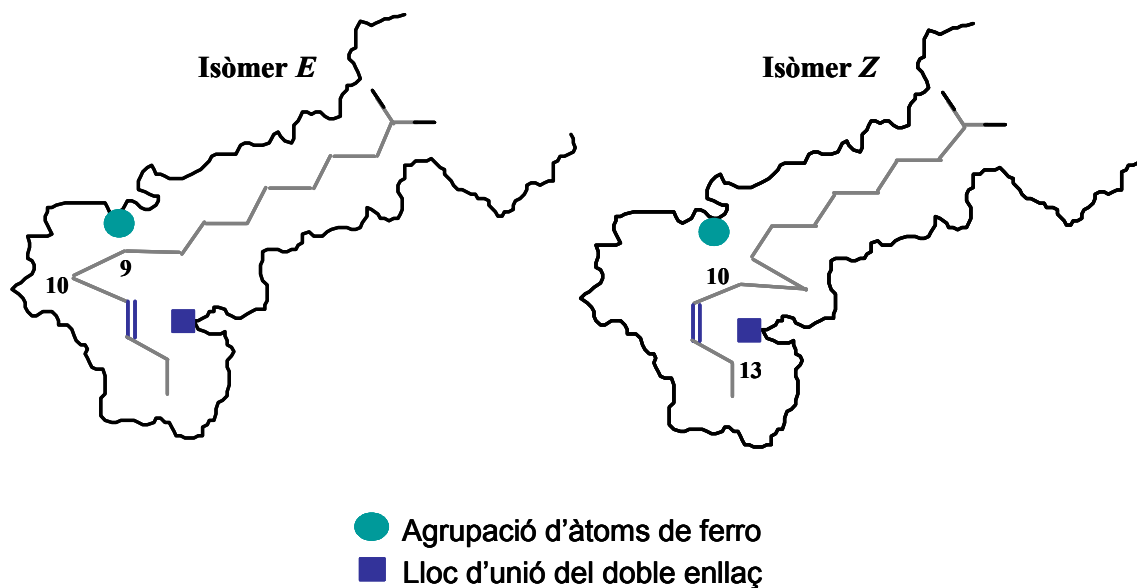
La diferent criptoregioquímica obtinguda per a les dues reaccions de dessaturació pot provenir de les diferents disposicions espacials o conformacions que poden adoptar

les cadenes alifàtiques dins el canal hidrofòbic d'unió a l'enzim, que fa que l'agrupació de ferro responsable de l'oxidació es situï més a prop del carboni C9 en el cas del (*E*)-11-tetradecenoat, i del carboni C10 en el cas del (*Z*)-11-tetradecenoat.

Ara bé, tal com succeeix amb la  $\Delta$ 11 dessaturasa, en la qual totes les evidències mecanístiques<sup>[46]</sup> i genètiques<sup>[78]</sup> confirmen l'existència d'una única dessaturasa que catalitza la formació dels isòmers *Z* o *E* tot depenent de la longitud de la cadena del substrat, això no està tan clar en la formació dels dos diens. Si només intervingués un sol enzim i no pas dos, la disposició espacial dels àtoms de carboni C9 i C10 respecte de l'agrupació d'àtoms de ferro estaria governada per la geometria, *Z* o *E*, del doble enllaç dels substrats (Figura 1.27).

En l'isòmer *E*, l'àtom C9 estaria a prop del centre oxidant format pels àtoms de ferro, tot conduint a la formació d'un intermedi homool·lílic per l'oxidació de C9. El diè de geometria *Z,E* resultaria finalment per eliminació d'un àtom d'hidrogen de la posició C10. En canvi, l'isòmer *Z* s'acomodaria en el lloc actiu de la dessaturasa de tal forma que el carboni C10 estaria proper a l'agrupació d'àtoms de ferro catalítics amb la subsegüent formació d'un intermedi al·lílic per oxidació de C10. Posterior pèrdua de l'àtom d'hidrogen de la posició C13 amb reorganització del doble enllaç, conduiria al sistema diènic de configuració *E,E* com a producte de la reacció enzimàtica.

Donat que, com s'ha comentat abans, existeix una única  $\Delta$ 11 dessaturasa que sintetitza tots els monoens presents a la feromona sexual de l'espècie *S. littoralis* i que la seva estereoespecificitat depèn de la longitud de la cadena del substrat, és bastant raonable pensar que una única dessaturasa de monoens podria ser capaç de sintetitzar els dos sistemes diènics presents a la mescla feromonal de *S. littoralis*, com són els acetats de (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoat i de (*E,E*)-10,12-tetradecadienoat, tot depenent de la geometria del substrat que conté el doble enllaç.



**Figura 1.27** Diferents disposicions espacials dels dos isòmers de l'àcid 11-tetradecenoic dins el canal hidrofòbic que els uneix a la dessaturasa, tot assumint l'existència d'un únic enzim que catalitza les dues transformacions. Com es pot observar, en el primer cas l'agrupació de ferro es troba més propera a l'àtom de carboni C9 on té lloc la primera etapa de l'oxidació, mentre que en el segon cas, els àtoms de ferro es situen al costat de l'àtom de carboni C10, que s'oxida en la primera etapa de la dessaturació 1,4.

Si aquest fos el cas, les femelles de *S. littoralis* serien capaces de biosintetitzar el seu complex feromonal amb la participació de dues úniques dessaturases, una  $\Delta 11$  dessaturasa, l'estereoespecificitat de la qual depèn de la longitud de cadena del substrat, i una dessaturasa de monoens, la criptoregioquímica de la qual, i per tant la regio i estereoquímica dels productes finals, depèn de la geometria del doble enllaç del substrat. En aquest sentit, la composició de la mescla feromonal estaria regulada, no per l'existència de diferents dessaturases, sinó pel proveïment de substrats específics als dos únics enzims encarregats de la formació de dobles enllaços. Si es pren en consideració l'estalvi energètic que suposa el fet de traduir només dues dessaturases, s'entén que la natura hagi pogut escollir el sistema més econòmic, i que la diversitat d'estructures químiques de les feromones sexuals provinguin de canvis en la conformació i/o estereoquímica dels substrats en el si de la cavitat hidrofòbica que els allotja dins de l'enzim.

Malauradament, encara no s'ha aconseguit cap evidència genètica a favor d'una única dessaturasa de monoens, tal com es parlarà en el pròxim capítol.

### 1.3. ESTEREOESPECIFICITAT

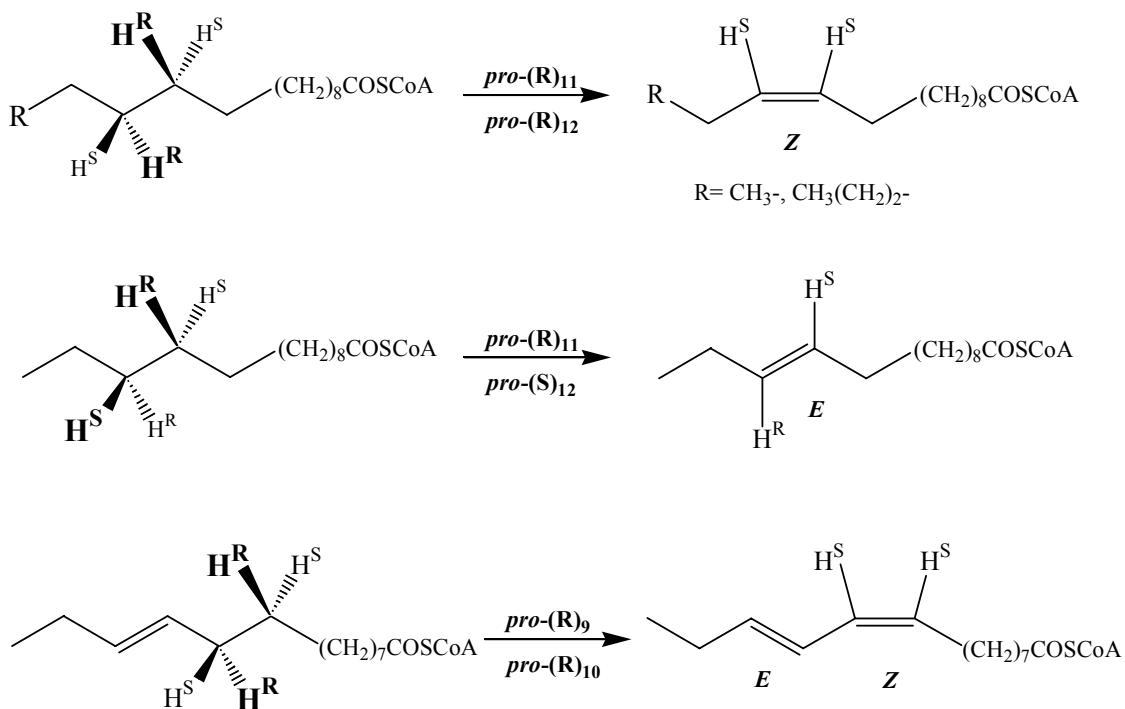
Un cop s'havia determinat la criptoregioquímica de l'enzim que catalitza el procés de dessaturació de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic en l'àcid diènic (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic, per acabar l'estudi d'aquesta 1,4-dessaturasa a nivell mecanístic es va proposar com a objectiu la determinació de la seva estereoespecificitat.

Les dessaturases, a més de ser regioselectives en quant a la introducció d'un doble enllaç, també actuen, com la majoria dels enzims, diferenciant les cares d'un substrat proquiral.

S'ha estudiat l'estereoespecificat de diverses dessaturases tant de plantes, llevat o insectes. Entre aquests treballs destaquen els estudis realitzats sobre la  $\Delta 9$  estearoïl-CoA dessaturasa<sup>[79-81]</sup>, sobre la  $\Delta 12$  oleoïl-CoA dessaturasa<sup>[80]</sup> i sobre algunes  $\Delta 11$  acil-CoA dessaturases<sup>[82, 83]</sup>. En tots els casos investigats fins el moment, les dessaturases que presenten una estereoespecificitat del tipus *pro*-(*R*)/*pro*-(*R*) condueixen a dobles enllaços de geometria *Z*, mentre que les olefines amb configuració *E* provenen d'enzims que exhibeixen una estereoespecificitat del tipus *pro*-(*R*)/*pro*-(*S*)<sup>[83, 84]</sup>.

Si l'estudi de les dessaturases que produeixen àcids grassos monoinsaturats ha estat força complet, l'estereoespecificitat de les dessaturases que condueixen a àcids grassos poliinsaturats ha estat estudiada només en un parell de casos<sup>[80, 85]</sup>. En els dos casos mencionats, els dos hidrògens proquirals abstrerts per donar pas al nou doble enllaç conjugat de geometria *Z* van ser el *pro*-(*R*)/*pro*-(*R*).

A la Figura 1.28 es mostren les diferents estereoespecificitats, tant de la  $\Delta 11$  dessaturasa com de la  $\Delta 9$  dessaturasa trobades fins al moment en la biosíntesi del complex feromonal en el nostre lepidòpter model, la *S. littoralis*.



**Figura 1.28** Diferents estereoespecificitats trobades per la  $\Delta 11$  dessaturasa, que catalitza la formació del àcid (*Z*)-11-hexadecenoic i (*E*) i (*Z*)-11-tetradecenoics, i per la  $\Delta 9$  dessaturasa que catalitza la formació de l'àcid diènic conjugat (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic, en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*.

### 1.3.1. Mètodes descrits per a determinar l'estereoespecificitat de dessaturases

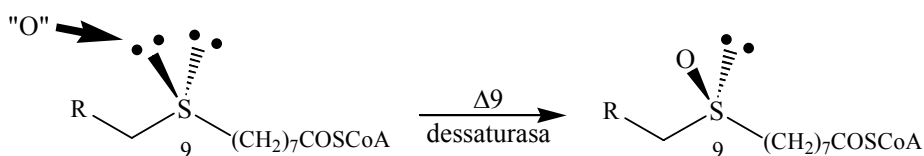
Són bàsicament dos els mètodes descrits fins ara per a dur a terme la determinació de l'estereoespecificitat de les dessaturases:

1. El primer es basa en l'anàlisi dels sulfòxids obtinguts per oxidació de sulfurs mitjançant l'acció de dessaturases, mètode descrit per Buist i col[66, 86, 87].
2. El segon utilitza substrats que contenen centres estereogènics amb deuteri[83, 85, 88].

#### 1.3.1.1. Mitjançant l'anàlisi dels sulfòxids obtinguts per oxidació de sulfurs

El primer mètode es basa en la capacitat que tenen els àcids grassos que contenen un àtom de sofre en el carboni on s'inicia la dessaturació d'inhibir aquesta reacció i ser, per contra, oxidats als corresponents sulfòxids enantiomèricament enriquits, d'una

forma estereoespecífica, mitjançant una transferència d'oxigen tal com es mostra a la Figura 1.29.



**Figura 1.29** Transformació de sulfurs en sulfòxids enantiomèricament enriquits (*R*-sulfòxids) mitjançant la transferència d'oxigen des de la  $\Delta 9$  dessaturasa (en aquest cas de *S. cerevisiae*, on  $R = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_7$ ).

Si es recorda el mecanisme de dessaturació mostrat a l'apartat 1.1.3.4, en aquesta transformació s'eliminen dos àtoms d'hidrogen però no s'insereix cap àtom d'oxigen. Sembla ser, doncs, que la presència de sofre en les posicions de dessaturació afecta el mecanisme pel qual l'enzim absteu els hidrògens, tot permetent en aquest cas la incorporació d'oxigen sobre l'àtom de sofre, obtenint el sulfòxid esmentat.

Per tant, si es pot determinar l'estereoquímica del sulfòxid obtingut, aquesta estereoquímica hauria de coincidir amb la de l'hidrogen abstret<sup>[86]</sup>, que en el cas de *S. cerevisiae* mostrat a la Figura 1.29 és *pro*-(*R*) en C9<sup>[79]</sup>, tot evidenciant una clara coincidència amb l'estereoquímica del sulfòxid obtingut.

Ara bé, aquest mètode presenta molts desavantatges. Com s'ha explicat a l'apartat 1.2.1, les dessaturases són selectives en quant a què comencen la inserció del doble enllaç en un àtom de carboni determinat i no en un altre (criptoregioquímica). En el cas de la  $\Delta 9$  dessaturasa mostrada en la Figura 1.29, l'oxidació (etapa lenta) s'inicia al C9 i és seguida d'una eliminació ràpida d'hidrogen en C10. En aquest sentit, s'obtenen quantitats substancialment més petites de sulfòxid en la posició 10 que en la posició 9, de la mateixa forma que la sulfoxidació en les posicions 8 i 11 és totalment negligible. Per tant, només es podria determinar sense ambigüitats l'estereoespecificitat de l'abstracció sobre el carboni on té lloc l'etapa determinant de la velocitat.

A part d'això, part de l'oxidació pot provenir d'autooxidacions del sulfur, en aquest cas no enantioespecífiques, o per l'acció oxidativa del citocrom P<sub>450</sub><sup>[89]</sup>, fet que condueix de forma perceptible a una disminució de l'excés enantiomèric (ee) del sulfòxid obtingut.

A més, per tal de calcular l'ee d'aquest sulfòxid obtingut, és necessari derivatitzar-lo amb un reactiu complexant quirals (l'àcid (*S*)-(+)- $\alpha$ -metoxifenilacètic, per exemple<sup>[87]</sup>) el qual faci que els protons adjacents, en l'anàlisi del producte per RMN de  $^1\text{H}$ , esdevinguin diastereotòpics, a fi i efecte de poder detectar la discriminació quirals. Donat que per tal de realitzar una derivatització seguida d'anàlisi per RMN es necessiten alguns mil·ligrams de producte, en el nostre cas això és absolutament inviable, ja que es treballa a l'escala dels nanograms. El mètode proposat per Buist i Marecak<sup>[87]</sup> utilitza cultius de llevat (*S. cerevisiae*) i en aquest sentit és possible aïllar la quantitat necessària de material per tal de realitzar les anàlisis abans explicades.

### **1.3.1.2. Mitjançant compostos deuterats enantiomèricament purs**

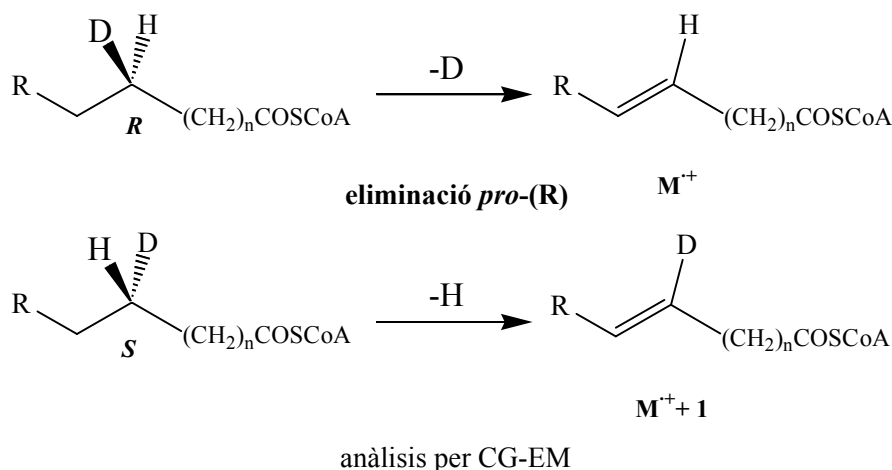
Aquest mètode es basa en la síntesi d'àcids grassos que contenen un àtom de deuteri sobre un centre estereogènic en una posició determinada de la cadena.

El fet a favor que presenta aquest procediment és que és possible determinar la configuració de qualsevol hidrogen, sempre i quan es disposi de mètodes sintètics apropiats per obtenir aquests derivats deuterats òpticament actius d'una forma senzilla i amb un ee suficientment elevat.

Per tal de determinar sense ambigüetats l'estereoespecificitat de les dessaturases mitjançant aquest sistema, és necessari disposar dels dos enantiòmers *R* i *S* del substrat. Un cop els productes són transformats per la dessaturasa sotmesa a estudi, les anàlisis per CG-EM mostren el pes molecular d'un alquè o d'un altre tot depenent de quin àtom (hidrogen o deuteri) s'hagi abstret de forma enantioespecífica durant la reacció de dessaturació, tal com es mostra a la Figura 1.30.

Donades les avantatges d'aquest mètode, es va decidir seguir-lo per tal d'investigar l'estereoespecificitat de la 1,4-dessaturasa.





**Figura 1.30** Determinació de l'estereoespecificitat de la reacció de dessaturació (tot suposant eliminació *pro*-(R)) utilitzant substrats monodeuterats enantiomèricament purs. Els productes finals analitzats per CG-EM tenen un pes molecular  $M^+$  o  $M^{++1}$  segons s'elimini deuteri o hidrogen, respectivament.

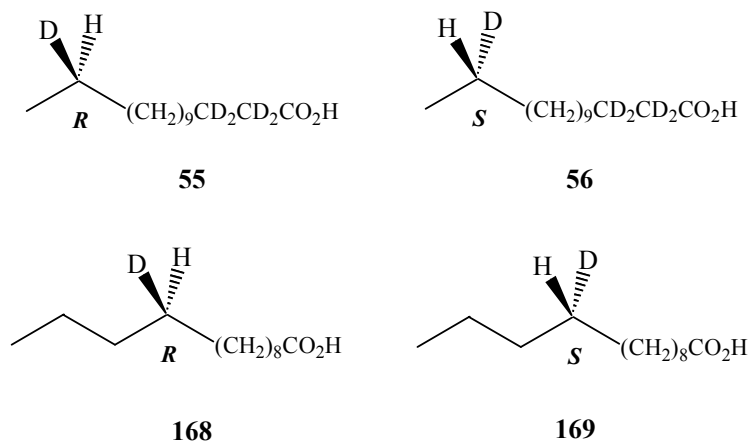
### 1.3.2. Síntesi dels substrats deuterats 55 i 56

De nou, per tal de sintetitzar els derivats deuterats, ens trobarem davant els mateixos interrogants plantejats en la formació dels derivats dideuterats relacionats. S'havien d'obtenir àcids grassos que presentessin un àtom de deuteri sobre un centre estereogènic, ja sigui sobre la posició C10 com sobre la posició C13 (ambdós enantiòmers en cada cas), ja que era sobre aquests carbonis on tenien lloc les dues abstraccions d'hidrogen. En aquest cas també era possible sintetitzar substrats deuterats amb un àtom de sofre a la cadena, substrats de cadena més curta metabolitzats per la dessaturasa o, com en el cas anterior, substrats polideuterats.

Pel cas dels àcids monodeuterats en la posició 10, l'elecció va resultar senzilla, ja que al laboratori es disposava dels àcids (*R*)-[10-<sup>2</sup>H]-tridecanoic (**168**) i (*S*)-[10-<sup>2</sup>H]-tridecanoic (**169**) sintetitzats pel Dr José Luis Abad per tal d'estudiar l'estereoespecificitat de la  $\Delta^9$  dessaturasa de *S. littoralis*[85, 88], els quals van ser cedits amablement per l'estudi de la 1,4-dessaturasa, la qual també abstrau un hidrogen de la posició C10.

Pel cas de la posició C13, era clar que no es podien emprar àcids de cadena més curta, ja que en utilitzar l'àcid tridecanoic, el carboni 13 esdevé un grup metil i passa a estar en un entorn clarament aquiral, i no proquiral com és el cas de la posició C10.

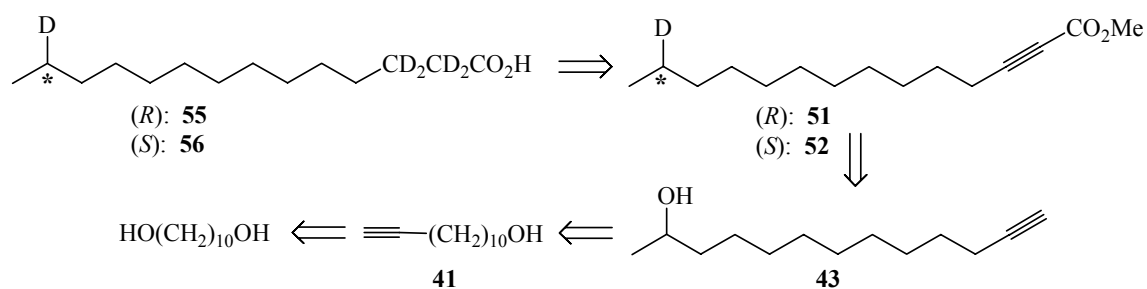
Donat que l'ús d'àcids amb un àtom de sofre a la cadena no va resultar satisfactori en la determinació de la criptoregioquímica, hom es va decantar per l'ús, de nou, d'àcids tetradecanoics polideuterats, concretament es van sintetitzar els àcids **55** i **56**, els quals es mostren a la Figura 1.31.



**Figura 1.31** Àcids grassos deuterats enantiomèricament purs per a la determinació de l'estereoespecificitat de la 1,4-dessaturasa.

### 1.3.2.1. Síntesi dels àcids pentadeuterats **55** i **56**

L'anàlisi retrosintètica plantejada per a la formació dels dos àcids deuterats es mostra a la Figura 1.32.



**Figura 1.32** Anàlisi retrosintètica que condueix als àcids **55** i **56**.

Com es pot veure, és una anàlisi molt semblant, en la seva part final, a la suggerida per a la formació dels àcids polideuterats **24**, **25** i **28**. Així, la marca de 4 deuteris en C2 i C3 (aquest cop imprescindible, ja que d'abstreure's el deuteri, els

productes de transformació serien idèntics als productes endògens de la glàndula) s'introdueix al final de la seqüència mitjançant la reducció del triple enllaç de l'èster  $\alpha,\beta$ -insaturat amb Mg/CD<sub>3</sub>OD[71].

En aquest cas, el triple enllaç s'introdueix dins la molècula en etapes més inicials, ja que el rendiment d'aquesta reacció, molt elevat, decau bastant en realitzar-se a petita escala, com s'ha pogut constatar en la síntesi de **18** i **19** a partir dels corresponents bromurs **16** i **17**.

L'intermedi clau d'aquesta síntesi és l'alcohol racèmic **43**, ja que és a partir d'aquest que es generarà el centre quirals que posteriorment suportarà els deuteris, tant en el derivat *R*, com en el derivat *S*. Aquest 2-metilcarbinol prové, com és usual, del corresponent diol, en aquest cas l'1,10-decandiol.

#### *1.3.2.1.1. Mètodes sintètics descrits a la literatura per obtenir metilcarbinols enantiomèricament purs*

En plantejar-nos aquesta síntesi, s'era conscient de la necessitat d'obtenir un alcohol secundari enantiomèricament enriquit; concretament, com es veu a la Figura 1.32, aquest alcohol havia de ser un metilcarbinol.

Existeixen dues maneres d'arribar a aquest tipus d'alcohols quirals: una és emprant catalitzadors químics i l'altra emprant catalitzadors biològics. A continuació es farà un breu recull de les possibilitats que ambdós mètodes ofereixen.

##### *1.3.2.1.1.1. Mètodes de síntesi de 2-metilcarbinols basats en catàlisi química*

Bàsicament existeixen dos reaccions principals que condueixen a aquests tipus d'alcohols secundaris de forma enantioselectiva:

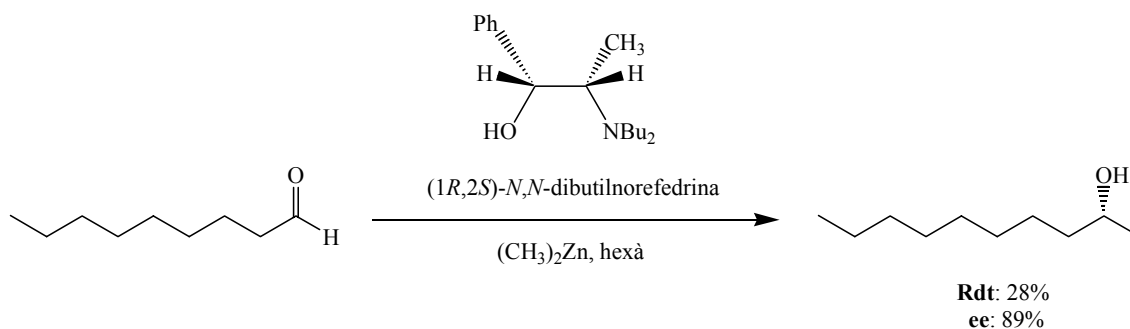
- L'una es basa en l'atac d'un reactiu organometàl·lic sobre un aldehid en presència d'un lligand quirals.
- L'altra es basa en la reducció estereoselectiva d'una 2-metilcetona, també en presència d'un lligand quirals.

La primera reacció es basa en l'atac d'un derivat organometàl·lic capaç de cedir una unitat de metil de la seva estructura, sobre un aldehid, ja sigui aromàtic o alifàtic, en presència d'un lligand quirals, el qual pot diferenciar les dues cares enantiotòpiques d'un

aldehid. Aquest atac forneix el 2-metilcarbinol, tot recuperant el catalitzador quiral per subsegüents reaccions.

Entre els reactius organometàl·lics utilitzats hom pot trobar:

- Reactius de zinc, com el  $(\text{CH}_3)_2\text{Zn}$ , el qual, en presència d'un lligand quiral adequat, com poden ser els derivats de la norefedrina<sup>[90-92]</sup>, derivats de disulfonamides<sup>[93]</sup>, etc, poden donar aquests alcohols secundaris (Figura 1.33).
- Reactius de liti, com el  $\text{CH}_3\text{Li}$ , en presència de dioxolans quirals i cloroisopropòxid de titani,  $(^i\text{PrO})_3\text{TiCl}$ <sup>[94]</sup>.
- Reactius de Grignard, com el  $\text{CH}_3\text{MgI}$  en presència de sals d'alumini quirals<sup>[95]</sup>.
- Derivats de titani, com el tetrametiltitani ( $\text{Ti}(\text{CH}_3)_4$ ), emprant norefedrina com a lligand quiral<sup>[96]</sup>.



**Figura 1.33** Formació de 2-carbinols òpticament actius per atac de  $(\text{CH}_3)_2\text{Zn}$  catalitzat per derivats de la norefedrina<sup>[92]</sup>.

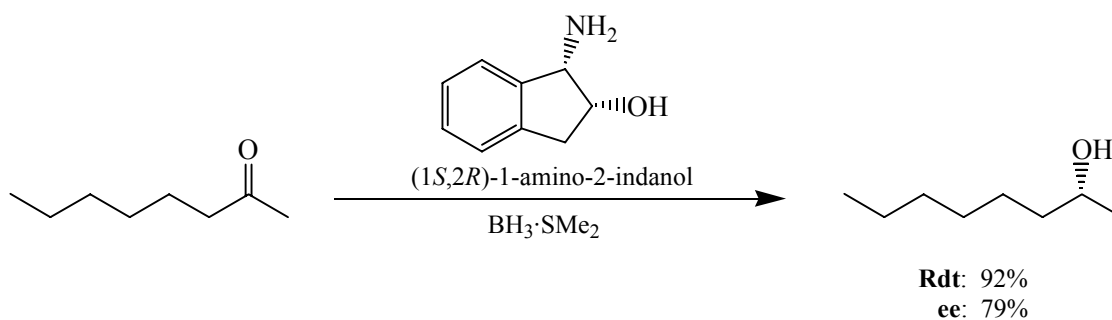
El cas dels derivats de zinc és interessant, ja que és molta la literatura química existent per l'atac del  $\text{Et}_2\text{Zn}$  sobre aldehids en presència de lligands quirals, tot conduint a rendiments i excessos enantiomèrics elevats, tant sobre derivats alifàtics com sobre aromàtics<sup>[92, 93]</sup>. Tanmateix, l'ús del  $(\text{CH}_3)_2\text{Zn}$  està menys explotat, degut a la poca reactivitat d'aquest organozincat. Tant els rendiments com els excessos enantiomèrics són més aviat pobres.

Pel que fa a la reducció de 2-metilcetones en destaquen:

- L'ús de borans (tant el  $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$  com el  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ ) en presència d'alcohol quirals (aminoalcohols<sup>[97]</sup>, aminoindànols<sup>[98]</sup>); en presència de derivats d'aminoàcids

(derivats de la valinal<sup>[99]</sup>, derivats la prolina<sup>[97]</sup>); emprant oxazaborolidines<sup>[100]</sup>; utilitzant feniletilamina<sup>[101]</sup> o emprant derivats del 9-BBN i la cànfora<sup>[102]</sup>, entre altres (Figura 1.34).

- L'ús d'hidrurs derivats del  $\text{LiAlH}_4$  en presència de mentol<sup>[103]</sup> o el DIBAH amb diamines quirals<sup>[104]</sup>.
- Hidrogenació catalítica de cetones, com el cas descrit per Osawa<sup>[105]</sup>, el qual empra catalitzadors que contenen níquel.



**Figura 1.34** Formació de 2-metilcarbinols òpticament actius per reducció de 2-metilcetones amb borà en presència de derivats d'aminoalcohols<sup>[98]</sup>.

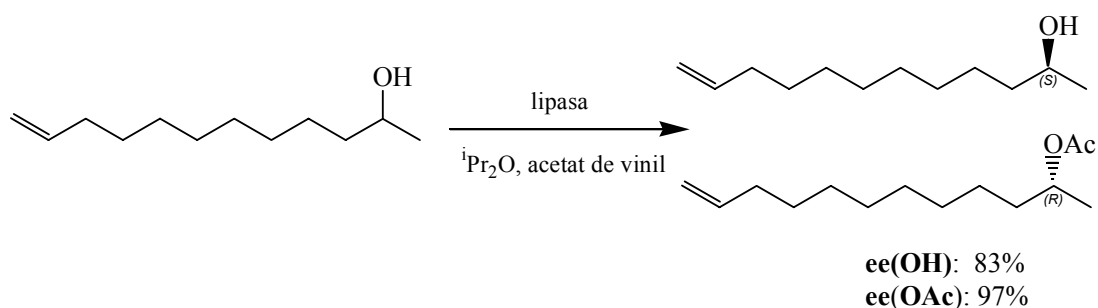
Tots aquests mètodes destaquen per la seva elevada enantioselectivitat. Malgrat tot, gairebé tots els exemples estan referits a productes que presenten un anell aromàtic o un substituent força voluminós molt pròxim a l'aldehid o cetona, de tal forma que els excessos enantiomèrics són sempre força alts. Les referències sobre cadenes alifàtiques no diferenciades per la presència de cap grup voluminós són escasses i condueixen a rendiments de producte entre alts i moderats i excessos enantiomèrics força baixos si exceptuem alguns casos puntuals.

Un altre factor a tenir en compte és que cal preparar els lligands quirals, ja que molts d'ells no són comercialment assequibles. Donat que en el nostre cas necessitàvem tots dos enantiòmers, es feia necessari sintetitzar els dos diastereòmers dels lligands emprats, fet que podria suposar un problema, en tant en quan que un excés diastereomèric baix en la síntesi d'aquests lligands tindria com a conseqüència més immediata la davallada en l'excés enantiomèric del producte final desitjat. És per això que es van contemplar altres opcions, en aquest cas, la síntesi emprant catàlisi enzimàtica.

### 1.3.2.1.1.2. Mètodes de síntesi de 2-metilcarbinols basats en catàlisi enzimàtica

D'ençà uns anys, els catalitzadors biològics o enzims han esdevingut un mètode catalític estàndard en síntesi orgànica. El fet que els enzims siguin capaços de catalitzar reaccions amb una selectivitat notablement elevada sota condicions experimentals molt suaus, és un fet molt atractiu pels químics orgànics sintètics. Les propietats dels enzims a considerar abans d'emprendre el seu ús com a biocatalitzadors són la seva disponibilitat comercial, la seva estabilitat (tant tèrmica com química), el rang de substrats acceptats, el requeriment de cofactors i/o coenzims, l'ús de medis no aquosos i la possibilitat de modular la selectivitat de la transformació simplement modificant les condicions experimentals, entre altres<sup>[106]</sup>. Així, a tall d'exemple en destaquen:

- L'ús de llevat<sup>[107]</sup> i d'altres organismes relacionats, com són les cèl·lules de *Geotridum candidum*<sup>[108-110]</sup>.
- La utilització de la deshidrogenasa d'alcohols de fetge de cavall<sup>[111, 112]</sup>.
- I l'ús de lipases<sup>[113-117]</sup> i acilases<sup>[118]</sup>, en resolucions enzimàtiques de substrats aquirals (Figura 1.35).



**Figura 1.35** Ús de lipases en resolucions cinètiques de 2-metilcarbinols<sup>[113]</sup>.

L'ús de cèl·lules, o en tot cas, la utilització dels enzims presents dins d'aquestes (tal com s'indica en els dos primers punts), no és un procés tan trivial. A més d'haver de preparar els cultius o les mostres cel·lulars, procediments que poden arribar a ser bastant tediosos, les conversions són bastant baixes, els temps de reacció són llargs, i pel cas de la deshidrogenasa d'alcohols, l'escala de treball és molt petita, tot fent aquesta opció poc apropiada per reaccions on es necessiti força material. Tot i així, els excessos enantiomèrics aconseguits són molt elevats (>95%), degut a la selectivitat manifesta

d'aquests enzims, i dependent de la soca de treball escollida, es poden obtenir tots dos enantiòmers.

Pel que fa a la darrera opció, l'ús de lipases, cal dir que aquest tipus d'enzims catalitzen reaccions que impliquen transferència de grups acil. En el seu ambient natural, el seu rol consisteix principalment en la hidròlisi de triglicèrids com a primer pas en el metabolisme de greixos als intestins. Tot reduint la concentració d'aigua al medi, la reacció contrària és la predominant, de tal forma que tant la reacció d'esterificació com de transesterificació i hidròlisi són possibles.

Actualment, aquests enzims són molt utilitzats en la resolució de mescles racèmiques de carbinols, àcids, amines<sup>[119-121]</sup>, desimetritzacions, etc. L'elevat grau d'enantioselectivitat trobat en les reaccions catalitzades per lipases les fa molt interessants en síntesi orgànica. Són capaces de catalitzar reaccions potencialment importants com són les hidròlisis, esterificacions, transesterificacions, i accepten no només substrats naturals, sinó molècules estructuralment relacionades, de manera que s'augmenta força el ventall de possibilitats que ofereixen.

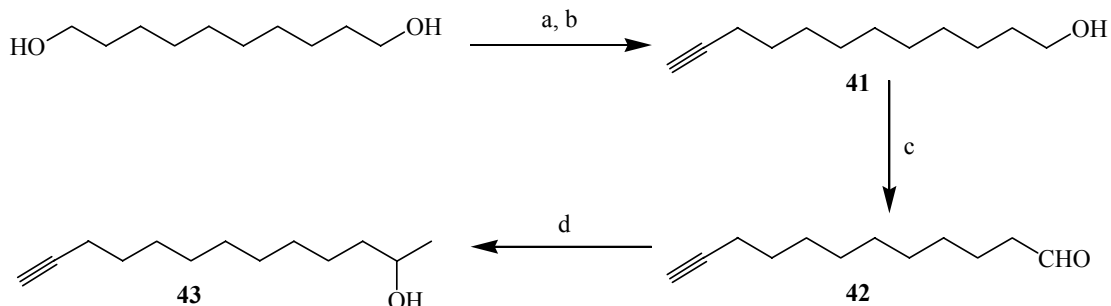
Pel que fa a les resolucions enzimàtiques, aquestes presenten un inconvenient, ja que el rendiment màxim possible, a diferència de les reaccions catalitzades químicament i les desimetritzacions, és del 50% d'un dels dos enantiòmers. En el supòsit que només interessi un d'ells, s'estaria perdent la meitat del material de partida, això és, l'isòmer no desitjat, fet que en síntesis lineals llargues pot suposar un gran problema.

És per això que sospesant els avantatges i els inconvenients, es va escollir com a mètode per l'obtenció dels dos carbinols òpticament actius **44** i **45** la resolució enzimàtica de l'alcohol aquiral **43** mitjançant la utilització de lipases. El fet principal que ens va conduir a aquesta decisió va ser, principalment, que en el nostre cas es requerien els dos enantiòmers, fet que amb aquest tipus de biocatàlisi s'aconsegueix en una única reacció. A més, es disposava al nostre departament de diversos preparats de lipasa per ser provats i altres eren comercialment assequibles, juntament amb la facilitat que oferia la part experimental. I a part dels avantatges concernents a l'eficàcia i a l'estereoselectivitat, els enzims, a diferència dels metalls, són innocus per l'ambient.

Així doncs, en el pròxim apartat es parlarà sobre la formació de l'alcohol secundari racèmic **43**, així com de la seva resolució mitjançant aquest tipus d'enzim, tot fornint els dos alcohols d'interès **44** i **45**.

### 1.3.2.1.2. Síntesi i resolució enzimàtica de **43**: obtenció de **44** i **45**

La ruta sintètica proposada per arribar al compost **43** en qüestió es troba descrita a la Figura 1.36.



*Reactius i condicions:* (a) HBr (48%), toluè, 2 h 30 min, 130°C, (**40**, 93%); (b) acetilè, Li, NH<sub>3</sub>, DMSO, ta, 90 min, (**41**, 97%); (c) (COCl)<sub>2</sub>, DMSO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -60°C, 5 min, llavors, **41**, -60°C, 20 min seguit de Et<sub>3</sub>N, 0°C, 30 min, (**42**, 71%); (d) CH<sub>3</sub>MgBr, THF, -50°C, 10 min, (**43**, 75%).

**Figura 1.36** Esquema d'obtenció de l'alcohol racèmic **43**.

En aquest cas, seguint el mateix procediment descrit per a l'obtenció dels àcids **24** i **25**, la síntesi parteix d'un diol alifàtic. L'1,10-decandiòl es transforma en el corresponent 10-bromodecanol (**40**) mitjançant reacció amb HBr al 48% en toluè a reflux, obtenint el bromoalcohol desitjat amb un rendiment molt elevat del 93%.

Aquest bromoalcohol **40** es transforma, sense necessitat de protecció de la funció hidroxil, en el corresponent 11-dodecin-1-ol (**41**) mitjançant l'atac de l'acetilur de liti sobre el bromur d'alquil. El fet que l'alcohol romangui desprotegit afecta únicament a la quantitat de liti que s'ha d'afegir a la mescla de reacció, que en aquest cas són 2,8 equivalents en lloc dels 1,8 requerits quan l'alcohol es troba emmascarat.

Un cop es disposa de l'alcohol **41**, aquest s'ha d'oxidar al corresponent aldehyd **42**. En aquest cas, de l'ampli espectre de possibilitats que existeix per oxidar un alcohol primari a aldehyd (dicromat de piridini (PDC) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>[122], 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinòxid (TEMPO)[123, 124], reactiu de Dess-Martin[125], oxidació de Swern[126], etc) es va escollir la darrera opció, l'oxidació de Swern del compost **42**, amb un rendiment del 71%.

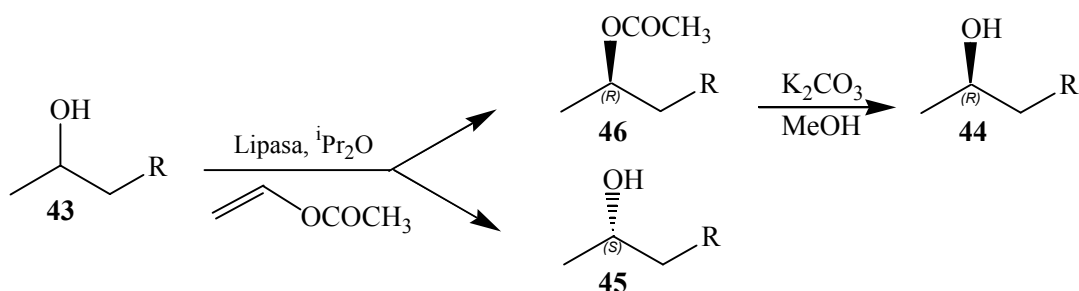
Finalment, mitjançant l'atac nucleòfil del bromur de metil magnesi, CH<sub>3</sub>MgBr, sobre l'aldehyd, a -60°C emprant THF com a solvent, s'obté el 12-tridecin-2-ol racèmic (**43**) amb un rendiment del 75% (48% des de l'1,10-decandiòl de partida).



Obtingut l'alcohol racèmic **43**, aquest va ser resolt mitjançant una transesterificació enzimàtica catalitzada per lipases en presència d'acetat de vinil com a agent acilant i emprant com a solvent diisopropil èter anhidre ( $i\text{Pr}_2\text{O}$ ), segons les condicions descrites per Sharma i col<sup>[113]</sup> i per Ghorpade i col<sup>[115]</sup>.

1.3.2.1.2.1. Resolució cinètica de racemats mitjançant lipases

Les lipases (enzims pertanyents al grup de les hidrolases) catalitzen reaccions de transferència de grups acil. La transesterificació enzimàtica consisteix en la resolució, en aquest cas, d'un alcohol secundari mitjançant l'acilació selectiva d'un dels seus enantiòmers, restant l'altre sense alterar en solució. Es tracta d'una reacció de transesterificació, ja que l'enzim és capaç de captar el grup acil d'una molècula present al medi, com és el cas de l'acetat de vinil, i cedir aquest grup a un dels alcohols presents a la mescla en dissolució. Aquesta transformació aprofita el fet que les lipases tenen la capacitat de discernir entre els dos alcohols presents (tant el *R* com el *S*) tot mostrant una preferència més acusada per l'acilació d'un isòmer que per l'altre, essent la velocitat de reacció per un d'ells, per tant, més gran que per a l'altre. Si s'ajusten les condicions de conversió, dissolvent, quantitat d'enzim, etc, es poden arribar a obtenir els dos alcohols amb un ee força elevat. Un cop s'atura la reacció, l'acetat és fàcilment separat de l'alcohol inalterat mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice; la posterior hidròlisi de l'acetat obtingut amb una base feble, com és ara el  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , per evitar racemitzacions, condueix a l'altre enantiòmer de l'alcohol inicial (Figura 1.37).



**Figura 1.37** Resolució de l'alcohol secundari **43** mitjançant transesterificació, catalitzada per lipases ( $\text{R} = -(\text{CH}_2)_8-\equiv$ ).

#### 1.3.2.1.2.1.1. Efecte del solvent

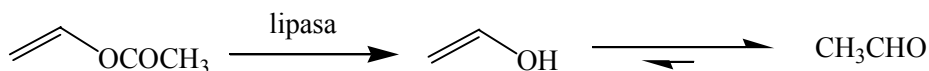
Donat que els substrats naturals de les lipases són insolubles en aigua, aquests enzims estan especialment estructurats per actuar en la interfase H<sub>2</sub>O/solvent orgànic. Per aquesta raó, les lipases són l'elecció òptima per treballar en dissolvents orgànics[120].

Els efectes dels solvents orgànics sobre l'activitat de l'enzim són principalment deguts a les interaccions amb l'esfera d'aigua essencial unida a aquest, que no pas deguts a les interaccions amb l'enzim mateix[121]. Hom parla de l'enginyeria del medi, com la capacitat d'influenciar les propietats d'un enzim a través del canvi de la naturalesa del solvent emprat[127]. La hidrofobicitat del dissolvent juga un rol vital en l'acilació enzimàtica, ja sigui en termes de rendiment com d'enantioselectivitat. Sembla ser, pels estudis realitzats, que els solvents apolars constitueixen la millor opció quan es tracta d'aquest tipus de reacció. S'ha experimentat amb diversos solvents de característiques hidrofòbiques distintes per realitzar la resolució enzimàtica de diferents alcohols secundaris de cadena llarga mitjançant transesterificació, com per exemple el toluè, l'hexà, l'èter diisopropílic, l'èter dibutílic, l'èter *tert*-butilmetílic, el clorur de metilè, i l'acetonitril[113, 115]. D'entre aquests, el <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>O va donar els alcohols i els acetats amb un ee més elevat i amb uns temps de reacció raonables. És per tant que en els nostres experiments també s'utilitzarà aquest solvent.

#### 1.3.2.1.2.1.2. Elecció de l'agent acilant.

Pel que fa a l'agent donador de grups acil, l'efecte d'aquest sobre l'enantioselectivitat de les transesterificacions catalitzades per lipases ha estat descrit per Ema i col[128]. S'ha d'escollir un reactiu acilant que doni una reacció irreversible, per tal que l'alcohol produït durant la transesterificació no pugui ser emprat per l'enzim, fet que produiria una davallada en la puresa del nostre producte.

Entre els agents donadors de grups acils, hom pot trobar l'acetat d'etil, d'isopropil, d'isopropenil, de vinil, de tricloroetil, etc. En el treball realitzat per Sharma i col[113] s'obtenen bones enantioselectivitats tot emprant l'acetat de vinil. Aquest reactiu, un cop ha cedit el grup acetat, es transforma en un alcohol vinílic que per tautomeria ceto-enòlica dona com a producte final l'acetaldehid (Figura 1.38).



**Figura 1.38** Formació d'acetaldehid a partir de l'acetat de vinil per pèrdua del grup acil en presència de lipases.

#### 1.3.2.1.2.1.3. Efecte de l'adsorció de lipases sobre suports polimèrics

La major part de les preparacions comercials de lipases que es poden trobar als catàlegs usuals són en forma de crus, en els quals només és present una petita fracció de proteïna i només una petita part d'aquesta proteïna es presenta com a lipasa. Les preparacions típiques d'enzim contenen només un 10% de la proteïna d'interès.

Molts d'aquests tipus de processos poden ser millorats mitjançant la immobilització del catalitzador<sup>[129]</sup>. Això implica un augment en l'estabilitat del maneig, un augment de l'estabilitat tèrmica, s'afavoreix un accés més fàcil dels substrats a l'enzim i es permet una separació més senzilla de la mescla de reacció.

Les tècniques d'immobilització impliquen l'adsorció de l'enzim a un suport sòlid. Aquesta unió s'aconsegueix ja sigui mitjançant interaccions covalents o no covalents entre la proteïna i el suport.

L'adsorció de proteïnes sobre superfícies sòlides és el resultat global de distintes classes d'interaccions que impliquen les propietats de l'enzim, de la superfície del suport, la quantitat d'aigua present i la presència d'altres soluts. Les principals forces que governen l'adsorció són de tipus electrostàtic i hidrofòbic. Generalment, l'adsorció és irreversible.

El suport sòlid presenta una superfície limitada sobre la qual la proteïna pot ser adsorbida. La quantitat d'adsorció depèn de la grandària de la molècula, de l'àrea superficial del suport i del nombre de llocs disponibles per l'adsorció de la proteïna. L'àrea disponible dependrà de la naturalesa de la superfície (porositat, grandària de porus, etc).

L'adsorció de lipases inclou un seguit de passos. La molècula de lipasa ha de ser transportada a la superfície, ja sigui per convecció o per difusió, per tal de ser adsorbida. Després de l'adsorció, tenen lloc reorganitzacions tant a nivell macroscòpic com microscòpic en l'estructura de la proteïna. Les proteïnes varien en la seva afinitat per un

cert tipus de superfície, i per tant, l'adsorció és més ràpida en un tipus de suport que en altres.

En el nostre cas particular, es van provar diferents tipus de lipases, tant lliures com dipositades sobre suports sòlids, com el Celite<sup>®</sup>, un tipus de sílica com és el sol-AK-gel, suports iònics, com és el cas del *lipozymeIM* i suports altament hidrofòbics com és l'EP-100 que és un polímer de polipropilè i l'estirè-divinil-benzè, SDVB, per tal de dur a terme una exploració de quines eren les millors opcions.

Els procediments seguits per immobilitzar les lipases tant sobre Celite<sup>®</sup> com sobre EP100 i SDVB es detallen a la part experimental (els altres suports ja s'aconsegueixen adsorbits amb la lipasa desitjada).

El procediment estàndard seguit en aquesta primera selecció, realitzat a un nivell analític, va ser el de dissoldre 25 mg (0,12 mmol) de l'alcohol racèmic **43** en 1,25 mL de <sup>1</sup>Pr<sub>2</sub>O i 18 μL (0,19 mmol) d'acetat de vinil i afegir la quantitat de lipasa, lliure o immobilitzada, requerida. La mescla de reacció s'agita a 125 rpm, a una temperatura controlada de 25°C. Es deixa evolucionar la reacció, tot seguint-la per cromatografia de gasos fins que la conversió de l'alcohol en acetat s'apropi al 50% (en un temps de reacció raonable), ja que a conversions superiors, l'enzim comença a prendre l'altre isòmer com a substrat, fet que implica una davallada en l'excés enantiomèric de l'acetat. A conversions inferiors, tot i que l'acetat està molt enriquit en un isòmer, l'ee de l'alcohol és encara molt baix.

La suspensió es filtra, s'evapora el solvent i l'alcohol es separa de l'acetat mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice. Un cop es té l'acetat aïllat, aquest s'hidrolitza amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH, durant 3 h. Després del tractament de la reacció, el cru es purifica de nou, tot aconseguint, d'aquesta manera, els dos alcohols òpticament purs separats.

L'excés enantiomèric, així com la configuració absoluta, es van determinar per derivatització dels alcohols amb l'àcid de Mosher (àcid (*S*)-(-)-metoxitri fluorometilacètic, MTPA), tot seguint un procediment descrit per Ward i Rhee<sup>[130]</sup>. Així, l'alcohol que és acilat és el que correspon a la configuració *R* (**44**), mentre que l'alcohol que roman sense alterar presenta la configuració *S* (**45**). Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 1.7.

**Taula 1.7** Resolució de l'alcohol racèmic **43** catalitzada per lipases.

entrada	biocatalitzador <sup>a</sup>	quantitat d'enzim (mg)	temps de reacció (h)	% conversió <sup>b</sup>	% ee alcohol <sup>c</sup> (S)-45	% ee alcohol <sup>c,d</sup> (R)-44
1	PPL	63	47	24	42	95
2	PPL-Celite <sup>®</sup>	100	47	34	33	>95
3	PPL-Celite <sup>®</sup>	200 <sup>e</sup>	48	33	34	>95
4	PPL-Celite <sup>®</sup>	200 <sup>f</sup>	48	32	33	95
5	PPL-EP100	50	8	38	60	92
6	PPL-EP100	50	23	50	90	95
7	PPL-EP100	125	23	55	>95	>90
8	PPL-SDVB	50	58	21	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
9	CRL- Celite <sup>®</sup>	100	191	37	23	16
10	CRL- EP100	100	95	9	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
11	CAL	100	23	100	0	0
12	PSL-EP100	100	4	90	0	0
13	RML	100	33	0	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
14	RML- <i>lipozymeIM</i>	100	8	43	60	90
15	RML- <i>lipozymeIM</i>	100	23	55	86	85
16	RML- <i>lipozymeIM</i>	1000	120	24	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
17	RML- <i>lipozymeIM</i>	4000	14	20	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
18	RML-sol-AK-gel	100	23	0	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
19	RML-EP100	100	4	46	56	76
20	ANL-EP100	100	23	13	---- <sup>g</sup>	---- <sup>g</sup>
21	acilasa-EP100	100	29	50	31	18

<sup>a</sup>Abreviatures: ANL, *Aspergillus niger*; CAL, *Candida antarctica*; CRL, *Candida rugosa*; PPL, *lipasa pancreàtica de porc*; PSL, *Pseudomonas sp*; RML, *Rizhomucor miehei*. <sup>b</sup>La conversió es mesura per CG i es calcula per la relació d'àrees que existeix entre els pics de l'alcohol **45** i de l'acetat **46**. <sup>c</sup>Els excessos enantiomèrics estan mesurats per RMN de <sup>19</sup>F dels èsters diastereomèrics de Mosher. <sup>d</sup>ee calculat després de ser hidrolitzat a alcohol mitjançant K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. <sup>e</sup>S'utilitzen els mateixos equivalents d'acetat de vinil (1,5 equiv). <sup>f</sup>S'utilitza el doble d'equivalents d'acetat de vinil (3 equiv). <sup>g</sup>No s'ha calculat l'excés enantiomèric.

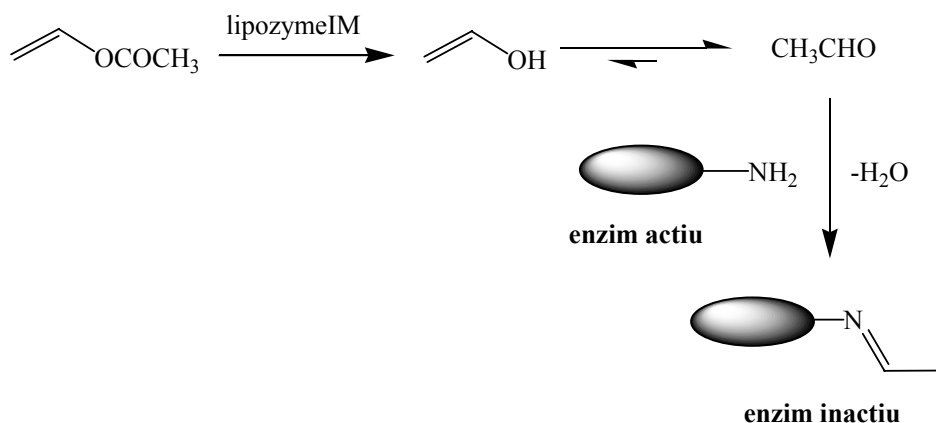
Pel que es pot observar, de totes les lipases provades, incloent l'acilasa<sup>[118]</sup>, les que millor resultats van donar, o millor selectivitat van exhibir, són la PPL adsorbida sobre EP100 i la RML sobre un suport de tipus iònic (*lipozymeIM*). Amb les altres lipases o bé l'alcohol **43** no era reconegut com a substrat (com en els casos de la CRL o de la ANL, ambdues sobre EP100) o bé el suport escollit no era l'adequat (com ara la

RML sobre EP100, sobre sol-AK-gel o sense adsorbir, l'acilasa sobre EP100 o la CRL sobre Celite<sup>®</sup>), o la reacció procedeix massa ràpid, essent doncs poc selectiva (com per exemple la CAL i la PSL sobre EP100).

Tot i que, evidentment, es podrien haver experimentat diferents concentracions d'enzim, canviar els suports en aquelles preparacions que no funcionaven o inclús provar-ne de nous, aquests estudis quedaven lluny dels objectius d'aquesta Tesi. Per tant, es va escollir per intentar escalar la resolució de l'alcohol **43**, la PPL adsorbida sobre EP100 i la RML sobre suport iònic (*lipozymeIM*).

La resolució enzimàtica amb l'enzim RML adsorbit en un suport iònic (*lipozymeIM*) presenta alguns trets remarcables a considerar, segons es desprèn de la Taula 1.7. Sembla que la reacció depèn de la relació entre la massa d'enzim immobilitzat i la quantitat d'acetat de vinil present al medi. Així, la conversió de substrat i l'activitat enzimàtica d'aquesta lipasa decreixen en augmentar tant la quantitat d'enzim com la d'agent acilant, tot mantenint les concentracions invariables tal com es pot veure a les entrades 16 i 17 de la Taula 1.7. En canvi, això no succeeix quan es treballa amb l'enzim PPL sobre EP100 (entrades 3 i 4 de la mateixa taula).

Els resultats trobats amb la RML sobre aquest suport suggereixen que l'acetat de vinil, en aquestes condicions, podria hidrolitzar-se de forma espontània en entrar en contacte amb la resina d'intercanvi iònic utilitzada com a suport. Aquest fet generaria grans quantitats d'acetaldehid (Figura 1.38, pàgina 61) el qual seria capaç de reaccionar amb els grups amino dels residus de lisina i arginina de l'enzim tot formant les corresponents bases de Schiff fet que conduiria a la inactivació de l'enzim (Figura 1.39). Aquest fenomen, en treballar a una escala de treball petita (com són els 100 mg d'enzim utilitzats generalment en els assaigs), no es dona degut potser a que la velocitat de descomposició de l'acetat de vinil és inferior a la velocitat de transesterificació i per tant, en aquest cas, l'enzim no es desactiva.



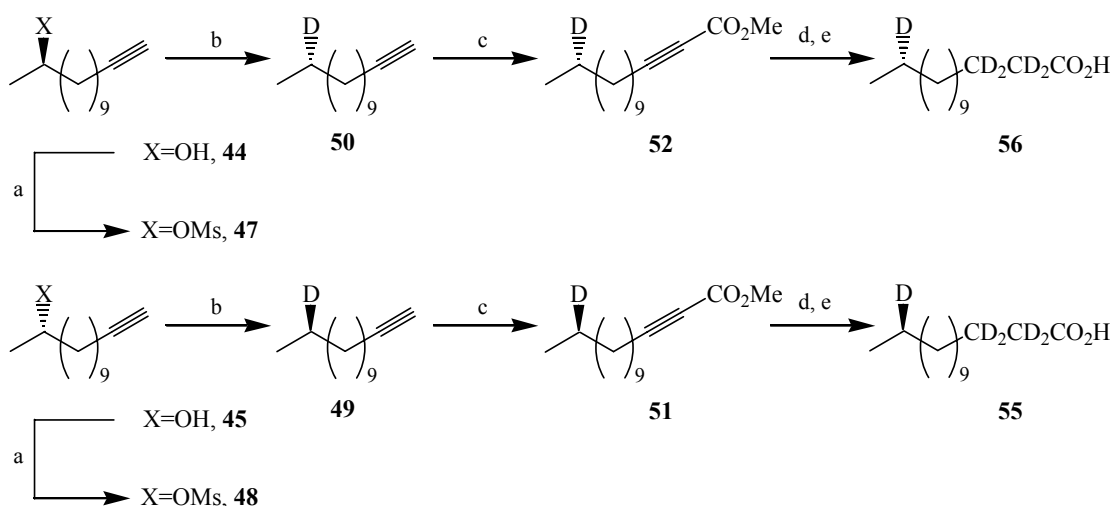
**Figura 1.39** Possible desactivació de l'enzim deguda a l'acetaldehid generat per hidròlisi de l'acetat de vinil.

Per tant, la millor opció va ser la utilització de l'enzim PPL adsorbit sobre un suport de tipus hidrofòbic com és l'EP100. En aquestes condicions, l'excés enantiomèric determinat per l'alcohol **45** mitjançant l'èster de Mosher és superior al 95%, mentre que l'excés enantiomèric de l'alcohol òpticament pur **44** és del 84%.

#### 1.3.2.1.3. *Obtenció dels àcids polideuterats 55 i 56*

Cadascun dels enantiòmers per separat va ser transformat en els àcids finals **55** i **56** tal com es mostra a la Figura 1.40.

La introducció de la marca de deuteri sobre el centre estereogènic es va aconseguir mitjançant una seqüència de 2 passos. En el primer, els alcohols es van activar als corresponents mesilats **47** i **48**, tot seguint el mètode descrit per Yoshida i col[60]. Posteriorment, s'introdueixen els deuteris per desplaçament dels grups mesiloxi amb  $\text{LiAlD}_4$ [61]. Val a dir que, donat que es tracta d'una substitució nucleòfila bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ), l'atac té lloc amb inversió de la configuració del centre estereogènic. Per tant, s'obté l'alquí **49** de configuració *R* a partir de l'alcohol **45** de configuració contrària, *S*, i l'enantiòmer deuterat **50** (*S*) a partir del corresponent alcohol **44**, d'estereoquímica *R*.



*Reactius i condicions:* (a)  $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{MsCl}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h (**47**, 81%; **48**, 82%); (b)  $\text{LiAlD}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , ta, 3 h, (**50**, 70%; **49**, 78%); (c) *n*-BuLi, THF,  $-60^\circ\text{C}$ , 10 min, llavors  $\text{ClCO}_2\text{Me}$ , THF, ta, 1 h (**52**, 83%; **51**, 70%); (d) Mg,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ta, 16 h, (**54**, 67%, **53**, 56%); (e) KOH,  $\text{CH}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , ta, 16 h, (**56**, 84%; **55**, 87%).

**Figura 1.40.** Esquema de reaccions que condueixen als àcids enantiomèricament purs **55** i **56**.

A partir d'aquests moments se suposa que la configuració es manté i no hi ha pèrdua d'excés enantiomèric, en tractar-se d'un deuteri aïllat en la cadena, ja que no existeix manera de poder diferenciar l'enantiòmer *R* del *S*.

Els acetilens terminals van ser transformats en els corresponents èsters acetilènics  $\alpha,\beta$ -insaturats **51** i **52**<sup>[75]</sup> tal com es va explicar en l'apartat 1.2.4.1 en la síntesi de **20**, **21** i **26**. La introducció dels deuteris en les posicions  $\alpha$  i  $\beta$  de l'èster va ser possible mitjançant la reducció selectiva del triple enllaç amb Mg en presència de  $\text{CD}_3\text{OD}$ <sup>[71]</sup>. La saponificació final dels èsters **53** i **54** amb KOH/ $\text{CH}_3\text{OD}$  condueix als àcids finals **55** (de configuració *R* en el C13) i **56** (de configuració *S*).

La presència de deuteri en els precursors sintetitzats va ser confirmada, d'igual forma que en els precursors polideuterats **24**, **25** i **28**, mitjançant l'anàlisi per CG-EM dels corresponents èsters metàlics (formats per reacció dels àcids amb una solució de  $\text{BF}_3\cdot\text{MeOH}$ ), tot essent l'ió molecular ( $\text{M}^+$ ) per ambdós àcids,  $m/z=247$ .

A més, la presència dels àtoms de deuteri en C2 i C3 va ser confirmada per la multiplicitat i les constants d'acoblament dels corresponents senyals a 33,4 (quintet,  $J=19,5$  Hz) i 23,8 (quintet,  $J=21,0$  Hz) ppm dels espectres de RMN de  $^{13}\text{C}$ .



De la mateixa forma, l'existència del grup –CDH- en la posició 13 de la cadena dels dos àcids va ser confirmada per la presència d'un senyal a 22,2 ppm en forma de triplet ( $J=19,0$  Hz) en els espectres de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

### 1.3.3. Estereoespecificitat de la 1,4-dessaturasa. Resultats i discussió

Encara que el substrat natural de la 1,4-dessaturasa és el (*Z*)-11-tetradecenoïl-CoA, aquest compost és biosintetitzat intracel·lularment a partir dels substrats saturats administrats, **55** i **56**[48]. De la mateixa forma, els derivats deuterats corresponents als àcids tridecanoics, **168** i **169** són també substrats adequats pel nostre estudi, ja que la 1,4-dessaturasa és capaç de produir l'(*E,E*)-10,12-tridecadienoat a partir del (*Z*)-11-tridecenoat[46, 85].

Els resultats obtinguts en els experiments de marcatge amb els dos tipus d'àcids deuterats **55**, **56** i **168**, **169** es troben recollits a la Taula 1.8

**Taula 1.8** Estereoquímica absoluta de l'abstracció dels hidrògens en els carbonis C10 i C13 en la transformació de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic en l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic.

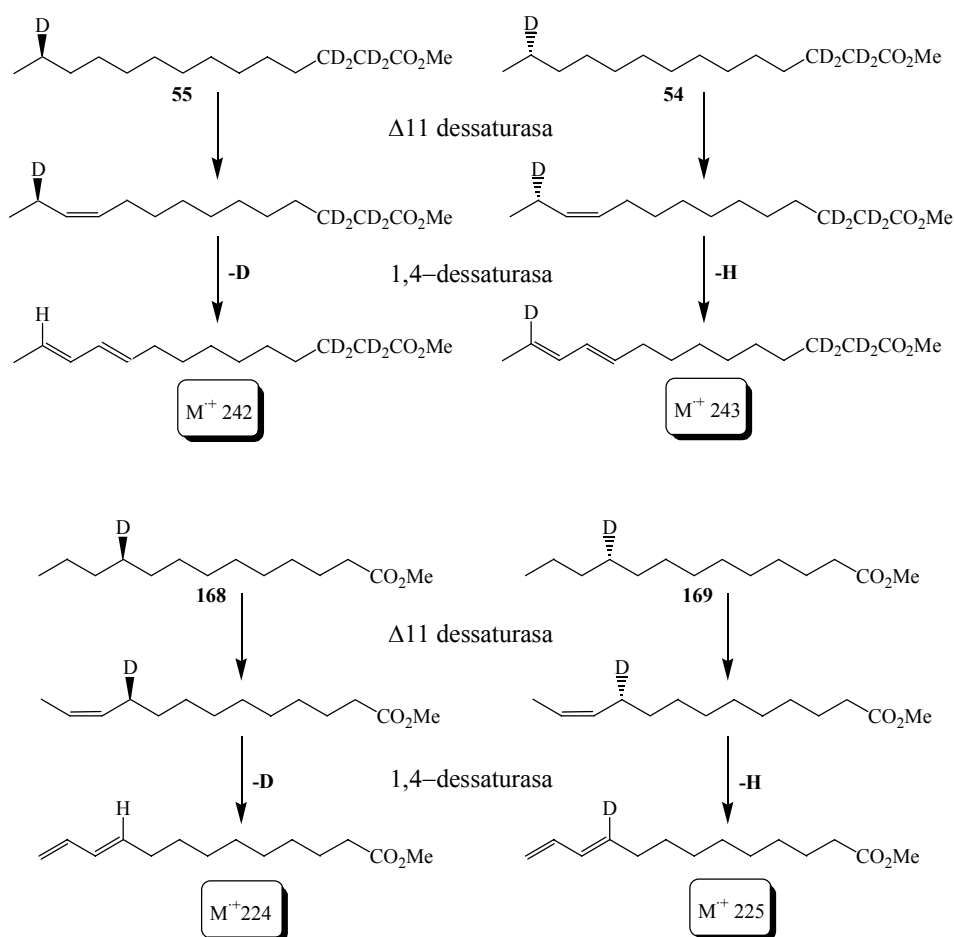
substrats	isotopòmers (%) <sup>a</sup>			
	d <sub>0</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub>
<b>168</b> ( <i>R</i> )	93,0±2,8	7,0±0,1		
<b>169</b> ( <i>S</i> )	4,9±0,3	95,1±5,2		
<b>55</b> ( <i>R</i> )			92,6±3,7	7,4±0,8
<b>56</b> ( <i>S</i> )			9,2±0,9	90,8±2,9

<sup>a</sup>Els percentatges d'isotopòmers corresponen a les mitjanes ± desviació estàndard de tres experiments independents realitzats amb grups de tres glàndules, a excepció de l'experiment amb l'àcid **168**. En aquest cas, les dades corresponen a dos determinacions amb grups de 16 glàndules. Els percentatges estan corregits tot considerant les abundàncies dels ions  $M^{+1}$  i  $M^{+1}$  en cadascun dels substrats.

Les quantitats relatives de cada isotopòmer de l'(*E,E*)-10,12-dienoat format per cada substrat aplicat de manera individual, fou mesurada per CG-EM tal com es va fer per determinar la criptoregioquímica d'aquesta mateixa dessaturasa.

Els diens formats a partir dels àcids que presenten un deuteri de configuració *S* (**56** i **169**) presenten uns ions moleculars centrats a  $m/z$  243 (per tant, es mantenen els

cinc àtoms de deuteri de partida) i a  $m/z$  225 (tampoc aquí hi ha pèrdua de deuteri), respectivament. Per altra banda, els diens formats a partir dels àcids **55** i **168**, tots dos amb deuteris de configuració *R*, exhibeixen ions moleculars a  $m/z$  242 i  $m/z$  224, respectivament, tot corresponent als diens formats mitjançant l'eliminació dels deuteris situats en les posicions C13 (a partir de **55**) i C10 (a partir de **168**), tal com es mostra a la Figura 1.41.



**Figura 1.41** Transformació dels àcids **54**, **55**, **168** i **169** en els corresponents (*E,E*)-10,12-dienoats.

Aquests resultats indiquen que tant l'hidrogen *pro*-(*R*) de la posició C13 com l'hidrogen *pro*-(*R*) de la posició C10 són eliminats de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic per formar l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic[131].

L'estereoespecificitat trobada per aquesta desaturasa és idèntica a altres desaturases estudiades, com la  $\Delta 9$  estearoil-CoA desaturasa de diversos sistemes[80, 81], la  $\Delta 12$  oleoil-CoA desaturasa[80] i algunes  $\Delta 11$  acil-CoA desaturases[82, 83]. A

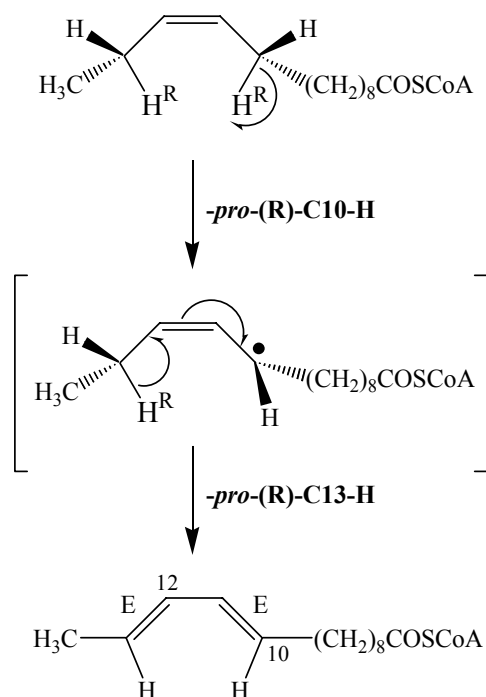
més, presenta la mateixa estereoespecificitat que la trobada per la  $\Delta^9$  dessaturasa de la mateixa espècie, *S. littoralis*, la qual també dona lloc a un diè conjugat, l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic a partir de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic<sup>[85]</sup>.

Com ja s'ha comentat en apartats previs, en tots els casos investigats fins el moment, les dessaturases que presenten una estereoespecificitat *pro*-(*R*)/*pro*-(*R*) condueixen a la formació de dobles enllaços de configuració *Z*, mentre que les olefines isomèriques amb el doble enllaç de geometria *E*, provenen de l'abstracció estereoespecífica dels hidrògens *pro*-(*R*)/*pro*-(*S*)<sup>[83, 84]</sup>.

Interessantment, l'enzim estudiat en aquest treball també presenta una estereoespecificitat *pro*-(*R*)/*pro*-(*R*), però a diferència dels casos estudiats fins ara, dona lloc a un sistema diènic amb ambdós dobles enllaços de configuració *E*.

Una possible explicació per aquest fet, vindria considerant que les dessaturacions enzimàtiques són processos de deshidrogenació de tipus *sin*<sup>[132]</sup>. Per tant, es pot pensar que ambdós hidrògens *pro*-(*R*), tant de la posició C10 com de la posició C13, adopten una relació de tipus *sin* en el centre actiu de l'enzim. Si es considera la criptoregioquímica d'aquesta reacció<sup>[76]</sup>, desxifrada en l'apartat anterior, la dessaturació de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic té lloc en dues etapes: oxidació del carboni C10, determinant de la velocitat de reacció, amb pèrdua de l'hidrogen *pro*-(*R*), seguida d'eliminació de l'hidrogen *pro*-(*R*) C13.

Si fos possible la rotació dels enllaços en el decurs de la reacció, es produiria la formació de diens de diferents geometries. És a dir, s'obtindrien mescles dels isòmers *E* i *Z*. Tanmateix, l'intermedi format després de la primera abstracció d'hidrogen, presenta una estructura de radical al·lilic, summament inestable i amb un temps de vida mitjana extremadament curt<sup>[44]</sup>. Per tant, és de suposar que les rotacions a través de l'enllaç  $\sigma$  són poc probables i per tant, el diè resultant és obligat a adoptar una configuració de tipus (*E,E*), tal com es mostra a la Figura 1.42.



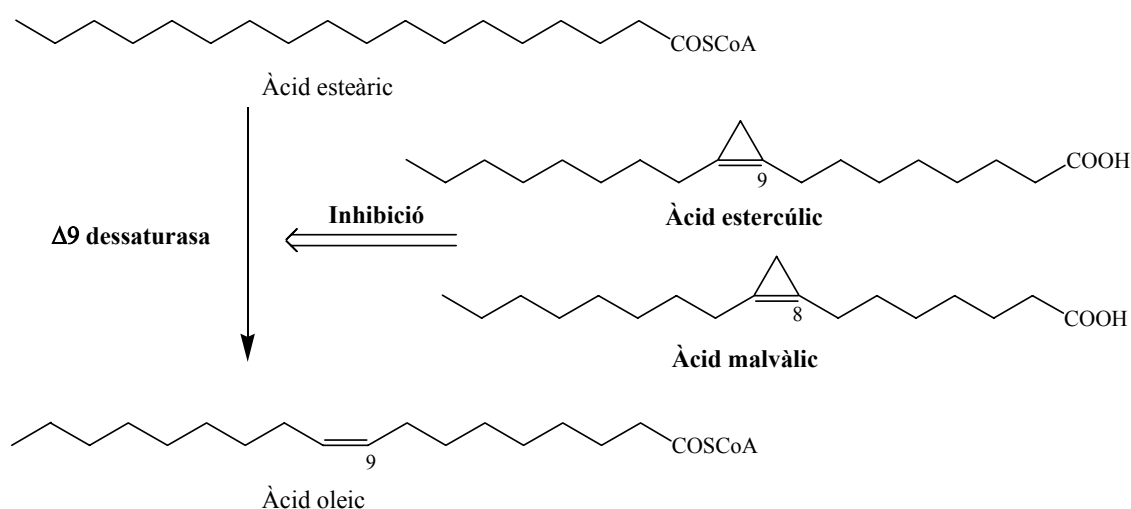
**Figura 1.42** Transformació de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic en l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic. Segons la criptoregioquímica i l'estereoquímica determinades per aquesta dessaturasa, la conversió implica una etapa lenta que consisteix en l'abstracció de l'hidrogen *pro*-(R) de la posició C10, amb la formació d'un intermedi al·lílic inestable de vida mitjana molt curta, el qual col·lapsa en el corresponent diè mitjançant l'eliminació ràpida de l'hidrogen *pro*-(R) de la posició C13 i reorganització concomitant del doble enllaç. La geometria (*E,E*) final ve determinada per la relació *sin* que adopten els dos hidrògens *pro*-(R) del substrat olefínic inicial en el lloc actiu de l'enzim.

Aquest fet no és nou, ja que un mecanisme similar va ser proposat per Fritsche i col[34] en la formació de l'àcid calèndic (àcid (*E,E,Z*)-8,10,12-octadecatrienoic) a partir de l'àcid linoleic (àcid (*Z,Z*)-9,12-octadecadienoic) i confirmat per Reed i col[42], els quals, a més, especulen que el canvi entre una deshidrogenació 1,2 (dessaturació) i una deshidrogenació 1,4, pot ser controlat per un moviment imperceptible en la posició de l'agrupació de ferro relativa als substrats, els quals adopten una conformació que permet l'eliminació de tipus *sin* de dos hidrògens que ara es troben pròxims a l'espai (les distàncies H-H són aproximadament de 2,5Å).

## 1.4. ESTUDIS D'INHIBICIÓ DE LES DESSATURASES PRESENTS EN *S. LITTORALIS* MITJANÇANT CICLOPROPENS

### 1.4.1. Introducció i objectius

Els primers compostos descrits com a inhibidors de dessaturases foren els àcids grassos ciclopropènics estercúlic i malvàlic, aïllats a partir de fulles i oli de llavors de plantes de l'ordre de les Malvàcies, de les quals el cotó és l'exemple més conegut[133]. Ambdós compostos inhibeixen la dessaturació de l'àcid esteàric a àcid oleic, tal com es mostra a la Figura 1.43.



**Figura 1.43** Inhibició de la  $\Delta 9$  dessaturasa per acció d'àcids grassos ciclopropènics.

El mecanisme d'inhibició dels àcids ciclopropènics va ser suggerit per primer cop per Kircher[134]. Segons Kircher, els derivats ciclopropènics, amb una reactivitat del doble enllaç superior a la dels corresponents alquens, podrien unir-se als grups tiols dels residus de cisteïna presents a les proteïnes en unes condicions fisiològiques en les quals la resta dels dobles enllaços dels àcids grassos restaven inalterats. Això podria originar canvis en les propietats físiques i bioquímiques de les proteïnes, canvis que serien responsables, en darrer terme, dels efectes observats *in vivo*.

Raju i Reiser[135] van realitzar el primer estudi de l'acció de l'àcid estercúlic sobre l'estearoil-CoA dessaturasa i van comprovar que la hipòtesi de Kircher era certa i que la inhibició era de caràcter irreversible. També es va descartar la possibilitat que el derivat ciclopropènic inactivés, no la dessaturasa, sinò el coenzim A encarregat

d'activar els àcids, ja que l'addició d'un excés de coenzim A no feia recuperar l'activitat de l'enzim.

Allen i col<sup>[136]</sup> van observar que l'àcid estercúlic (amb el cicle en la posició 9-10) era millor inhibidor de la  $\Delta^9$  dessaturasa que el malvàlic (amb el cicle en la posició 8-9) i proposaren que el tipus d'inhibició observada hauria de ser o bé irreversible o bé reversible competitiva, tot i que experiments realitzats posteriorment els van fer arribar a la conclusió que la inhibició, tal com plantejaven Raju i Reiser, era irreversible.

El mecanisme d'acció, malgrat tot, no estava gens clar i l'any 1970, Pande i Mead<sup>[137]</sup> qüestionaren les conclusions anteriors, tot postulant que la inhibició era fruit d'un efecte detergent inespecífic d'aquests derivats d'àcids grassos i no pas per la unió a restes de tiol presents a les proteïnes.

De nou aquesta conjectura va ser rebatuda, aquest cop per Jeffcoat<sup>[138]</sup>, el qual arribà a la conclusió que, tot i que la unió entre l'enzim i l'inhibidor era molt forta, no podia tractar-se d'una unió covalent i, per tant, irreversible. Per altra banda, va concloure que, anàlogament a com té lloc en els àcids grassos, les formes actives dels àcids grassos ciclopropènics són els corresponents tioèsters de CoA.

Tot i així, el mecanisme d'inhibició de les dessaturases per part dels àcids grassos ciclopropènics roman fosc i encara no està comprès.

Pel que fa als requeriments estructurals necessaris per tal que existeixi inhibició de la dessaturació, Johnson i col<sup>[139]</sup> van demostrar que l'anell ciclopropènic era imprescindible per tal que es produeixi inhibició, ja que la hidrogenació d'aquests productes conduïa a productes inactius. Clark i Kircher<sup>[140]</sup>, per la seva banda, van mostrar que un anàleg estructural de l'àcid estercúlic amb el doble enllaç exocíclic no inhibia la dessaturació de l'àcid esteàric a oleic.

Johnson<sup>[139]</sup> també va trobar que tant l'àcid estercúlic com el malvàlic inhibien la dessaturació en la posició 9 de diferents àcids alifàtics de 12 a 20 àtoms de carboni, independentment de la llargada de cadena.

Per altra banda, Fogerty i col<sup>[141]</sup>, en un estudi de tipus relació estructura-activitat, mostraren que només quan l'anell ciclopropènic es trobava sobre l'àtom C9 i/o C10, aquest àcid actuava com a inhibidor de la  $\Delta^9$  dessaturasa, tot suggerint que els àcids grassos ciclopropènics es comportarien com a inhibidors quan alguna de les posicions de l'anell fos coincident amb alguna de les posicions a dessaturar per l'enzim

en el substrat. Això permetria a l'inhibidor unir-se irreversiblement al centre actiu de l'enzim.

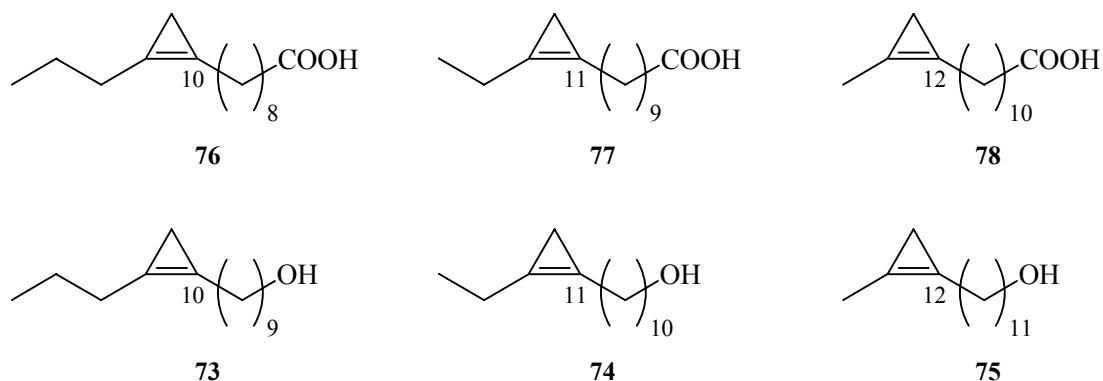
Malgrat tot, existeixen nombrosos exemples en els quals no s'acompleix aquesta norma. En aquests casos, es postula que la inhibició es produeix per interacció del ciclopropè amb algun dels punts de reconeixement del substrat per part de l'enzim. En aquest sentit, Cao i col<sup>[142]</sup> van trobar que els àcids estercúlic i malvàlic inhibien unes  $\Delta 5$  i  $\Delta 6$  dessaturases que presentaven com a substrats àcids grassos amb dobles enllaços en les posicions C8-C9 i C9-C10. En aquest exemple, els autors postulen que el doble enllaç de l'anell ciclopropènic és reconegut per l'enzim i interfereix en el reconeixement del substrat. Al nostre laboratori també es va plantejar aquesta hipòtesi per explicar la inhibició de l'àcid 11,12-metilen-11-hexadecenoic sobre la  $\Delta 9$  dessaturasa de *S. littoralis*<sup>[143]</sup>, el substrat de la qual és l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic, i per tant, el ciclopropè podria ser reconegut per l'enzim i interferir amb la unió del substrat.

#### 1.4.1.1. Objectius

En el nostre grup de treball s'ha treballat molt amb àcids grassos ciclopropènics, tant en la seva utilització com a eina en l'elucidació de rutes biosintètiques d'insectes, <sup>[143-145]</sup>, estudiant aspectes mecanístics de la inhibició<sup>[146-148]</sup>, com posant a punt diferents rutes sintètiques per a obtenir-los<sup>[149, 150]</sup>. A més, s'ha investigat la inhibició per diversos àcids grassos ciclopropènics de 14 i 16 àtoms de carboni amb el doble enllaç en diferents posicions tant de la  $\Delta 11$  com de la  $\Delta 9$  dessaturasa en *S. littoralis*. Al llarg de tots aquests estudis, el principal problema ha estat la dificultat de preparar aquests àcids grassos ciclopropènics de forma senzilla i eficient.

Amb aquests antecedents, els objectius d'aquest apartat foren:

1. Síntesi dels àcids grassos ciclopropènics **76**, **77** i **78** pel procediment descrit per Baird i col<sup>[151]</sup>, que era presumiblement més senzill i eficient que els mètodes anteriorment utilitzats al laboratori (Figura 1.44).
2. Determinació de l'activitat inhibidora de **76**, **77** i **78** i dels alcohols precursors **73**, **74** i **75** sobre les dessaturases de *S. littoralis*.



**Figura 1.44** Estructura dels diferents àcids (**76**, **77** i **78**) i alcohols grassos ciclopropènics (**73**, **74** i **75**) sintetitzats.

## 1.4.2. Síntesi dels àcids grassos ciclopropènics **76**, **77** i **78**

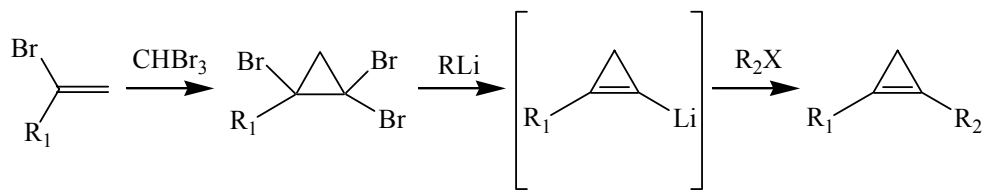
### 1.4.2.1. Aproximacions sintètiques.

Des d'un punt de vista sintètic, l'anell ciclopropènic es pot obtenir de quatre formes diferents:

- 1) Addició de carbens i carbenoids a alquins, metodologia molt emprada al nostre grup de treball[48, 144, 149].
- 2) Reaccions d'eliminació 1,2 de ciclopropanos funcionalitzats convenientment[151-153].
- 3) Cicllació de carbens  $\alpha,\beta$ -insaturats tot formant l'enllaç senzill[154].
- 4) Cicllació intramolecular amb formació d'un doble enllaç[155].

D'entre totes aquestes metodologies es va escollir la segona, la qual, a partir d'1,2-dihalo, 1,1,2-trihalo i 1,1,2,2-tetrahalociclopropanos, per deshalogenació amb dos equivalents d'alquil liti i posterior reacció de l'anió resultant amb un electròfil, condueix als corresponents ciclopropens 1,2-disubstituïts amb rendiments força elevats ( $\approx 50\%$ ) si es considera que en els casos anteriors els rendiments finals són bastant escadussers (Figura 1.45). Aquesta aproximació ha estat aplicada amb èxit en l'obtenció de diferents derivats ciclopropènics[151, 156].

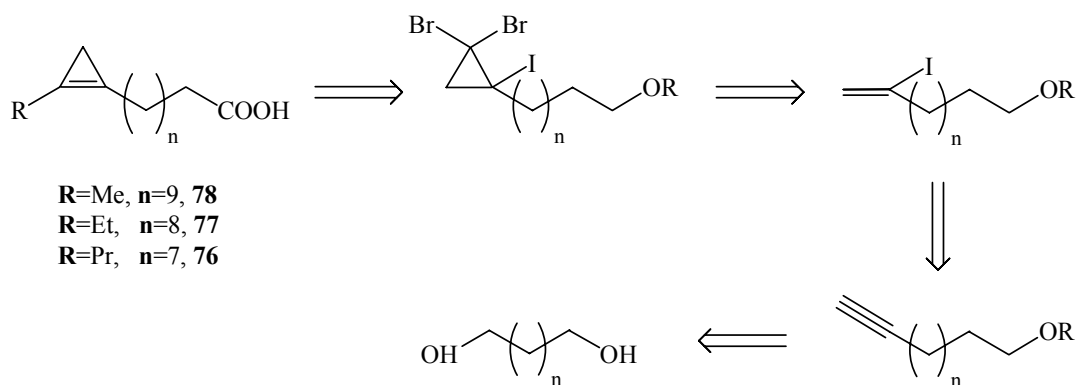




**Figura 1.45** Síntesi de ciclopropens 1,2 disubstituïts a partir d'1,1,2-trihalociclopropans.

#### 1.4.2.2. Intent de síntesi de 76, 77 i 78 a partir de trihalociclopropans de cadena llarga

Com s'ha acabat de comentar, es va escollir la reacció de derivats 1,1,2-trihalociclopropans amb alquil litis i posterior alquilació de l'intermedi ciclopropenil liti amb un electròfil, en aquest cas, un halur d'aquil. En una primera aproximació, es va pensar en una anàlisi retrosintètica on, tot partint d'un alquí de cadena llarga i, per formació del corresponent halur vinílic s'arribés als intermedis clau d'estructura 1,1,2-trihalociclopropà que fornirien el ciclopropè disubstituït per posterior deshalogenació i alquilació amb iodurs d'alquí de cadena curta, tal com es mostra a la Figura 1.46.

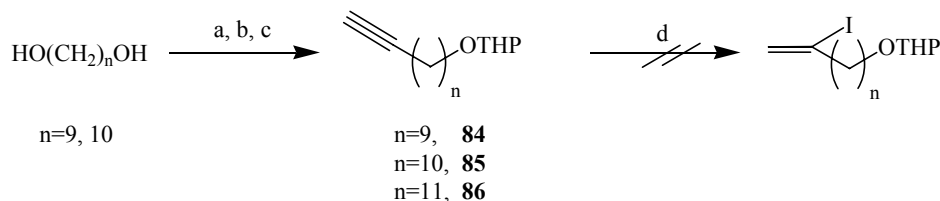


**Figura 1.46** Anàlisi retrosintètica proposada per a la síntesi de 76, 77 i 78.

Tanmateix, la ruta no va resultar apropiada i es van haver de proposar diferents canvis fins que finalment es va abandonar. En els pròxims apartats s'exposarà l'intent de síntesi tant del derivat vinílic com del derivat trihalociclopropànic.

#### 1.4.2.2.1. Síntesi del derivat vinílic a partir de precursors hidroxilats

El primer que es va considerar, i que queda reflectit a l'anàlisi retrosintètica de la Figura 1.46, va ser partir, com és habitual, dels corresponents diols de cadena llarga, i mitjançant la monobromació, seguida de protecció de l'alcohol i posterior alquilació del bromur amb acetilur de liti, seqüències ja explicades en anteriors apartats, obtenir el corresponent alquínol protegit, sobre el qual es formaria el iodur vinílic.



*Reactius i condicions:* (a) HBr (48%), toluè, 2 h 30 min, 130°C, (**58**, 89%; **40**, 93%); (b) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, DHP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 2 h, (**64**, 95%; **65**, 95%; **66**, 95%); (c) acetilè, Li, NH<sub>3</sub>, DMSO, ta, 90 min, (**84**, 97%; **85**, 95%; **86**, 97%); (d) (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl, NaI, H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, 1 h, ta, no s'obté el derivat esperat.

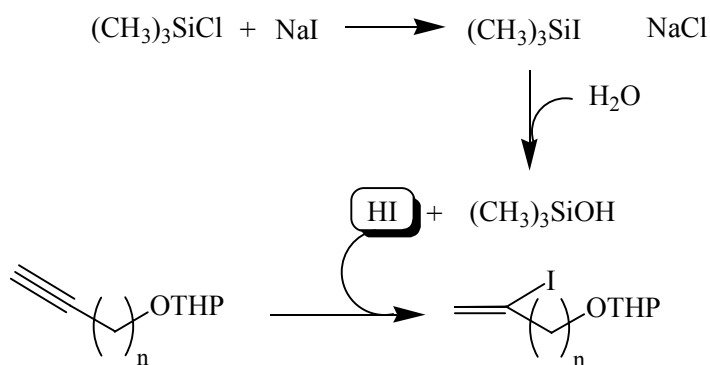
**Figura 1.47** Intent de formació de iodurs vinílics partint de derivats hidroxilats protegits.

Així, tal com es mostra a la Figura 1.47, es va partir de l'1,9-nonandiòl i de l'1,10-decandiòl (ja es disposava de l'11-bromo-1-undecanol), els quals, per reacció amb HBr (48%) a reflux de toluè, van proporcionar els corresponents bromoalcohols **58** i **40** respectivament, amb rendiments excel·lents.

Aquests alcohols es van protegir en forma d'èter tetrahidropiranílic, ja que es necessitava un grup protector que fos possible de desprotegir en condicions molt suaus, donat que l'anell ciclopropènic és molt inestable, tant en condicions àcides com en presència de bases fortes. Es va escollir el grup tetrahidropiranil (THP), ja que alhora que resultava molt fàcil d'introduir, era possible la seva eliminació en condicions de reacció compatibles amb l'anell, en aquest cas emprant *p*-toluensulfonat de piridini (PPTS), en EtOH, a un pH gairebé neutre<sup>[49]</sup>. La protecció es realitzà per reacció de l'alcohol corresponent amb 1,5 equivalents de dihidropirà (DHP) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> emprant com a catalitzador l'àcid *p*-toluensulfònic, obtenint els èters tetrahidropiranílics **64**, **65** i **66** amb molt bon rendiments.

Posterior alquilació amb acetilur de liti va proporcionar els corresponents alquins protegits **84**, **85** i **86**.

Un cop es disposava dels alquins protegits, es va intentar l'addició formal de iode sobre el triple enllaç terminal (hidroiodació). Aquest procediment, descrit per Kamiya i col<sup>[157]</sup>, es basa en la formació *in situ* d'àcid iodhídric (HI) per reacció del trimetilclorosilà (Me<sub>3</sub>SiCl) amb NaI en acetonitril humit, tal com es mostra a la Figura 1.48.



**Figura 1.48** Mecanisme de formació de iodurs vinílics a partir d'alquins terminals i Me<sub>3</sub>SiCl.

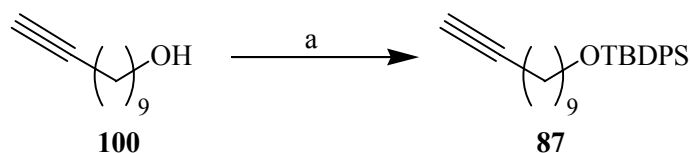
Tal com es pot observar, l'addició de HI té lloc de forma molt suau, mitjançant una addició de tipus Markovnikov, per rendir el iodur vinílic intern i trimetilsilanol com a subproducte de la transformació. Així, es va escollir el derivat **84** per experimentar com procedia la reacció. D'aquesta manera, 2,38 mmol de NaI es fan reaccionar amb 2,38 mmol de (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl en CH<sub>3</sub>CN humidificat amb aigua, durant 10 min a ta. Posteriorment s'afegeixen 1,98 mmol de l'alquí **84** i es deixa 1 h en reacció. Es tracta la reacció i el cru es purifica. Malauradament, la reacció no va evolucionar tal com s'esperava, ja que es recuperaren 0,82 mmol (41%) de producte de partida **84**, juntament amb un altre producte assignat de manera inequívoca al 10-undecin-1-ol (**100**), procedent de l'eliminació del grup THP per catàlisi àcida.

És a dir, el HI format en aquestes condicions és capaç de desprotegir l'alcohol, sense observar-se però, cap traça d'addició de iode, ni tan sols en aquest subproducte. Era clar, doncs, que el grup tetrahidropiranyl no era l'adequat per aquest tipus de reacció. A més, calia protegir l'alcohol, donat que és coneguda la formació de iodurs a partir d'alcohols mitjançant l'addició de HI.

Es va pensar en un grup que fos resistent a aquestes condicions tan àcides i que, per altra banda, resultés fàcilment eliminable per no malmetre l'anell de ciclopropè.

S'escolliren els derivats sililats, concretament el *tert*-butil difenilsilil (TBDPS), el qual era prou estable a pH baixos i fàcilment desprotegit amb ions fluorur<sup>[49]</sup>.

A la Figura 1.49 es mostren les condicions utilitzades en la transformació, així com el rendiment aconseguit.



*Reactius i condicions:* (a) TBDPSCl, imidazole, DMF, 16 h, ta, (**87**, 75%)

---

**Figura 1.49** Protecció del 10-undecin-1-ol en forma de *tert*-butil difenilsilil (TBDPS).

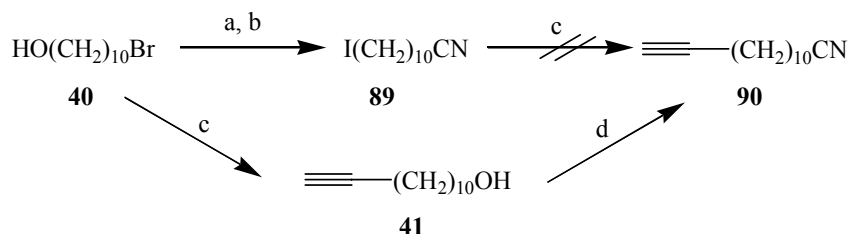
Novament, es va provar la hidroidació de **87**. Després del tractament de la reacció i posterior purificació, es va tornar a obtenir l'alquí de partida desprotegit (**100**), aproximadament en un 26% de rendiment, juntament amb traces de iodur vinílic acompanyat del corresponent *tert*-butil difenilsilanol com a subproducte de desprotecció.

Era bastant evident que el HI format era contraproducte pels nostres interessos. Donat que ens trobàvem limitats per l'etapa de desprotecció quan es disposés de l'anell ciclopropènic, es va decidir canviar d'estratègia.

#### 1.4.2.2.2. *Síntesi del derivat vinílic a partir de precursors amb un grup nitril.*

Ja que la reacció es realitzava en acetonitril, es va decidir canviar el grup hidroxil per un grup nitril, el qual es podia transformar en el corresponent àcid o aldehyd amb relativa facilitat. S'era conscient que en l'etapa de formació del derivat de ciclopropenil liti (Figura 1.45) el grup nitril podria ser atacat per l'organolític utilitzat tot fornint la cetona corresponent. Malgrat tot, Al Dulayymi i col<sup>[152]</sup> descriuen un procediment similar en el qual, en comptes de tenir un grup nitril, disposen d'un grup èster. Segons aquest treball, la desbromació de trihalociclopropans induïda per alquil litis transcorre a -78°C, sense que el grup èster sigui atacat de cap manera.

És per aquesta raó que es va decidir sintetitzar, en primera instància, el derivat **90** i, si la reacció progressava adequadament, obtenir els altres derivats alifàtics. La seqüència sintètica es mostra a la Figura 1.50.



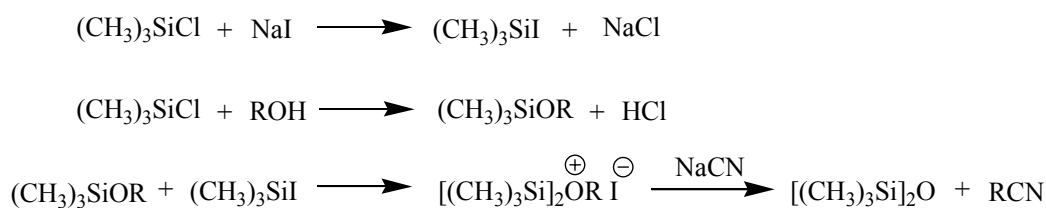
*Reactius i condicions:* (a) NaCN, HMPA, ta, 1 h, (**88**, 84%); (b) PPh<sub>3</sub>, imidazole, I<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O, 0°C, 1 h, (**89**, 85%); (c) acetilè, Li, NH<sub>3</sub>, DMSO, ta, 90 min, (**41**, 97%); (d) (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, THF, ta, 20 min, llavors NaCN, HMPA, 16 h, 85-90°C (**90**, 75%).

**Figura 1.50** Síntesi del 12-tridecin-1-nitril (**90**) a partir de **41** i intent de formació a partir de **89**.

L'hidroxinitril **88** es va formar per atac nucleòfil del NaCN en HMPA sobre el bromoalcohol **40** seguint un procediment descrit per Shaw i col[158]. El grup hidroxil es va transformar en el iodur d'alquil **89** amb I<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub> i imidazole[62].

Aquest iodur **89** es va intentar alquilar amb acetilè seguint el procediment estàndard descrit en aquesta Tesi. Inesperadament, no es va obtenir l'alquí **90**. Les anàlisis per RMN de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C evidenciaven la presència del grup -CN, amb senyals a 2,31 i 119,7 ppm, respectivament, però, en canvi, el grup iodur havia desaparegut i no es veia cap senyal pertanyent a l'alquí terminal. Apareixien, per altra banda, senyals a 3,5 i 45,0 ppm que no eren fàcilment assignables. Quan es va intentar l'alquilació tot emprant el complex de HC≡CLi·EDA (on EDA és l'etilendiamina) en DMSO seguint el mètode descrit per Smith i Beumel[159] el rendiment de **90** va ser només d'un 9%. Així les coses, es va decidir introduir el grup alquí abans que el cianur, tal com s'exposa a la Figura 1.50.

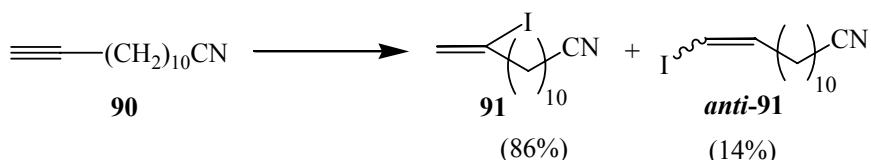
El compost **41** ja havia estat obtingut a l'apartat 1.3.2.1.2. L'únic que calia, doncs, era transformar l'alcohol en el grup nitril. Primerament, es va intentar la transformació tot fent reaccionar **41** amb NaCN, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl, en presència de NaI catalític en el si de DMF/CH<sub>3</sub>CN tal com descriu Davis i Untch[160]; el mecanisme es troba descrit a la Figura 1.51.



**Figura 1.51** Mecanisme proposat per a la transformació d'alcohols primaris en nitrils.

De nou, la reacció no va evolucionar gens, tot obtenint el producte de partida inalterat. Es va provar el procediment desenvolupat per Camps i col[161], molt similar a l'acabat de descriure, en el que l'alcohol es transforma en el derivat trifluoroacetat, el qual és un grup de sortida suficientment bo com per ser atacat pel NaCN. En aquestes condicions es va obtenir el nitril **90** desitjat amb un rendiment del 75%.

En aquest moment es disposava de l'alquí terminal per realitzar la reacció d'hidroiodació. La reacció va evolucionar satisfactòriament utilitzant 2,4 equiv tant de  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$  com de NaI respecte l'alquí inicial. Després d'una hora a temperatura ambient, no es va detectar la presència de producte de partida. El que sí que es va observar per CG va ser la presència d'un altre producte minoritari corresponent, probablement, al iodur vinílic extern, producte de la reacció *anti*-Markovnikov, en una proporció **91**:*anti-91* de 86:14 (Figura 1.52).

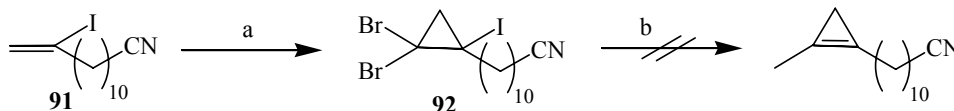


**Figura 1.52** Productes d'addició Markovnikov i *anti*-Markovnikov de iode sobre el triple enllaç terminal de **90** (les proporcions estan calculades per CG).

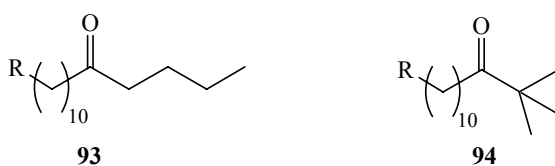
Les diferents modificacions realitzades, com és ara variar el número d'equivalents de  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$  i de NaI respecte l'alquí, no van suposar cap millora destacable. El rendiment de **91**, sense haver pogut separar l'altre subproducte, *anti-91*, va ser d'un 72% com a màxim.

Es va decidir seguir endavant, per esbrinar si el grup nitril era estable davant d'un alquí liti.

Així, el compost **91** es va sotmetre a les condicions d'halociclopropanació descrites per Al Dulayymi i col[151], per tal d'obtenir **92**, el qual seria posteriorment deshalogenat, metal·lat i tractat amb CH<sub>3</sub>I, tal com es descriu a la Figura 1.53.



Reactius i condicions: (a) CHBr<sub>3</sub>, NaOH, cetrimida, ta, 60 h, (**92**, 57%); (b) *n*-BuLi o bé *tert*-BuLi, Et<sub>2</sub>O, -78°C a 0°C, 1 h, llavors CH<sub>3</sub>I, HMPA, ta, 4 h, no es detecta producte final, i sí els derivats **93** o **94**



**Figura 1.53** Intent de formació de derivats ciclopropènics amb un grup cianur. Possibles estructures formades en conduir la reacció amb *n*-BuLi (**93**) i *tert*-BuLi (**94**)

La formació del trihalociclopropà **92** és formalment una addició de carbenoid ( $\text{:CBr}_2$ ) format per deshidrobromació del CHBr<sub>3</sub> en un medi fortament bàsic, com és el NaOH al 50%, reacció realitzada en un sistema bifàsic (H<sub>2</sub>O-CHBr<sub>3</sub>), tot emprant la cetrimida (bromur de *n*-hexadecil tetrametilamoni) com a agent de transferència de fase.

Aquest dibromoiodociclopropà **92** es va intentar transformar en el corresponent ciclopropè. Després de fer reaccionar **92** amb 2,1 equiv de *n*-BuLi en Et<sub>2</sub>O a -78°C durant 2 h, es va afegir 1,2 equiv de CH<sub>3</sub>I, tot permetent l'atac de l'anió ciclopropenil sobre l'halur. Transcorregudes 4 h, el cianur de partida havia desaparegut. Tanmateix, després de purificar el cru, les dades espectroscòpiques mostraven de manera clara la presència d'una cetona (**93**) i la inexistència de cianur. Fou molt difícil esbrinar què havia succeït amb el ciclopropà, degut a la gran quantitat de senyals presents. Del que no existia cap mena de dubte era de la presència de la cetona butílica, fruit de l'atac del *n*-BuLi sobre el grup nitril i posterior hidròlisi de l'intermedi format.

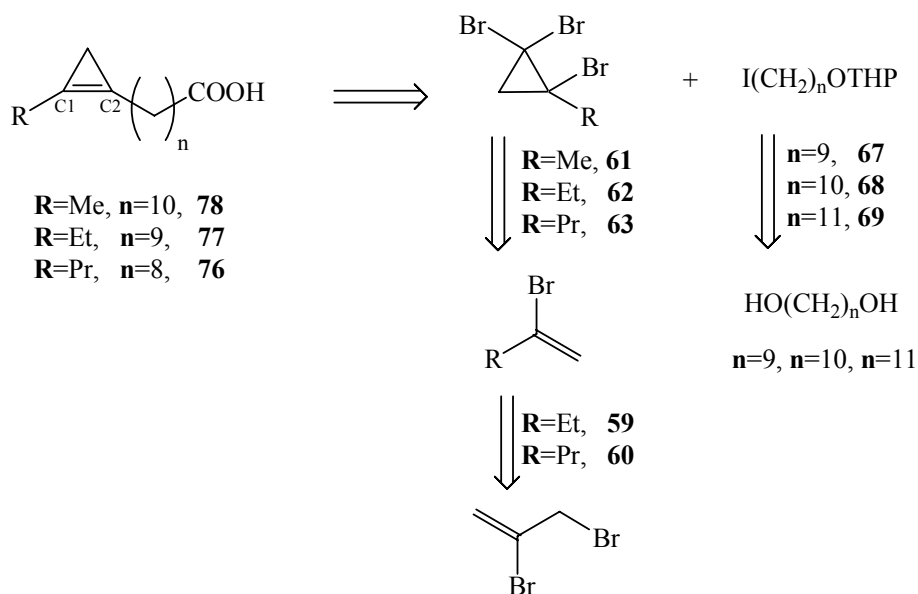
Els espectres de RMN de <sup>1</sup>H exhibien senyals característics, com un triplet a 2,36 ppm corresponent als 4 hidrògens en α respecte el carbonil, i l'espectre de <sup>13</sup>C mostrava senyals a 211,7 ppm (C=O), a 42,8 i 42,5 ppm (CH<sub>2</sub>C=O). L'espectre d'infraroig mostrava una banda a 1714 cm<sup>-1</sup> corresponent a l'*stretching* C-O.

Tot canviant el *n*-BuLi pel *tert*-BuLi, base amb un poder nucleòfil menor, es va obtenir la cetona **94**, caracteritzada pel singlet a 1,10 ppm i el triplet a 2,43 ppm a l'espectre de RMN de  $^1\text{H}$ , atribuïbles al grup *tert*-butil i als hidrògens en  $\alpha$  respecte el carbonil, respectivament. Pel que fa a l'espectre d'infraroig, es tornà a veure una banda a  $1704\text{ cm}^{-1}$ , fets que indicaven la presència d'una cetona.

Així doncs, a diferència del grup èster<sup>[152]</sup>, el grup nitril no és capaç de suportar les condicions de reacció. Aquest fet, unit a la dificultat que comporta la formació dels iodurs vinílics interns sense la presència del subproducte fruit de l'atac *anti*-Markovnikov, ens va fer decidir canviar l'estratègia sintètica.

#### 1.4.2.3. Intent de síntesi de **76**, **77** i **78** a partir de trihalociclopropans de cadena curta

L'anàlisi proposada aquest cop va ser la que es mostra a la Figura 1.54.



**Figura 1.54** Nova anàlisi retrosintètica proposada per a obtenir els àcids grassos ciclopropènics **76**, **77** i **78**.

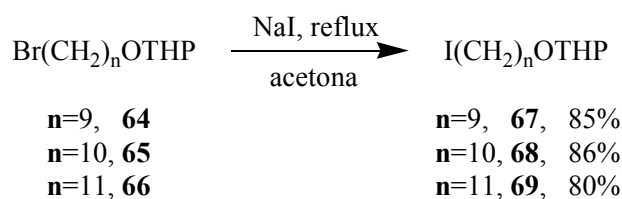
Com es pot observar, l'anàlisi retrosintètica proposada és formalment la mateixa que en l'apartat precedent; el tret que diferencia aquesta ruta de l'altra és el lloc de trencament del substituent del ciclopropè, que en l'anàlisi anterior era el del carboni C1, tot obtenint un sintó ciclopropànic de cadena llarga, i en aquesta nova proposta és el del carboni C2, derivant en un compost ciclopropànic de cadena curta.



Els pròxims apartats abordaran la síntesi, tant dels iodurs d'alquil **67**, **68** i **69** com dels derivats cíclics **61**, **62** i **63**.

#### 1.4.2.3.1. Síntesi dels iodurs d'alquil **67**, **68** i **69**

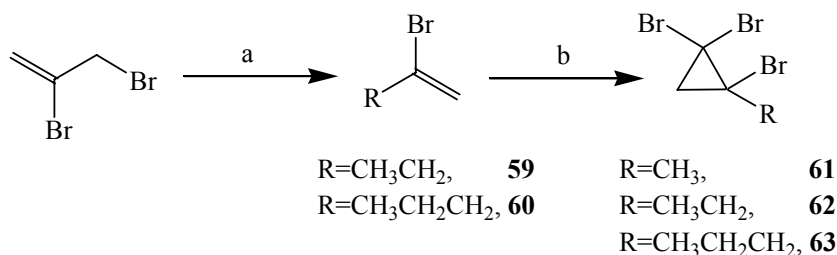
Aquests iodurs d'alquil són sintetitzats a partir dels bromurs d'alquil apropiats, **64**, **65** i **66**, que havien estat obtinguts a l'apartat 1.4.2.2.1 (Figura 1.47, pàgina 76). L'únic que calia fer, doncs, era transformar els bromurs en els corresponents iodurs, mitjançant la reacció amb NaI en acetona a reflux (Figura 1.55).



**Figura 1.55** Formació dels iodurs d'alquil **67**, **68** i **69**.

#### 1.4.2.3.2. Síntesi dels trihalociclopropans **61**, **62** i **63**

Tal com es mostra a la Figura 1.54, aquests 1,1,2-trihalociclopropans provenen de l'addició d'un carbé del tipus :CBr<sub>2</sub> sobre un bromur vinílic amb una cadena R adequada. D'entre els tres bromurs vinílics possibles, el corresponent a R=CH<sub>3</sub> era comercialment assequible, i per tant, només calia aconseguir els derivats amb R=Et (**59**) i R=Pr (**60**).



*Reactius i condicions:* (a) RMgBr (R=Me, **59**; R=Et, **60**), Et<sub>2</sub>O, 0°C a 45°C, 3 h; (b) CHBr<sub>3</sub>, NaOH, cetrimida, ta, 60 h, (**61**, 83%; **62**, 45% 2 etapes; **63**, 58% 2 etapes).

**Figura 1.56** Formació dels derivats ciclopropànics **61**, **62** i **63**.

Aquests dos compostos s'aconseguien fàcilment mitjançant l'atac d'un derivat organometàl·lic, en aquest cas un reactiu de Grignard de cadena hidrocarbonada adequada, sobre el 2,3-dibromopropè, segons un mètode descrit per Lespieau i Bourguel<sup>[162]</sup>. La ruta sintètica seguida es mostra a la Figura 1.56.

Així, en un experiment típic, una dissolució 2,5 M d'1,2-dibromopropè en Et<sub>2</sub>O es fa reaccionar, a 0°C, amb 2 equiv del reactiu de Grignard adequat (MeMgBr per obtenir **59** i EtMgBr per obtenir **60**). Acabada l'addició, es porta el sistema a reflux durant 3 h, tot comprovant el progrés de la reacció per RMN de <sup>1</sup>H (desaparició del senyal a 3,97 ppm corresponent al CH<sub>2</sub> del producte de partida). La reacció es tracta i el dissolvent es destil·la acuradament. Els crus obtinguts, juntament amb el 2-bromopropè comercial, es fan reaccionar directament amb CHBr<sub>3</sub> i NaOH al 50%, tot emprant cetrimida com a agent de transferència de fase. Després de 48 h de reacció, es tracta la reacció i els crus obtinguts es purifiquen.

#### 1.4.2.3.3. *Formació dels derivats ciclopropènics 70, 71 i 72*

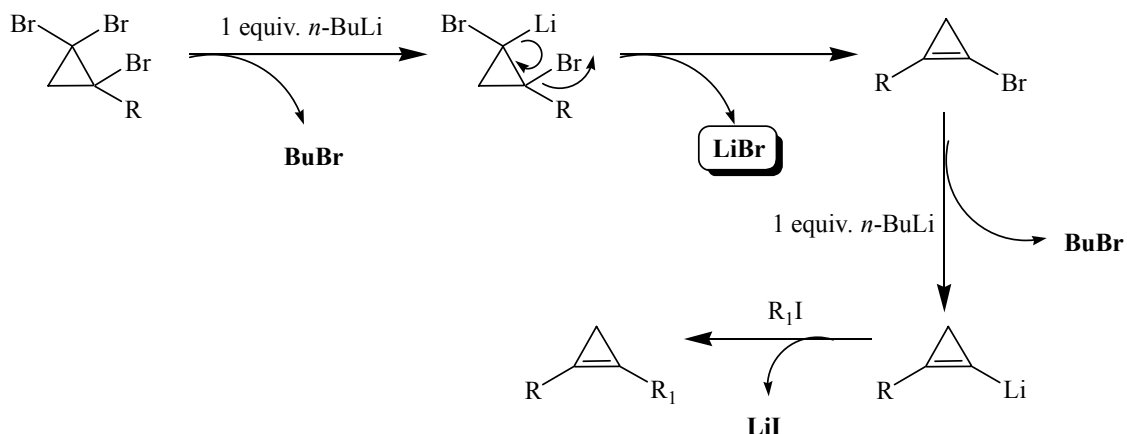
Es va seguir el procediment descrit pel grup del Dr Baird<sup>[151-153]</sup>, el qual condueix a derivats ciclopropènics amb bons resultats.

La reacció, com ja s'ha explicat abans (Figura 1.45, pàgina 75), consisteix en la deshidrobromació de l'1,2,2-tribromociclopropà mitjançant 2 equiv d'un reactiu organolític, seguit de l'atac de l'anió intermedi sobre un halur d'alquil, preferentment sobre un iodur.

En un primer assaig, es va generar l'anió del tribromociclopropà **61**, tot fent reaccionar 0,34 mmol de **61** amb 0,74 mmol de *n*-Buli, en Et<sub>2</sub>O com a solvent, i a -78°C. La mescla s'escalfà gradualment, de manera que s'assolís la ta en 30 min. Es deixà en agitació 30 min més, es refredà a 0°C i s'addicionaren 0,32 mmol del iodur **69** en HMPA. S'agità a temperatura ambient durant 16 h i el cru es purificà. Inesperadament, no es va obtenir el ciclopropè **72**, sinó el derivat bromat **66** (65%), fruit de l'intercanvi d'halogen entre el bromur i el iodur present a la reacció (entrada 1, Taula 1.9, pàgina 86).

En un segon intent, es va canviar l'HMPA per DMPU, tot obtenint el mateix resultat, amb un 100% de conversió vers el derivat bromat **66**, segons CG (entrada 2, Taula 1.9).

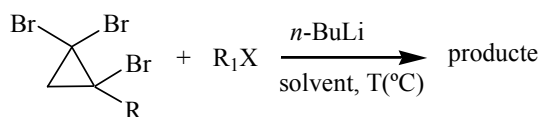
Segons el mecanisme de formació de l'anió ciclopropenil detallat a la Figura 1.57, el primer equivalent de base genera 1 equivalent de bromur de butil (BuBr) i 1 equivalent de bromur de liti (LiBr), tot formant-se el derivat ciclopropènic bromat, el qual, en presència d'un segon equivalent de base, allibera un segon mol de bromur de butil generant l'anió, el qual pot reaccionar en presència d'electròfils. Si l'electròfil és un iodur d'alquil, es genera un equivalent de iodur de liti (LiI).



**Figura 1.57** Mecanisme de formació d'anions ciclopropenilics.

És evident, doncs, que el LiBr format ataca nucleofilicament al derivat iodat abans que aquest pugui acoblar-se a l'anió ciclopropenil. La presència d'un dissolvent apròtic altament polar com és ara l'HMPA, comporta que aquest bromur augmenti el seu poder nucleòfil. Willy i col<sup>[163]</sup> descriuen la formació de bromurs d'alquil a partir de iodurs, en presència de bromur d'etil (EtBr) i bromur sòdic (NaBr) tot utilitzant un dissolvent apròtic polar com és la *N*-metilpirrolidina. En un dels exemples, l'1-iodononà és transformat en tan sols 15 min en el corresponent 1-bromononà amb un rendiment del 96%. Dins la mescla de reacció coexisteixen el LiBr, el bromur de butil i el iodur d'alquil, i per tant no és gens agosarat fer aquesta hipòtesi.

Es va intentar, doncs, realitzar la reacció sense la presència d'HMPA, només utilitzant Et<sub>2</sub>O, però sols es va poder recuperar producte de partida. Es va pensar fer la reacció tot emprant, no un derivat iodat, sinó un derivat bromat, pensant que en aquest cas l'intercanvi no existiria. Després de realitzar dos intents, un amb THF/HMPA i un altre només amb THF, es va recuperar, novament, producte de partida (entrades 4, 5 i 6, Taula 1.9).



A: ciclopropà; B: R<sub>1</sub>X; C: *n*-BuLi

**Taula 1.9** Diferents intents de formació de derivats ciclopropènics.

n°	Relació A:B:C	R	R <sub>1</sub> X	Solvent	Condicions 1	Condicions 2 <sup>a</sup>	Producte (%)
1	1:1:2,3	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 30 min	ta /30 min	<b>66</b> (65) <sup>b</sup>
2	1:1:2,3	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/DMPU	-78°C → ta 30 min	ta /30 min	<b>66</b> (100) <sup>c</sup>
3	1:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 45 min	ta /0 min	<b>66</b> (85) <sup>c</sup>
4	1,3:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O	-78°C → ta 120 min	ta /0 min	producte partida
5	1,2:1:2,6	Me	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	THF/HMPA	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	producte partida
6	1,2:1:2,6	Me	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	THF	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	producte partida
7	1,2:1:2,6	Me	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> I	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	<b>98</b> (65) <sup>b</sup>
8	1,2:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTBDMS	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	<b>102</b> (95) <sup>b</sup>
9	1,2:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> I	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	diversos productes
10	1,2:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CN	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	<b>99</b> (95) <sup>c</sup>
11	1,2:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP <sup>d</sup>	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	<b>66</b> (88) <sup>b</sup>
12	1,2:1:2,6	Et	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> OTHP <sup>e</sup>	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 180 min	ta /0 min	<b>65</b> + pp (57:43) <sup>c</sup>
13	1,2:1:2,6	Et	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CHO	THF	-78°C → ta 60 min	ta /0 min	diversos productes
14	3:1:6,5	Et	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-60°C → ta 150 min	ta /0 min	<b>101</b> (100)
15	1,4:1:2,9 <sup>f</sup>	Et	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/ pentà/HMPA	-60°C → 10°C 150 min	ta /0 min	producte partida (50) + <b>72</b> (50) <sup>g</sup>
16	1,1:1:2,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 1 min	ta /40 min	<b>72</b> (50% impur) <sup>b</sup>
17	2:1:4,6	Me	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OTHP	Et <sub>2</sub> O/HMPA	-78°C → ta 1 min	ta /40 min	<b>72</b> (50) <sup>b</sup>

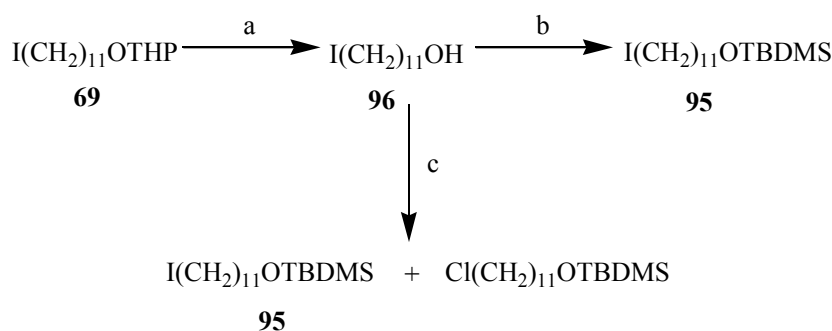
<sup>a</sup>Addició del iodur d'alquil realitzada a 0°C. <sup>b</sup>Rendiment de producte aïllat. <sup>c</sup>Rendiment calculat per CG. <sup>d</sup>Addició de 2,8 equivalents de LiI. <sup>e</sup>L'anió format és transferit via cànula sobre el iodur d'alquil. <sup>f</sup>S'utilitza com a base el *tert*-BuLi. <sup>g</sup>Rendiment calculat per RMN de <sup>1</sup>H.

Per tant, era clar que tant el iodur com a grup sortint, com la presència de l'HMPA eren imprescindibles per tal que existís qualsevol tipus de reacció.

Es va voler provar ara la importància del grup protector, ja que és coneguda la capacitat quelant de metalls per part de dos àtoms d'oxigen en una disposició adequada, com és ara la que es troba en el derivat tetrahidropiranílic. Es pretenia comprovar quin efecte tenia el grup THP sobre la potenciació de l'activitat nucleòfila del bromur degut a una possible quelació amb els àtoms de liti.

Per aquest motiu, es va fer reaccionar l'1-iodoundecà (**36**), desproveït de cap grup oxigenat, amb la intenció de formar el ciclopropè **98**. En aquest cas es van utilitzar 2,6 equivalents de *n*-BuLi, tot obtenint el ciclopropè desitjat en un rendiment inferior al 50%, juntament amb el corresponent 1-bromoundecà en similar proporció, segons dades extretes de l'espectre de RMN de <sup>1</sup>H (entrada 7, Taula 1.9). Semblava, a primera vista, que el grup tetrahidropiranil jugava un rol important en el decurs de la reacció.

Animats per aquest fet, es sintetitzà el derivat **95**, el qual presentava com a grup protector el *tert*-butil dimetilsilil (TBDMS), fet que evitava la presència de 2 àtoms d'oxigen amb possible capacitat quelant. La síntesi es mostra a la Figura 1.58.

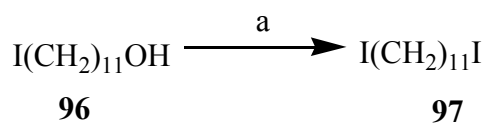


*Reactius i condicions:* (a) PPTS, EtOH, 60°C, 3 h, (**96**, 90%); (b) TBDMSTf, 2,6-lutidina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ta, 2 h, (**95**, 85%); (c) TBDMSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ta, 16 h, (65% de **95** impurificat amb el corresponent clorur).

**Figura 1.58** Síntesi del derivat **95** amb el grup hidroxil protegit en forma d'èter silílic.

Com es pot observar, l'ús de clorur de *tert*-butil dimetilsilil (TBDMSCl)<sup>[49]</sup>, condueix a l'aparició de quantitats apreciables (35% segons la RMN de <sup>1</sup>H) del clorur fruit de l'intercanvi clorur-iodur. Per tal d'obviar aquesta reacció lateral no desitjada, es va utilitzar com a agent sililant el triflat de *tert*-butil dimetilsilil (TBDMSTf)<sup>[164]</sup> tot obtenint **95** amb un 85% de rendiment.

A més, es va decidir experimentar amb l'1,11-diiodoundecà (**97**), també utilitzat per Al Dulayymi i col[<sup>151</sup>]. Donat que la transformació del trihalociclopropà en ciclopropenil liti només forma 1 equivalent de LiBr, s'esperava que **97**, en el supòsit que patís l'intercanvi d'halogen (bromur per iodur), encara tindria un grup iodur per ser desplaçat per l'anió ciclopropenil suposadament format. Aquest iodur simètric es forma a partir de l'11-iodo-1-undecanol **96** per transformació del grup hidroxil en el grup iodur mitjançant PPh<sub>3</sub>/imidazole/I<sub>2</sub> en Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN. El compost **97** es va obtenir amb un 94% de rendiment (Figura 1.59).



*Reactius i condicions:* (a) PPh<sub>3</sub>, imidazole, I<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN, 0°C, 1 h, (**97**, 94%)

**Figura 1.59** Síntesi del diiodur **97** a partir del iodoalcohol **96**.

Per finalitzar, també es va creure oportú provar el derivat 11-iodo-1-undecanitril **89**, també sense grups oxigenats, però amb un grup nitril com a precursor del carboxilat final.

En cap dels tres casos es va obtenir el ciclopropè esperat, si més no, com a producte principal (entrades 8, 9 i 10, Taula 1.9). En el cas dels compostos **89** i **95**, es van obtenir, de nou, els corresponents bromurs d'alquil **99** i **102**, respectivament, tot mostrant que l'atac del bromur sobre el iodur està governat, principalment, pel dissolvent HMPA. En el cas del iodur simètric es va obtenir un espectre de RMN de <sup>1</sup>H molt difícil d'interpretar per la quantitat de senyals presents. L'espectre de gasos acoblat a espectrometria de masses (CG-EM) semblava donar fins a 5 productes diferents els quals corresponien a l'1,11-dibromoundecà (producte principal), l'1-bromo-11-iodoundecà i traces de ciclopropè amb un iodur o un bromur en el carboni C1. En l'article abans esmentat, els autors aconseguixen el ciclopropè esperat, amb un àtom de iode en el carboni C1; en el nostre cas, s'obtingué només una petita quantitat del corresponent ciclopropè amb un àtom de brom en C1.

Per tal d'augmentar la concentració de iodur present a la mescla de reacció, es va intentar realitzar la mateixa en presència de 2,8 equiv de LiI, el qual s'esperava que mitigués l'efecte d'intercanvi d'halurs, tot permetent mantenir la concentració del iodur

d'alquil afegit (entrada 11, Taula 1.9). Estranyament, la reacció va conduir de nou al corresponent bromur **66** amb un rendiment aïllat no gens menyspreable (88%).

Quan es va fer la reacció tot invertint l'ordre d'addició, això és, afegint l'anió ciclopropènic generat sobre una solució del iodur d'alquil en HMPA, per tal d'assegurar sempre un excés d'electròfil sobre l'anió i sobre el LiBr, es va obtenir de nou un resultat descoratjador, tot formant-se, segons CG, al voltant del 50% de bromur **65** acompanyat de producte de partida (entrada 12, Taula 1.9).

Atesos aquests resultats tan dolents, ens vam plantejar si realment es formava l'anió del ciclopropè amb una concentració adequada, ja que el producte final només havia pogut ser observat en l'assaig perpetrat sobre l'1-iodoundecà (**36**). És per això que es va fer reaccionar l'anió del ciclopropè generat de **62** amb el nonanal, el qual no presentava grups susceptibles de ser atacats pel LiBr. De nou, la reacció no va donar el resultat desitjat, aconseguint-se diversos productes que feien difícil la interpretació de l'espectre, degut possiblement a la inestabilitat de l'alcohol al·lílic format presumiblement durant la reacció amb l'aldehid (entrada 13, Taula 1.9).

El fet de doblar els equivalents, tant d'1,1,2-trihalociclopropà com de *n*-BuLi (3 i 6,5 equiv respectivament) per tal que existís un excés molt gran d'anió ciclopropènic i que això pogués afavorir l'atac nucleòfil sobre el iodur d'alquil, va donar com a conseqüència l'atac preferencial de l'excés de base sobre el iodur **68**, tot conduint a la formació de l'alcohol protegit de cadena llarga **101** (entrada 14, Taula 1.9).

Tampoc la utilització de *tert*-BuLi com a base va donar resultats acceptables, tot aconseguint aproximadament un 50% de producte de partida, això sí, acompanyat del ciclopropè **72** en una proporció inferior al 50%, segons l'espectre de RMN de <sup>1</sup>H (entrada 15, Taula 1.9). Lamentablement, no es va aconseguir mai augmentar aquesta proporció.

Pel que fa a la temperatura de reacció, generalment es generava l'anió a -78°C i es deixava que la reacció assolís temperatura ambient en un temps que oscil·lava entre 1 h i 3 h. Això podria fer que l'anió ciclopropenil s'anés degradant, fet que conduiria a una concentració petita d'aquest amb respecte el LiBr i el iodur d'alquil, obtenint sempre com a producte majoritari el procedent de l'intercanvi d'halur. Per aquest motiu, en una altra prova, es va generar l'anió a -78°C, s'escalfà immediatament a temperatura ambient i, 40 min després, es refredà de nou a 0°C i s'afegí l'electròfil. Amb aquestes condicions es va obtenir un 50% de ciclopropè **72** (RMN de <sup>1</sup>H), tot i que impur, (entrada 16, Taula 1.9).

En augmentar el nombre d'equivalents de ciclopropà i de base (2 i 4,6 equiv. respectivament) i seguint aquest nou règim de temperatures, s'aconseguí, finalment, obtenir un 50% (rendiment de producte pur aïllat, entrada 17, Taula 1.9) de ciclopropè **72**, rendiment similar al descrit pel grup de Baird<sup>[151]</sup>. El pas més difícil ho constituïa l'etapa de purificació per columna, ja que encara s'obtenien, inevitablement, quantitats variables de producte de partida (**69**) juntament amb el bromur corresponent (**66**), productes que presentaven en CCF un  $R_f$  idèntic al ciclopropè **72**. Tanmateix, aquest es va poder separar amb èxit. La reacció va ser reproducible, tot obtenint-se rendiments similars per a tots els ciclopropens (53% per **70**, 48% per **71** i 51% per **72**).

Així, en un experiment típic, una solució 0,3 M d'1,1,2-trihalociclopropà en Et<sub>2</sub>O sec es refreda a -78°C. Sobre aquesta s'afegeixen 2,3 equiv d'una solució de *n*-BuLi (1,6 M en hexà), tot escalfant immediatament la solució a ta i permetent l'agitació durant 40 min. En aquest moment, es torna a refredar el sistema a 0°C i s'addiciona una solució 1,3 M del iodur d'alquil corresponent en HMPA seca. La mescla es deixa en agitació durant 16 h, es tracta, i el cru obtingut es purifica amb precaució per cromatografia en columna de gel de sílice, tot aconseguint el ciclopropè desitjat amb rendiments de l'ordre del 50%.

#### 1.4.2.3.4. *Formació dels àcids 76, 77 i 78*

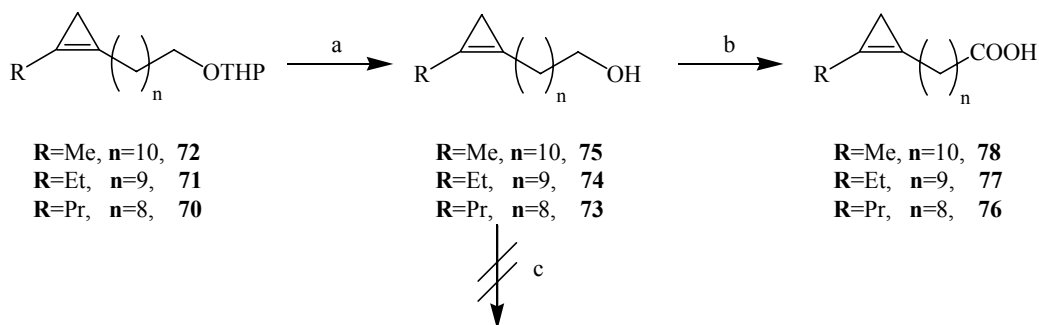
Un cop es disposava dels intermedis ciclopropènics **70**, **71** i **72**, calia desprotegir els alcohols i oxidar-los als corresponents àcids.

La desprotecció va ser realitzada de forma efectiva amb *p*-toluensulfonat de piridini (PPTS) en EtOH a 55-60°C. Els alcohols **73**, **74** i **75** s'obtingueren amb uns rendiments del 87, 88 i 87%, respectivament.

Quant a l'oxidació, es va intentar seguir un procediment descrit per Sato i col<sup>[165-167]</sup> els quals empraven com a oxidant el peròxid d'hidrogen en toluè, utilitzant el Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O com a catalitzador, i l'hidrogensulfat de tetrabutilamoni (Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub>) com a agent de transferència de fase. En cap cas es va obtenir l'àcid esperat i sí quantitats variables d'aldehid juntament amb alcohol de partida inalterat.

Es va utilitzar, doncs, l'oxidació clàssica amb PDC en DMF descrita per Corey i Schmidt<sup>[122]</sup>, la qual va furnir els àcids ciclopropènics **76**, **77** i **78** amb rendiments moderats, entre el 50 i el 70% (Figura 1.60).





*Reactius i condicions:* (a) PPTS, EtOH, 60°C, 3 h, (**73**, 87%; **74**, 88%; **75**, 87%); (b) PDC, DMF, ta, 2 h, (**76**, 69%; **77**, 52%; **78**, 46%); (c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 o 3%), Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, toluè, 90°C, 4 h, (no existeix evolució cap a la formació d'àcid).

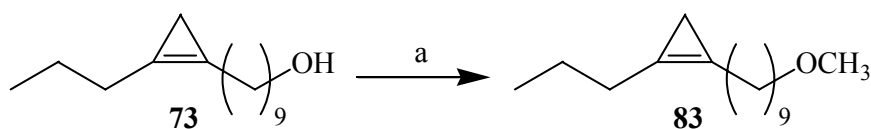
**Figura 1.60** Síntesi dels àcids ciclopropènics **76**, **77** i **78** a partir dels acetals **70**, **71** i **72**.

#### 1.4.2.4. Síntesi dels derivats ciclopropènics **82** i **83**

Tal com s'explicarà més endavant, els resultats obtinguts en els estudis bioquímics van fer necessària la síntesi dels derivats ciclopropènics **82** i **83**. Aquesta es comenta en els següents apartats.

##### 1.4.2.4.1. Síntesi de l'èter ciclopropènic **83**

La síntesi de **83** es realitzà mitjançant la reacció de formació d'èters de Williamson, tot seguint un procediment descrit per Johnstone i Rose<sup>[168]</sup> en el qual l'alcohol **73**, dissolt en DMSO, es fa reaccionar amb KOH i CH<sub>3</sub>I. D'aquesta forma, es va aconseguir el derivat **83** amb un rendiment del 66% (Figura 1.61).



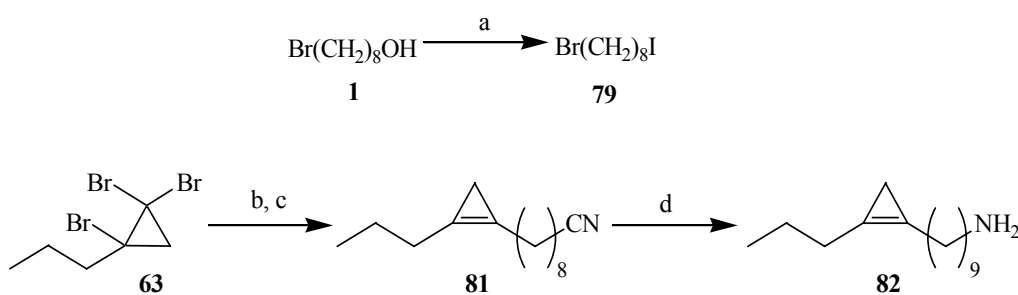
*Reactius i condicions:* (a) KOH, CH<sub>3</sub>I, DMSO, ta, 1 h, (**83**, 66%)

**Figura 1.61** Formació del derivat **83** a partir de l'alcohol ciclopropènic **73**.

#### 1.4.2.5. Síntesi de l'amina ciclopropènica **82**

L'amina es va formar per reducció amb  $\text{LiAlH}_4$  del nitril **81**, format per atac nucleòfil del  $\text{NaCN}$  sobre l'halur **80**. Aquest halur procedia de la reacció de l'1,1,2-tribromociclopropà (**63**) amb l'1-bromo-8-iodooctà (**79**) tot seguint les condicions descrites en l'apartat 1.4.2.3.3, (Figura 1.62).

Així, l'1-bromo-8-iodooctà (**79**) es va formar a partir del 8-bromo-1-octanol (**1**) per iodació de l'alcohol amb  $\text{PPh}_3/\text{imidazole}/\text{I}_2$  amb un rendiment del 79%. Aquest halur es va fer reaccionar amb l'anió ciclopropenil generat a partir de **63** tot obtenint, a més d'un 70% del derivat ciclopropènic **80** esperat, diversos subproductes. Entre aquests, s'identificaren el producte de partida ( $\approx 10\%$ ) i l'1,8-dibromooctà ( $\approx 11\%$ ) procedent de l'atac del  $\text{LiBr}$  sobre el iodur **79**. El cru es va fer reaccionar amb 2,5 equiv de  $\text{NaCN}$  en HMPA per tal d'obtenir, després de purificar, el nitril esperat **81** amb un rendiment des de **63** del 44%.



*Reactius i condicions:* (a)  $\text{PPh}_3$ , imidazole,  $\text{I}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h, (**79**, 94%); (b)  $n\text{-BuLi}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ , 1 min/ta, 40 min;  $0^\circ\text{C}$ , i **79**, HMPA, ta, 16 h, seguit de (c)  $\text{NaCN}$ , HMPA, ta, 1 h, (**81**, 44%, 2 etapes); (d)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , ta, 30 min, (**82**, 72%).

**Figura 1.62** Síntesi de l'amina ciclopropènica **82**.

Aquest cianur es va reduir a amina primària<sup>[169]</sup> tot emprant 1,5 equiv de  $\text{LiAlH}_4$  en  $\text{Et}_2\text{O}$ , fornint el producte desitjat **82** amb un 72% de rendiment.

#### 1.4.3. Experiments d'inhibició de dessaturases

Per tal de realitzar els assaigs biològics d'inhibició es van dissenyar experiments *in vitro*, tot emprant glàndules feromonals de femelles verges de *S. littoralis* acabades d'emergir, i seguint el procediment que es detalla a la part experimental de la memòria.

Excepte en les determinacions dosi-resposta, els assaigs es realitzaren tot utilitzant una relació en pes d'inhibidor respecte el substrat d'1:1.

Els experiments d'inhibició es basaren en determinar l'efecte dels compostos **73-78**, **82** i **83** sobre la transformació de substrats deuterats en els seus corresponents productes de dessaturació. Per determinar l'efecte sobre la  $\Delta 11$  dessaturasa, s'empraren com a substrats els àcids  $d_{27}14$ :Acid i  $d_{31}16$ :Acid i es va avaluar la seva conversió en els  $d_{25}(E)$ -11-14:Acid i  $d_{29}(Z)$ -11-16:Acid. Per tal d'investigar l'efecte dels compostos sobre la  $\Delta 9$  dessaturasa es quantificà la conversió de l'àcid (*E*)-11-tridecenoic (**131**) ((*E*)-11-13:Acid) en l'àcid (*Z,E*)-9,11-tridecadienoic ((*Z,E*)-9,11-13:Acid). L'activitat sobre la formació del diè (*E,E*)- s'avaluà tot mesurant la transformació de l'àcid (*Z*)-11-tridecenoic (**120**) ((*Z*)-11-13:Acid) en l'àcid (*E,E*)-10,12-tridecadienoic ((*E,E*)-10,12-13:Acid). Finalment, per tal de determinar l'efecte sobre la seqüència biosintètica, s'emprà l'àcid [14,14,14- $^2H_3$ ]-tetradecanoic ( $d_3$ 14:Acid) i es va evaluar la seva conversió en els diferents intermedis de la biosíntesi dels components de la feromona sexual de *S. littoralis*.

Un cop finalitzades les incubacions, es disseccionaren les glàndules feromonals, s'extragueren els lípids i els extractes lipídics es metanolitzaren i s'analitzaren per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses en mode SIM (CG-EM-SIM), tot seleccionant els ions adequats en cada cas.

#### ***1.4.3.1. Efecte dels àcids 76, 77 i 78 i dels alcohols 73, 74 i 75.***

##### ***1.4.3.1.1. Inhibició de la dessaturació en C11 de l'àcid mirístic i efecte sobre la seqüència biosintètica***

Aquests experiments es van fer utilitzant el  $d_3$ 14:Acid com a substrat i en les anàlisis per CG-EM es seleccionaren els ions a *m/z* 245, 243 i 241, corresponents als ions moleculars del substrat administrat i als seus productes de mono i diinsaturació, respectivament. Tots els àcids inhibiren la dessaturació del  $d_3$ 14:Acid als àcids  $d_3(Z)$ -11 i  $d_3(E)$ -11-tetradecadienoics ( $d_3(Z)$ -11-14:Acid i  $d_3(E)$ -11-14:Acid), així com la formació dels diens que se'n deriven (no es mostren els cromatogrames de CG-EM).

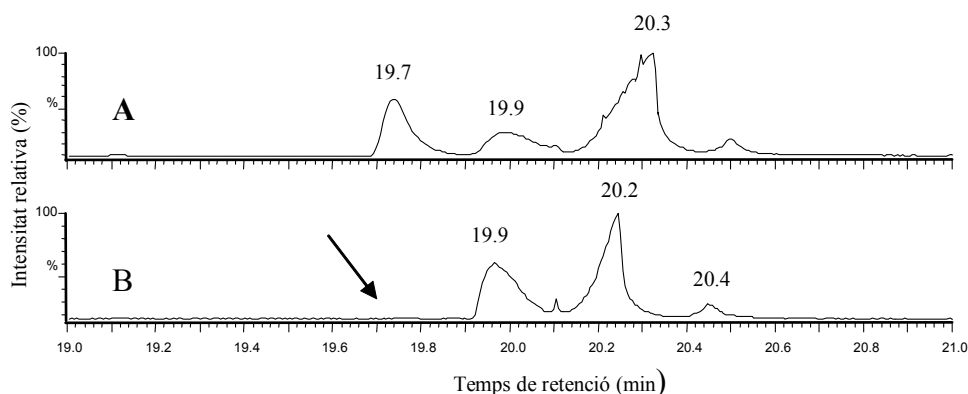
##### ***1.4.3.1.2. Inhibició de la dessaturació en C11 de l'àcid palmític***

El substrat que més s'esqueia a aquest estudi d'inhibició és l'àcid palmític perdeuterat, ( $d_{31}16$ :Acid), donat que així s'evita l'escurçament de la cadena per  $\beta$ -

oxidació, ja que aquest procés esdevé summament lent degut a l'elevat efecte isotòpic per la presència d'àtoms de deuteri<sup>[170]</sup>.

En les anàlisis per CG-EM es van seleccionar els ions a  $m/z$  301, 297, 77 i 62. Els dos primers corresponen als ions moleculars del substrat i del producte, respectivament; l'ió a  $m/z$  77 correspon a l'ió resultant de la transposició de McLaferty en el substrat saturat; i l'ió a  $m/z$  62 correspon al pic base en els espectres de CG-EM d'èsters metílics d'àcids grassos monoinsaturats, en aquest cas el fragment  $CD_3CD=CD_2$ .

Els cromatogrames mostraren que tots els compostos, tant els àcids **76-78** com els alcohols **73-75** es comportaven com a inhibidors, amb una potència similar de la dessaturació en C11 del  $d_{31}16$ :Acid (Figura 1.63).



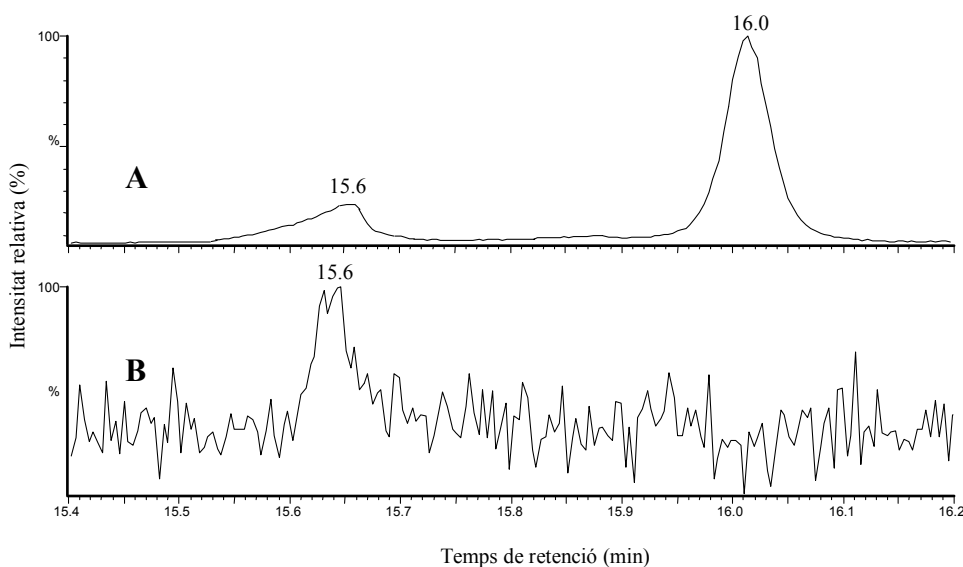
**Figura 1.63** Cromatogrames de CG-EM-SIM ( $m/z$  62) corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis* tractades amb  $d_{31}16$ :Acid en absència (DMSO, cromatograma A) o presència d'inhibidor (**73**, cromatograma B). Els cromatogrames corresponents als tractaments amb els alcohols **74** o **75** o amb els àcids **76**, **77** o **78** són idèntics al que aquí es mostra. Els productes són: 16:Me,  $t_R=20,4$  min; (*Z*)-11-16:Me,  $t_R=20,2$  min;  $d_{31}16$ :Me,  $t_R=19,9$  min;  $d_{29}(Z)$ -11-16:Me,  $t_R=19,7$  min. La fletxa indica el  $t_R$  on hauria d'aparèixer el  $d_{29}(Z)$ -11-16:Me en les mostres tractades amb inhibidor.

#### 1.4.3.1.3. *Inhibició de les dessaturases dels monoens*

Per tal d'avaluar si l'efecte inhibidor dels àcids i alcohols ciclopropènics **73-78** era extensible a la dessaturació dels monoens, es van realitzar experiments d'inhibició tot emprant els àcids (*E*)-11-tridecenoic (**131**) i (*Z*)-11-tridecenoic (**120**) com a substrats i s'avaluà la seva conversió en els àcids (*Z,E*)-9,11- i (*E,E*)-10,12-tridecadienoics, respectivament.

En les anàlisis dels èsters metílics per CG-MS-SIM, es seleccionaren els ions a  $m/z$  226 i 224, corresponents als ions moleculars dels substrats i els productes, respectivament.

De nou, els àcids grassos ciclopropènics **76-78** inhibiren la formació dels dos diens a partir dels corresponents monoens de geometria *E* i *Z* administrats. Pel cas de l'àcid (*Z*)-11-tridecenoic, els tres àcids provocaren una inhibició total de la conversió al diè (*E,E*)-10,12-tridecadienoic, tal com es pot observar a la Figura 1.64.

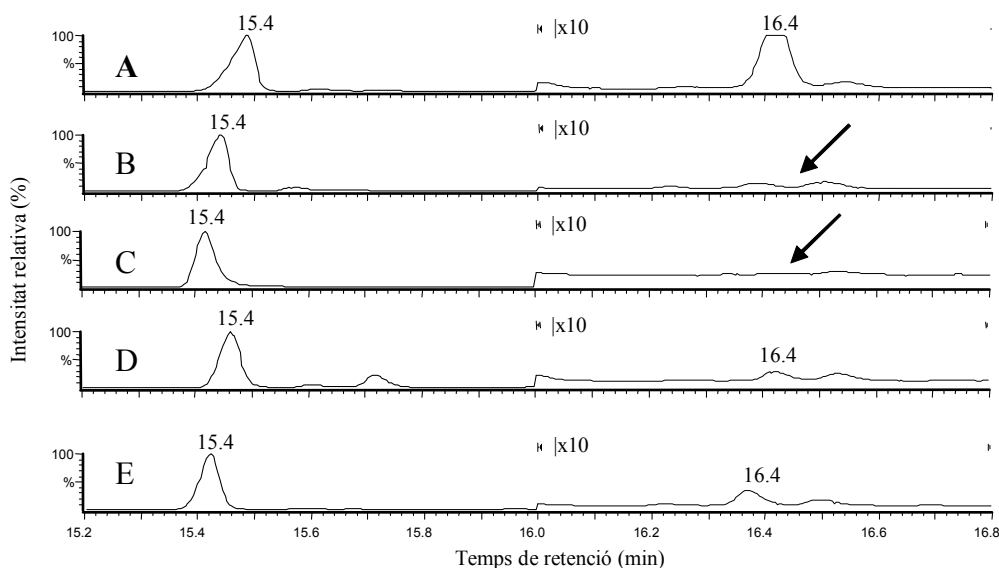


**Figura 1.64** Cromatogrames de CG-EM-SIM ( $m/z$  224) corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonal de femelles de *S. littoralis* tractades amb (*Z*)-11-13:Àcid en absència (DMSO, cromatograma A) o presència d'inhibidor (**73**, cromatograma B). Els cromatogrames corresponents als tractaments amb els alcohols **74** o **75** o amb els àcids **76**, **77** o **78** són idèntics al que aquí es mostra. Els productes són: (*Z*)-11-13:Me,  $t_R=15,6$  min; (*E,E*)-10,12-13:Me,  $t_R=16,0$  min.

Pel que fa a la dessaturació en C9 de l'àcid (*E*)-11-tridecenoic, els graus d'inhibició a concentracions equivalents en pes de substrat i inhibidor foren del 60, 75 i 90%, respectivament, pels àcids **78**, **76** i **77** (Figura 1.65). Per tant, es pot concloure que tots tres àcids grassos ciclopropènics **76-78** inhibeixen la formació d'ambdós tridecadienoats, (*E,E*)-10,12, i (*Z,E*)-9,11.

Pel que fa als alcohols, la inhibició de la formació del diè minoritari (*E,E*)-10,12-tridecadienoat fou total amb tots tres compostos, **73**, **74** i **75** tal com queda indicat a la Figura 1.64. En el cas de la formació del diè (*Z,E*)-9,11-, els percentatges d'inhibició foren del 85-100%, essent l'alcohol **75** el menys efectiu. Aquests resultats demostraren que aquests alcohols són uns inhibidors de la  $\Delta 9$  dessaturasa aparentment més potents

que els corresponents àcids. La diferència de potència és clara en el cas de l'alcohol **75** respecte el seu anàleg àcid **78** (Figura 1.65).



**Figura 1.65** Cromatogrames de CG-EM-SIM ( $m/z$  224) corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis* tractades amb (*E*)-11-13:Àcid en absència (DMSO, cromatograma A) o presència d'inhibidor (**73** a **75**, cromatograma B; àcid **76**, cromatograma C; àcid **77** cromatograma D; i àcid **78**, cromatograma E). Els productes són: (*E*)-11-13:Me,  $t_R=15,4$  min; (*Z,E*)-9,11-13:Me,  $t_R=16,4$  min. Les fletxes indiquen el  $t_R$  on hauria d'aparèixer el (*Z,E*)-9,11-13:Me en les mostres tractades amb inhibidor.

#### 1.4.3.1.4. Determinació de les $IC_{50}$ de l'alcohol **73** sobre la $\Delta 11$ i la $\Delta 9$ dessaturasa

En els experiments anteriors es constatà l'efecte inhibidor dels alcohols ciclopropènics (**73**, **74** i **75**) sobre les dessaturases implicades en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*. Aquesta inhibició semblava més elevada que en el cas dels corresponents àcids. És per aquest motiu que es va voler quantificar l'efecte tot calculant les  $IC_{50}$ , utilitzant l'alcohol **73** com a inhibidor.

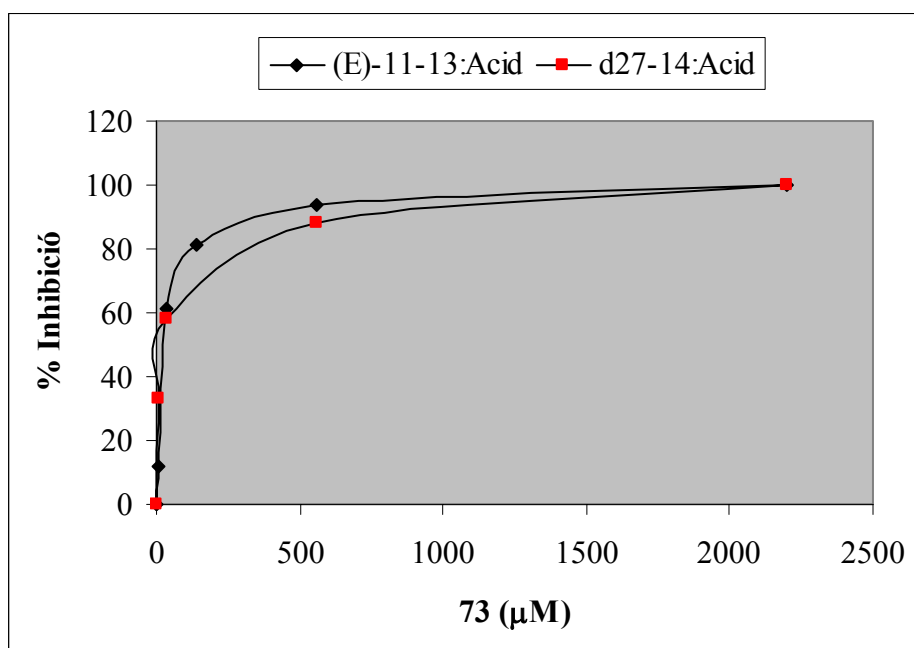
Per tal de realitzar la determinació de la  $IC_{50}$  sobre la  $\Delta 11$  dessaturasa, es quantificà la transformació de l'àcid mirístic perdeuterat ( $d_{27}14$ :Àcid) en l'àcid  $d_{25}(E)$ -11-tetradecenoic. Per a determinar la  $IC_{50}$  sobre la  $\Delta 9$  dessaturasa, es quantificà la conversió del (*E*)-11-13:Àcid (**131**) en el (*Z,E*)-9,11-13:Àcid. Aquesta determinació no es va poder realitzar sobre la 1,4-dessaturasa ja que l'àrea del diè obtingut ((*E,E*)-10,12) era massa petita per poder fer una quantificació acurada.

El percentatge d'inhibició (%I) es determinà mitjançant l'Equació 1.4, on les àrees del substrat [S] i del producte [P] corresponen a les àrees dels seus ions moleculars en els cromatogrames de CG-EM, tant en absència (i=0) com en presència de diferents concentracions (i=n) d'inhibidor.

$$\%I = \frac{([S]/[P])_{i=0} - ([S]/[P])_{i=n}}{([S]/[P])_{i=0}} \times 100$$

**Equació 1.4** Determinació del percentatge d'inhibició mitjançant el càlcul de les àrees dels ions corresponents al substrat i al producte de reacció, tant en absència (i=0) com en presència de diferents concentracions d'inhibidor (i=n).

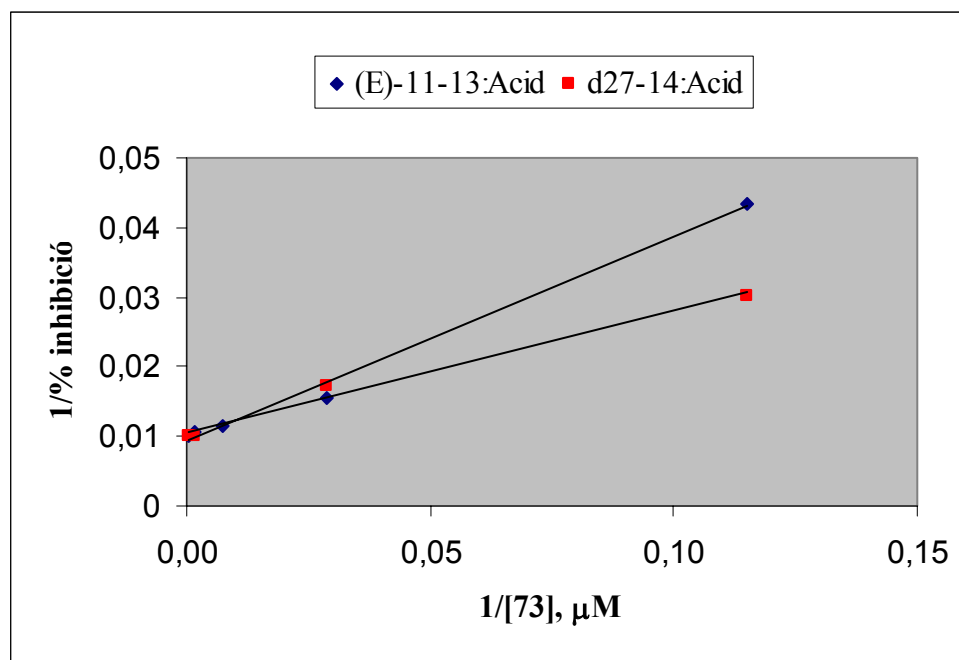
Tal com s'observa a la Figura 1.66, el percentatge d'inhibició és depenent de la dosi d'inhibidor administrada i els punts s'ajusten a una corba de tipus logarímic en el tram avaluat.



**Figura 1.66** Corbes dosi-resposta per a la transformació de l'àcid (*E*)-11-tridecenoic (**131**) en l'àcid (*Z,E*)-9,11-tridecadienoic i de l'àcid d<sub>27</sub>14:Acid en el d<sub>25</sub>(*E*)-11-14:Acid en presència de l'alcohol ciclopropènic **73**. Les dades corresponen a la mitjana de tres experiments. Les desviacions estàndard foren <10% de la mitjana en tots els cassos.

Les inverses d'aquestes dades s'ajusten a una recta, que permet determinar la  $IC_{50}$  (concentració que produeix un 50% d'inhibició) de l'alcohol ciclopropènic **73** per a cada transformació enzimàtica, per simple substitució a l'equació de la recta corresponent.

Així, s'obtenen unes  $IC_{50}$  de 33,7  $\mu\text{M}$  i 16,3  $\mu\text{M}$  per a la  $\Delta 9$  dessaturasa del (*E*)-11-13:Acid i la  $\Delta 11$  dessaturasa del  $d_{27}14$ :Acid, respectivament (Figura 1.67).



**Figura 1.67** Representació de les inverses de les dades de la Figura 1.66. Les equacions de les rectes són, segons el substrat administrat: (*E*)-11-13:Acid,  $y=0,293x + 0,009$  ( $r^2=0,993$ ) i  $d_{27}14$ :Acid,  $y=0,176x + 0,010$  ( $r^2=0,985$ ).

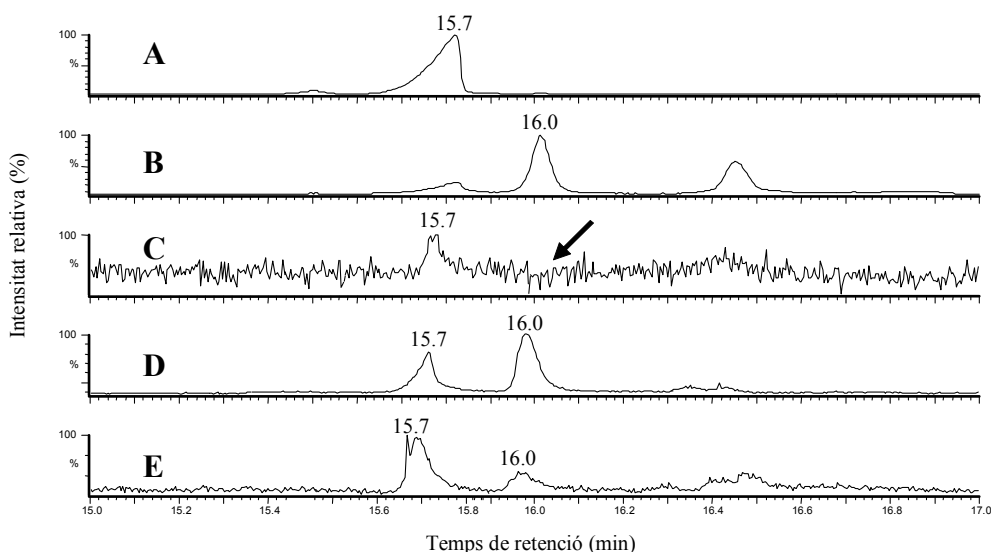
#### 1.4.3.1.5. Efecte dels compostos **82** i **83**

En aquest cas, es va determinar la inhibició tant de l'amina **82** com de l'èter **83** emprant els substrats  $d_314$  (efecte sobre la seqüència biosintètica), i (*E*)-11 i (*Z*)-11-tridecenoics (efectes sobre les dessaturacions dels monoens).

L'amina **82** va resultar inactiva en tots els assaigs (els cromatogrames de CG-EM no es mostren). El compost **83**, en canvi, va resultar ser un inhibidor força menys potent que el seu anàleg **73**, tant de la  $\Delta 9$  com de la  $\Delta 11$  dessaturasa, com de la 1,4-dessaturasa. L'efecte sobre aquest últim enzim es representa, a mode d'exemple, a la Figura 1.68, on es mostra la comparació de la potència inhibidora de l'alcohol, tant



lliure (**73**) com protegit (**83**), i de l'àcid **76** sobre la transformació de l'àcid (*E*)-11-tridecenoic (**131**) en l'àcid (*Z,E*)-9,11-tridecenoic.



**Figura 1.68** Cromatogrames de CG-EM-SIM ( $m/z$  226 en el cromatograma A i 224 en la resta de cromatogrames) corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonal de femelles de *S. littoralis* tractades amb (*E*)-11-13:Acid en absència (DMSO, cromatograma A i B) o presència d'inhibidor (**73**, cromatograma C; **83**, cromatograma D; o **76**, cromatograma E). Els productes són: (*E*)-11-13:Me,  $t_R=15,7$  min; (*Z,E*)-9,11-13:Me,  $t_R=16,0$  min. La fletxa indica el  $t_R$  on hauria d'aparèixer el (*Z,E*)-9,11-13:Me en absència d'inhibidor.

Per tant, i com a resum dels resultats, tots els àcids grassos ciclopropènics (**76**, **77** i **78**) i tots els alcohols ciclopropènics (**73**, **74** i **75**) són inhibidors de les dessaturases presents en l'insecte *S. littoralis*. D'entre aquests dos tipus de compostos, els alcohols són aparentment més actius que els corresponents àcids. En canvi, l'èter **83** presenta una activitat inhibidora significativament menor que el corresponent alcohol **73** i l'amina **82** és totalment inactiva en les condicions de l'experiment.

#### 1.4.4. Discussió

D'ençà de la descoberta que els àcids grassos ciclopropènics estercúlic i malvàlic actuaven com a inhibidors de la dessaturació de l'àcid esteàric a àcid oleic<sup>[133]</sup>, hi ha hagut un gran esforç per tal de saber el mecanisme exacte d'inhibició. Malgrat l'enorme deversall d'estudis i propostes realitzats, aquest mecanisme encara roman poc clar.

Tot i que inicialment s'estudià la inhibició de dessaturases en sistemes animals, els àcids grassos ciclopropènics s'han mostrat efectius en d'altres sistemes com són els fongs, els bacteris i les plantes. En insectes, s'ha investigat bastant aquest tipus d'inhibició, ja que és una eina interessant, no tant per la seva possible utilització a gran escala en control de plagues, com per la seva utilitat en els estudis d'elucidació de rutes biosintètiques de mescles feromonal.

Un dels objectius d'aquest capítol era la síntesi dels àcids grassos ciclopropènics **76**, **77** i **78** mitjançant la metodologia desenvolupada per Baird i col<sup>[151]</sup> i comparar-la amb la síntesi que es realitzava en el nostre laboratori. Com s'ha pogut comprovar, després de molts intents, es va arribar a optimitzar la síntesi d'aquests inhibidors, tot essent l'etapa clau l'atac del derivat litiat generat a partir de l'1,1,2-trihalociclopropà amb el corresponent iodur d'alquil. Així, el rendiment global, al voltant d'un 25% des del trihalociclopropà és molt superior a l'1-3% de rendiment descrit en el procediment anterior<sup>[148]</sup>, a més de presentar l'avantatge de ser una síntesi convergent i no pas linial.

Per altra banda, el fet de comprovar que els alcohols són inhibidors efectius, inclús més potents, de la dessaturació, tal com van avançar Nordby i col<sup>[171]</sup>, constitueix un avenç important a l'hora d'emprar aquests compostos en l'estudi de rutes biosintètiques, ja que, en principi, en no haver de disposar de l'àcid, la ruta sintètica es redueix en tres etapes (a partir d'un iodoalcohol amb el grup hidroxil lliure, s'evitarien les etapes de protecció i desprotecció de l'alcohol i posterior oxidació), augmentant així d'una forma considerable el rendiment global.

L'altre objectiu era determinar l'activitat inhibidora d'aquests àcids i alcohols sobre les diferents dessaturases presents en la glàndula feromonal de *S. littoralis*.

Pel que fa als àcids, el compost **76** ja s'havia investigat prèviament al nostre grup de treball<sup>[143]</sup>, tot resultant que inhibia la  $\Delta^9$  dessaturasa ( $IC_{50} = 0,33$  nmols/glàndula, amb 4 nmols/glàndula de substrat (àcid [13,13,14,14,14-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-(*E*)-11-tetradecenoic), i una relació substrat/inhibidor de 12:1) i la dessaturació de l'àcid mirístic a àcid (*E*)-11-

tetradecenoic ( $\approx 50\%$  d'inhibició emprant 0,33 nmols/glàndula d'inhibidor i 4 nmols/glàndula de substrat (àcid [14,14,14- $^2\text{H}_3$ ]-mirístic), i una relació substrat/inhibidor de 12:1). Per contra, el compost **76** era inactiu (fins a 0,42 nmols/glàndula) sobre la transformació de l'àcid palmític perdeuterat (15,5 nmols/glàndula) en l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic perdeuterat. En els assaigs realitzats en aquest treball, tots tres compostos **76**, **77** i **78**, inhibiren la dessaturació en C11, tant de l'àcid mirístic perdeuterat com de l'àcid palmític perdeuterat. La discrepància de resultats obtinguts amb el producte **76** es fa difícil d'explicar. L'única diferència rau en el tipus d'assaig d'inhibició i en les concentracions emprades. En els experiments anteriors, realitzats *in vivo*, les glàndules feromonals es tractaren amb l'inhibidor (0,42 nmols/insecte) i, després de 30 min de preincubació, amb el substrat ( $\text{d}_{31}16$ :Acid, 15,5 nmols/insecte), essent la relació molar substrat/inhibidor de 37:1 o inclús més baixa si es considera que durant l'etapa de preincubació pot haver-hi pèrdua d'inhibidor, ja sigui per difusió per altres teixits, com per degradació metabòlica. Pel que fa a aquesta darrera possibilitat, s'ha demostrat que els àcids grassos ciclopropènics es degraden per  $\beta$ -oxidació en les glàndules feromonals<sup>[48]</sup>.

En canvi, en els experiments *in vitro* realitzats en aquest treball, els teixits s'incubaren amb concentracions equimolars (2,07 mM, 10 nmols/glàndula) de substrat ( $\text{d}_{31}16$ :Acid) i inhibidor. És possible que a la dosi de substrat emprada en els experiments *in vivo* l'activitat es trobés per sobre de la velocitat màxima i, per tant, l'efecte inhibidor no es fes palès. En canvi, la concentració de substrat emprada *in vitro* correspon a un 10-20% de la velocitat màxima<sup>[148]</sup>, amb el que l'efecte inhibidor es manifesta.

D'acord amb la hipòtesi de Fogerty<sup>[141]</sup>, d'entre tots aquests inhibidors, els àcids **76** i **77**, amb l'anell de ciclopropè situat sobre els carbonis C10-C11 i C11-C12, respectivament, haurien de resultar, tal com efectivament es demostra, més potents que l'àcid **78**, tant sobre la  $\Delta 9$  com la  $\Delta 11$  dessaturasa.

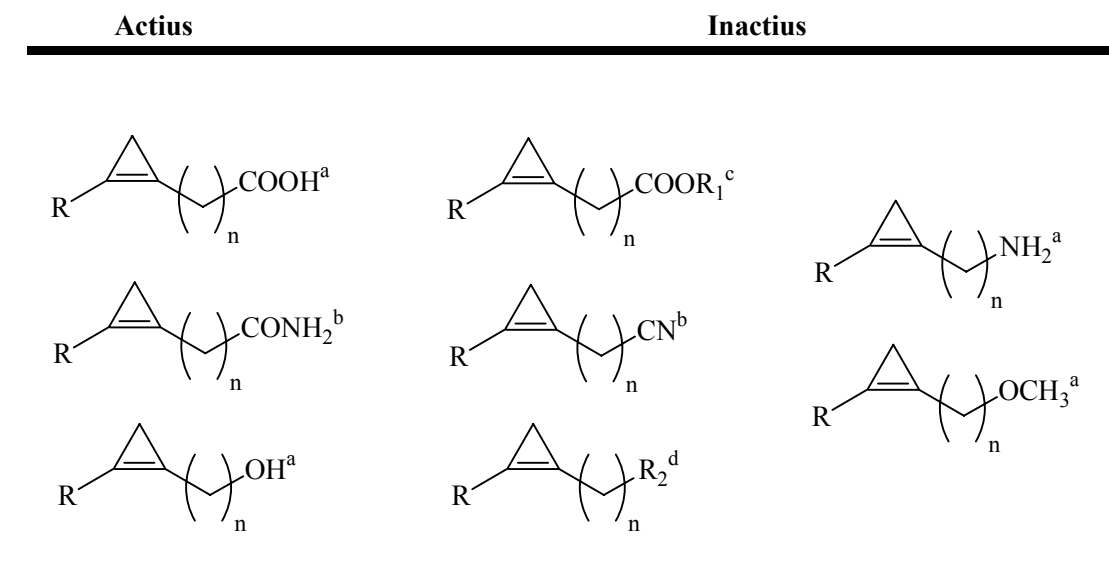
Els mateixos resultats s'obtingueren amb tots els alcohols ciclopropènics investigats, **73-75**. L'any 1962, Nordby i col<sup>[171]</sup> van descriure que l'alcohol estercúlic induïa l'acumulació d'àcid esteàric degut a la inhibició de la  $\Delta 9$  dessaturasa. Això indicaria que la funció àcid carboxílic terminal no era un requeriment essencial per a l'activitat inhibidora. A més, això significaria que aquests compostos no necessiten formar els tioèsters amb el CoA per tal de ser actius, tal com va proposar Jeffcoat<sup>[138]</sup>, o que, si més no, els ciclopropenil-CoA no són els inhibidors principals de la

dessaturació. D'acord amb aquests resultats, Ando i col[156, 172] van demostrar que l'amida derivada de l'àcid 10-(2-butil-1-ciclopropenil) decanoic era inclús un inhibidor més potent de la  $\Delta 11$  dessaturasa que el corresponent àcid gras ciclopropènic en l'espècie *Bombyx mori*.

Donats els avantatges sintètics que comporta l'ús d'alcohols ciclopropènics en front dels corresponents àcids carboxílics, es va plantejar investigar l'activitat dels alcohols **73-75** com a possibles inhibidors de les dessaturases que intervenen en la formació de la mescla feromonal en *S. littoralis*. En les condicions de l'assaig, tots els compostos inhibiren tant la  $\Delta 11$  dessaturasa com la formació dels diens a partir dels seus corresponents precursors. Per tant, si bé es tracta d'inhibidors potents, són alhora poc específics. D'entre tots aquests compostos, l'alcohol **73**, amb l'anell de ciclopropè situat sobre els carbonis C10-C11 va resultar ser l'inhibidor més potent, tot bloquejant totalment, en proporció equimolar amb el substrat, la síntesi, tant dels àcids (*Z*)- i (*E*)-11-tetradecenoics i (*Z*)-11-hexadecenoic, com dels àcids (*E,E*)-10,12- i (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoics.

Com ja s'ha comentat prèviament, Ando i col[156, 172] van demostrar que tant l'àcid 10-(2-butil-1-ciclopropenil) decanoic com la seva amida eren potents inhibidor de la  $\Delta 11$  dessaturasa de *Bombyx mori*, mentre que el corresponent nitril no presentava activitat. En el nostre grup de treball s'havia comprovat que els èsters metílics d'àcids ciclopropènics actius perdien l'activitat inhibidora[155]. El mateix resultat es va obtenir en transformar un àcid ciclopropènic actiu en el corresponent alcà[148]. Com a resum dels diferents resultats descrits, tant els àcids, com els alcohols com les amides es comporten com a inhibidors de la dessaturació, mentre que els èsters, nitrils i alcans són inefectius. Considerant tots aquests resultats, sembla ser que la presència de funcions donadores d'hidrogen a l'extrem terminal de la cadena és un requisit estructural per tal que es manifesti l'activitat inhibidora (Figura 1.69).

En aquest sentit, es pot proposar la formació de ponts d'hidrogen entre els extrems funcionalitzats dels derivats ciclopropènics i determinats aminoàcids acceptors d'hidrogen de l'enzim. Amb aquesta interacció es fixaria la distància correcta entre l'anell de ciclopropè i la funció terminal, que coincidiria amb la distància entre el *cluster* de ferro oxidatiu del centre actiu de l'enzim i la part de la proteïna que interacciona amb la unitat d'acil-CoA del substrat.



**Figura 1.69** Diferents estructures de derivats ciclopropènics assajades com a inhibidors de dessaturases. <sup>a</sup>Estudiades en aquesta Tesi. <sup>b</sup>Referència[172]. <sup>c</sup>Referència[144]. <sup>d</sup>Referència[148]. *R* és des de metil fins a pentil i *n* pren valors des de 8 fins a 10.

D'acord amb aquesta hipòtesi, el compost **83**, incapaç de cedir hidrogen, va resultar ser un inhibidor força menys potent que el seu anàleg no metilat **73**. En canvi, l'amina **82** va resultar inactiva, en les condicions de l'experiment, sobre totes les dessaturases de *S. littoralis*. No obstant, és possible que bona part de l'amina **82** estigui protonada al pH fisiològic intracel·lular, al voltant de 6,5 en glàndules feromonals, amb la conseqüent pèrdua de capacitat donadora d'hidrogen.

Cook i col[173] es basaren en la diferent capacitat inhibidora de l'àcid estercúlic per tal de diferenciar entre una  $\Delta 9$  i una  $\Delta 6$  dessaturasa en preparacions de cervell de rata. Però, dissortadament, com s'ha detallat en apartats anteriors, cap dels ciclopropens preparats va permetre diferenciar, en les condicions de l'assaig, entre les diferents activitats dessaturasa operatives en la glàndula feromonal de *S. littoralis*. La manca de selectivitat aparent pot explicar-se tot considerant els següents raonaments: en primer lloc, els efectes dels àcids **76**, **77** i **78** sobre la  $\Delta 11$  dessaturasa són lògics considerant la hipòtesi de Fogerty i col[141], que diu que si l'àcid gras ciclopropènic es troba situat al menys en un dels àtoms de carboni que s'oxiden en el substrat, serà inhibidor de la reacció de dessaturació. Pel que fa a la inhibició de la  $\Delta 9$  dessaturasa, de forma similar al que s'ha proposat en altres estudis d'inhibició[142-144], és raonable pensar que la dessaturació de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic al corresponent diè s'inhibeix pels

compostos **73-78** per interferència amb el reconeixement del doble enllaç del substrat per l'enzim. Finalment, l'efecte inhibidor de **73-78** sobre la 1,4-dessaturasa no té precedents a la literatura, però assumint un tipus d'inhibició com el de les 1,2-dessaturases, també en aquest cas s'acompleix la norma de Fogerty<sup>[141]</sup> i, per tant, s'explica que tots els compostos **73-78** presentin efecte inhibidor sobre aquest enzim.

Per tant, cap dels resultats obtinguts ens permetia descartar que els dos diens conjugats presents a la glàndula feromonal de *S. littoralis* fossin biosintetitzats mitjançant una única dessaturasa, amb activitat 1,4-dessaturasa sobre el substrat de geometria *Z* i activitat  $\Delta^9$  dessaturasa sobre el substrat de configuració *E*. Amb la finalitat d'obtenir evidències genètiques per a la confirmació d'aquesta hipòtesi, es proposà el clonatge i expressió funcional de les dessaturases implicades en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*. Els resultats d'aquest estudi es presenten i discuteixen en el capítol següent d'aquesta memòria.

***2.- CLONATGE I EXPRESSIÓ FUNCIONAL DEL cDNA  
QUE CODIFICA LES ACIL-CoA DESSATURASES PRESENTS  
EN SPODOPTERA LITTORALIS***





## **2. CLONATGE I EXPRESSIÓ FUNCIONAL DEL cDNA QUE CODIFICA LES ACIL-CoA DESSATURASES PRESENTS EN SPODOPTERA LITTORALIS**

### **2.1. INTRODUCCIÓ**

Tal com s'ha explicat a la introducció del Capítol 1, les dessaturases poden ser solubles o integrades a la membrana del reticle endoplasmàtic, tot essent els enzims presents a *S. littoralis* pertanyents al segon grup. Les dessaturases solubles són fàcilment purificables i han estat objecte d'un estudi exhaustiu i profund. En aquest sentit, fins i tot s'ha assolit l'obtenció de l'estructura cristal·lina de la  $\Delta 9$  estearoil-CoA dessaturasa de llavors de garrofer<sup>[7]</sup>. Aquestes aproximacions han proporcionat les bases de l'enginyeria genètica per obtenir enzims de plantes amb especificitats per substrats alterades<sup>[174]</sup>.

En canvi, degut a les dificultats de caire tècnic per aconseguir grans quantitats de dessaturasa de membrana purificada, els progressos realitzats en el coneixement d'aquesta classe d'enzims han estat lents i els avenços més importants s'han produït amb el desenvolupament de les noves tècniques de biologia molecular.

#### **2.1.1. Aplicació de la biologia molecular a l'estudi de les dessaturases integrades a membrana d'insectes**

El clonatge de la primera dessaturasa integrada a membrana va correspondre a la  $\Delta 9$  estearoil-CoA dessaturasa procedent de fetge de rata; això va ser possible gràcies a un ingent treball de purificació conduït pel grup del professor Strittmatter<sup>[9, 175, 176]</sup>. A aquesta fita va seguir la caracterització de diferents  $\Delta 9$  acil-CoA dessaturases de diversos organismes, com el ratolí<sup>[177]</sup>, llevat<sup>[25, 178]</sup>, carpa<sup>[179]</sup> i la mosca de la fruita<sup>[180]</sup>, entre d'altres.

Pel que fa a les dessaturases implicades en la biosíntesi de les feromones sexuals dels lepidòpters, la primera dessaturasa que es va clonar i expressar funcionalment, l'any 1998, va ser la  $\Delta 11$  acil-CoA dessaturasa de l'espècie *Trichoplusia ni*[181]. Aquest primer treball va impulsar el clonatge de diferents dessaturases de lepidòpters (Taula 2.1).

**Taula 2.1** Acil-CoA dessaturases de lepidòpters clonades.

Acil-CoA dessaturasa	Espècies	Referència
$\Delta 9$	<i>Trichoplusia ni</i>	[182]
	<i>Planotortrix octo</i>	[183]
	<i>Epiphyas postvittana</i>	[18]
	<i>Helicoverpa zea</i>	[184]
	<i>Argyrotaenia velutinana</i>	[185]
$\Delta 11$ (configuració Z)	<i>Trichoplusia ni</i>	[181]
	<i>Helicoverpa zea</i>	[184]
$\Delta 11$ (configuració E)	<i>Epiphyas postvittana</i>	[18]
$\Delta 11$ (configuració E/Z)	<i>Argyrotaenia velutinana</i>	[185]
	<i>Choristoneura rosaceana</i>	[186]
$\Delta 10$	<i>Planotortrix octo</i>	[183]
$\Delta 14$	<i>Ostrinia furnicalis</i>	[187]

Mitjançant el clonatge d'aquestes dessaturases és possible, un cop coneguda la seqüència d'aminoàcids i de bases nitrogenades, predir l'estructura d'aquests enzims, alhora que, a través de tècniques de mutagènesi dirigida, alterar les especificitats pel substrat. A més, un cop assolida l'expressió funcional de l'enzim, és possible l'obtenció biotecnològica d'àcids grassos insaturats d'alt valor afegit, com poden ser diens conjugats d'estereoquímica definida.

## 2.2. OBJECTIUS

Dins d'aquest context, es va plantejar com a un dels objectius d'aquesta Tesi el clonatge i expressió funcional dels cDNAs que codifiquen les dessaturases que intervenen en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*, ( $\Delta 11$  i  $\Delta 9$  dessaturases) (veure Figura 1.8, pàgina 18).

## 2.3. RESULTATS

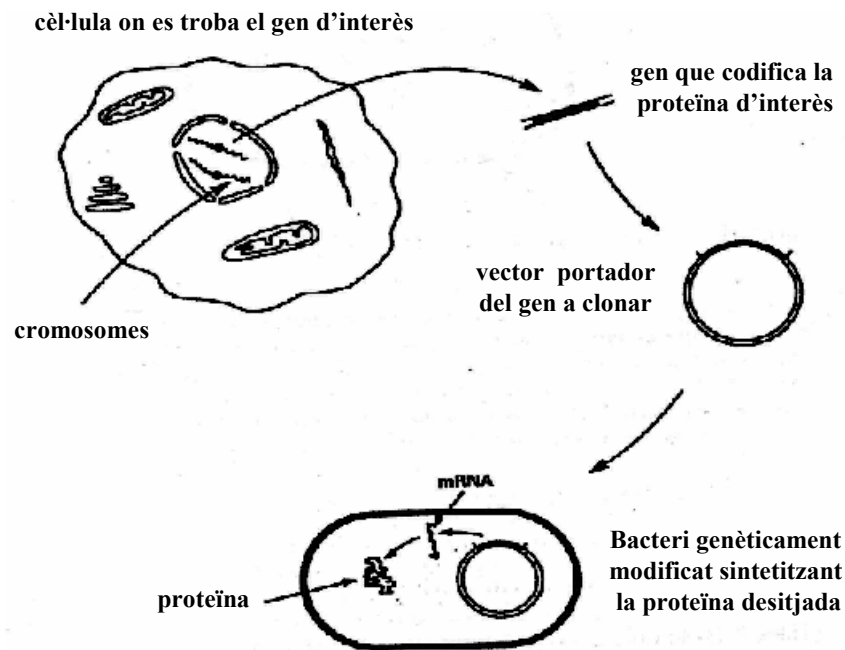
### 2.3.1. Clonatge del cDNA que codifica les acil-CoA dessaturases de *S. littoralis*

Bàsicament, el clonatge d'un gen<sup>[188]</sup> s'inicia localitzant el fragment de DNA que conté el gen d'interès, el qual s'insereix dins d'una molècula de DNA circular (vehicle o vector), tot obtenint una quimera o molècula de DNA recombinant. El vector actua com a vehicle que transporta el gen a una cèl·lula hoste la qual és, generalment, un bacteri, tot i que es poden utilitzar altres tipus d'organismes vius. Dins de l'organisme hoste el vector es multiplica tot produint nombroses còpies idèntiques entre sí del gen que transporta. A més, quan la cèl·lula hoste es divideix, les còpies de DNA recombinant són transferides a la progènie i novament es torna a repetir el procés de divisió, de manera que la quantitat de material corresponent al gen desitjat augmenta considerablement.

Després d'un nombre elevat de divisions cel·lulars, s'obté una colònia o clon, de les mateixes cèl·lules hoste. Cada cèl·lula dins del clon conté una o més còpies de la molècula de DNA recombinant buscada. En aquest moment, el gen inserit en la molècula recombinant ha estat clonat. Per tant, el clonatge permet produir una gran quantitat de molècules de DNA recombinant a partir d'una quantitat molt limitada de material genètic de partida. A més, la importància d'aquest procés rau en què es poden obtenir mostres pures d'un gen concret, separat de tots els altres gens que conté la cèl·lula. Un cop el gen ha estat clonat, es pot obtenir una gran quantitat d'informació, tant a nivell estructural, com referent a la seva expressió, regulació, etc<sup>[188]</sup>.

Si s'ha escollit l'hoste adequat, el gen clonat aprofitarà la maquinària genètica de la cèl·lula i codificarà la proteïna desitjada en quantitats elevades, la qual pot ser purificada o bé utilitzada per realitzar experiments *in vivo*. Tots aquests passos queden plasmats, de forma resumida, a la Figura 2.1.

Malgrat que sembli una tècnica bastant directa d'obtenció de grans quantitats de proteïnes o de gens, altrament difícils d'obtenir, el clonatge de gens pot ser molt complicat. Generalment, la clau de l'èxit o del fracàs radica en l'habilitat per a identificar el clon d'interès d'entre els diferents clons obtinguts durant el procés, a banda de poder identificar i aïllar el gen a clonar de dins del cromosoma de l'organisme primigeni.



**Figura 2.1** Etapes bàsiques en el clonatge d'un gen. Un cop s'ha localitzat el gen d'interès dins del cromosoma de l'organisme que el produeix, aquest s'uneix a un vector que actua de vehicle i s'introdueix en una cèl·lula hoste, la qual es replica i alhora és capaç de traduir aquest gen extern en la proteïna desitjada.

Aquest treball va ser realitzat, en bona part, en el marc d'una estada predoctoral realitzada l'any 2001 als laboratoris del professor Wendell L. Roelofs, a la *New York State Agricultural Experimental Station* de la Universitat de Cornell (Geneva, NY, Estats Units).

Les diferents etapes que es van seguir es resumeixen a continuació i s'explicaran posteriorment amb detall:

- Obtenció del material genètic i construcció de les biblioteques de cDNA de glàndula feromonal i de cos gras.
- Amplificació per la reacció de la polimerasa en cadena (PCR) de les regions centrals (CRs) dels gens que codifiquen els fragments conservatius d'histidines de les dessaturases.
- Unió dels DNAs a un vector, transformació de cèl·lules de bacteri, selecció dels clons, purificació dels plasmidis i seqüenciació.
- A partir de les CRs, amplificació dels gens sencers i identificació dels ORFs.

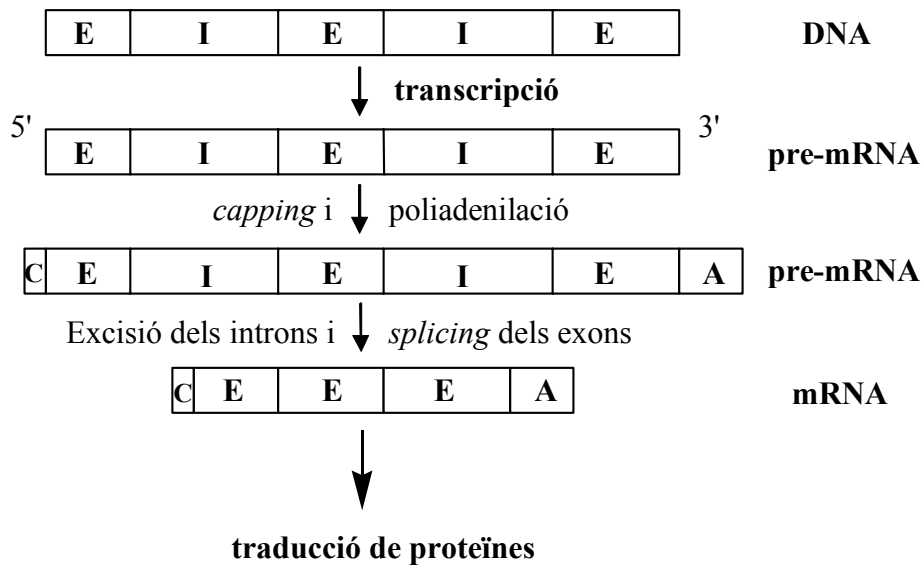
- Unió dels diferents ORFs a un vector, transformació de cèl·lules de bacteri, selecció dels clons, purificació dels plasmidis i seqüenciació.
- Transformació de cèl·lules de llevat i assaig funcional del gen expressat per tal de corroborar la seva funció de dessaturasa.

### ***2.3.1.1. Obtenció del material genètic i construcció de les biblioteques de cDNA 5'RACE-cDNA i 3'RACE-cDNA de glàndula feromonal i de cos gras***

Per tal que un gen tradueixi una proteïna és necessari que tingui lloc la transcripció del DNA en RNA missatger (mRNA). Donat que les dessaturases d'interès actuen en la biosíntesi de la feromona sexual, aquest mRNA es troba a la glàndula feromonal. A fi de disposar d'un control negatiu, paral·lelament, també es procedí al clonatge de les dessaturases presents al cos gras, que teòricament només hauria de presentar la  $\Delta 9$  dessaturasa, responsable de la formació dels àcids grassos oleic i palmitoleic.

Treballar amb el mRNA en comptes del DNA genòmic presenta una sèrie d'avantatges[189]:

- El mRNA porta al seu extrem 3' una cua de poliadenines (poliA) (Figura 2.2). Això permet la separació d'aquest RNA de la resta d'àcids nucleics i proteïnes presents al cru mitjançant cromatografia d'afinitat amb una columna de cel·lulosa que porta una cua de politimidines, o oligo(dT), la qual forma híbrids RNA-DNA estables tot depenent de la concentració de sals al medi (Figura 2.3).
- Un cop es disposa del mRNA aïllat i purificat, la població heterogènia resultant codifica virtualment totes les proteïnes sintetitzades per la cèl·lula, entre les quals es troben, òbviament, les dessaturases.
- Durant el procés de transcripció, s'eliminen els introns que es troben al gen, els quals són seqüències d'utilitat no gaire clara, però que en qualsevol cas no intervenen en la formació de la proteïna. Si en un supòsit s'arribés a saber en quina posició es troba el gen que codifica les dessaturases dins del genoma, es podria presentar el problema que l'organisme on es realitza el clonatge no sabés processar aquest DNA. En tal cas, de no eliminar-se els introns, s'obtindria una proteïna no funcional. En el cas d'emprar el mRNA, en estar completament processat, es traduirà una proteïna generalment activa (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Síntesi i processament del mRNA el qual dóna lloc a la formació de proteïnes. A l'extrem 3' es pot apreciar la cua de poliadenines (A). El procés de *capping* (C) no és més que la pirofosforilació de l'extrem 5'. Els introns estan marcats com a I, mentre que els exons ho estan com a E.

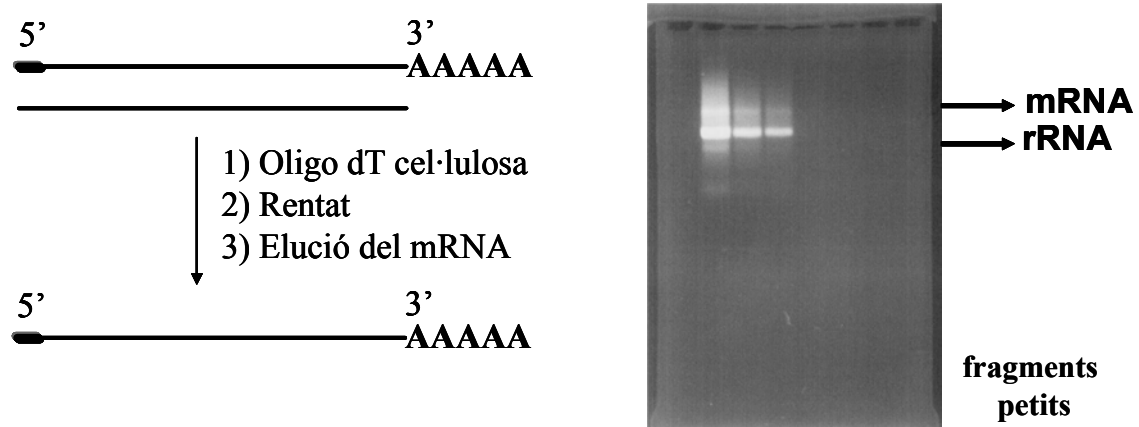
Amb aquests coneixements previs, a partir de 200 glàndules feromonals i d'aproximadament 0,5 mL de cos gras, es procedí a l'extracció del mRNA amb el *kit* Poly(A)Purist™ (Ambion), d'acord amb les especificacions del fabricant, basades en la mètodica descrita per Chomczynski i Sacchi[190].

Els mRNAs així obtinguts donaven una taca difusa a la zona de masses altes en les anàlisis per electroforesi (Figura 2.3). L'absència de bandes en la zona de pesos moleculars baixos indicava que no s'havia produït degradació per ribonucleases. Sí que s'observava un senyal intens corresponent al RNA ribosòmic (rRNA), el qual, degut a la seva gran abundància, és molt difícil de separar.

El mRNA no pot ser unit a un vector per tal de ser introduït a una cèl·lula hoste, ja que les ribonucleases presents arreu el degradarien fàcilment. Tanmateix, aquest mRNA pot ser convertit en el corresponent DNA mitjançant la síntesi del seu DNA complementari o cDNA.

L'enzim clau per realitzar aquesta transformació és la transcriptasa inversa, la qual sintetitza una cadena de DNA complementària a una de RNA ja existent (Figura 2.4, pàgina 114). Aquest cDNA pot ser unit a un vector i clonat. Els clons que en resulten (biblioteca de cDNA) són representatius del mRNA present en la preparació inicial.

Donat que aquest cDNA prové d'un mRNA ja processat, no presenta introns i no hi ha possibilitat d'*splicing* i la transcripció i traducció condueixen a una proteïna, en principi, funcional.



**Figura 2.3** Esquema de purificació del mRNA de la glàndula feromonal i el cos gras de *S. littoralis* mitjançant una columna d'oligo dT cel·lulosa i anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa. La taca difusa a pesos moleculars alts correspon al mRNA, acompanyat del rRNA.

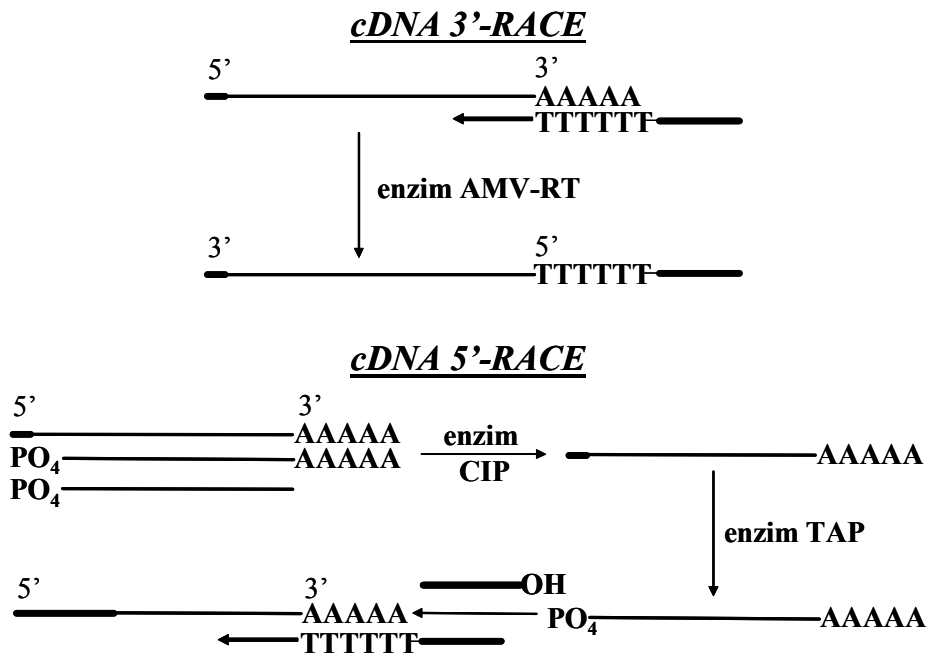
Hi ha dues formes de construir la biblioteca de cDNA: (a), a partir de l'extrem 3' del mRNA (on es troba la cua d'adenines) o (b), començant per l'extrem 5' (Figura 2.4). La raó de tenir dos tipus de biblioteques és simplement la de no perdre informació. Si la transcriptasa inversa comencés només per l'extrem 3' del mRNA, existirien moltes possibilitats que la part d'informació corresponent a l'altre extrem no fos completa degut a què la fiabilitat d'aquest enzim en cadenes molt grans no és gaire elevada.

Ara bé, tal com es veurà posteriorment, tot superposant les informacions obtingudes a partir de les dues biblioteques de cDNA per separat, es pot arribar a obtenir tota la seqüència del gen d'una forma fiable.

En el nostre cas, ambdues biblioteques es generaren mitjançant l'amplificació ràpida dels extrems 5' i 3' del cDNA emergent (RACE, *rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends*), tot utilitzant el kit *GeneRacer*<sup>TM</sup> (Invitrogen).

La construcció de la biblioteca de cDNA a partir de l'extrem 3' (3'RACE) fou més directa, ja que únicament calia un oligonucleòtid de timines lligat a un adaptador com a *primer* per a la transcriptasa inversa (Figura 2.4). L'adaptador és una seqüència coneguda d'oligonucleòtids que serà utilitzada per a realitzar la reacció de PCR més endavant.

La construcció de la biblioteca de cDNA a partir de l'extrem 5' (5'RACE) es va fer de la mateixa manera, si bé no fou tan ràpida degut a que l'extrem 5' dels mRNAs acaba amb un grup pirofosfat (*capping*), que impedeix la unió amb l'extrem 3'-hidroxil de l'adaptador. A més, abans d'eliminar l'estructura de *capping*, cal desfosforilar tots els altres RNA presents en la preparació, que competirien amb el mRNA d'interès per l'adaptador. Després d'aquestes dues etapes, l'extrem 5' estava en condicions d'unir-se a l'adaptador (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Construcció de les biblioteques de cDNA (3' i 5'RACE) mitjançant la transcriptasa inversa a partir del mRNA, tot aprofitant la presència d'una cua de poliadenines en aquest. En el cas de la 5'RACE, el procés és més llarg. El mRNA porta al seu extrem 5' un residu de pirofosfat. Inicialment, mitjançant l'enzim CIP, es desfosforilen tots els altres RNA no desitjats per tal que no es puguin unir a l'adaptador. Un cop fet això, mitjançant l'enzim TAP s'elimina l'estructura de *capping* i es lliga un adaptador, actuant la transcriptasa inversa. Abreviatures: AMV-RT (*avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase*); CIP (*calf intestinal phosphatase*); TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*).

Un cop es disposa dels dos tipus de biblioteca de cDNA, 3'RACE i 5'RACE, pels dos tipus de teixit, glàndula feromonal i cos gras, el següent pas era identificar les dessaturases dins del conjunt de seqüències d'oligonucleòtids de les biblioteques.

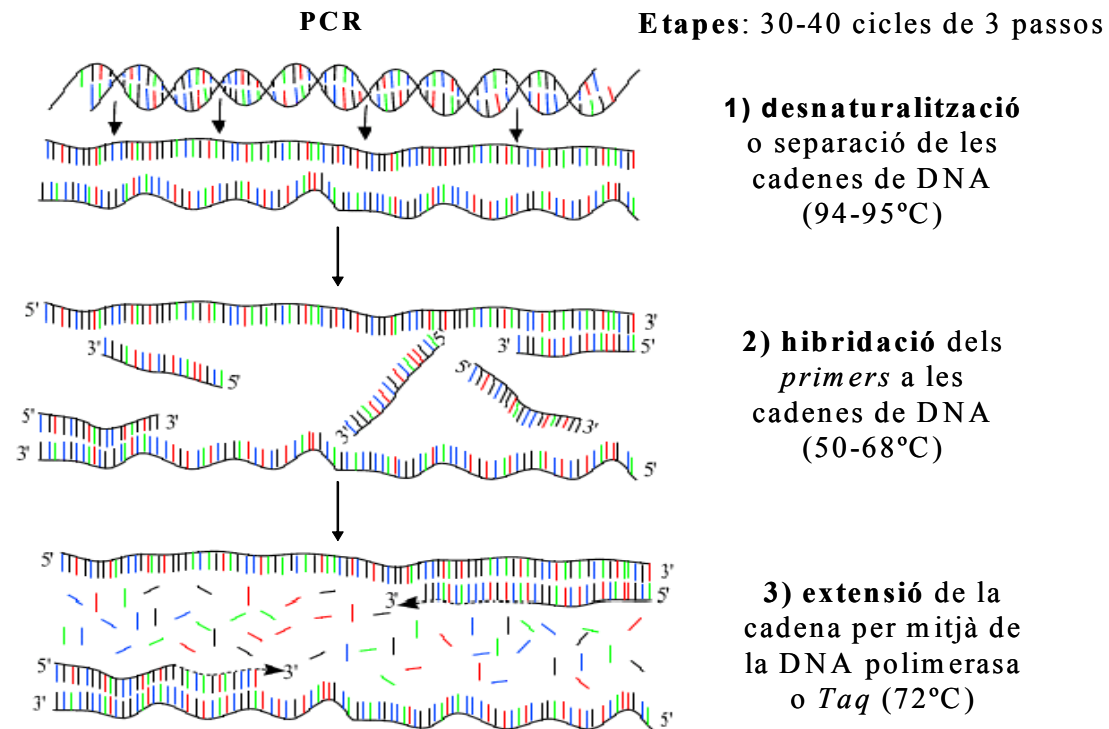


### 2.3.1.2. Identificació de les regions centrals (CRs) dels gens que codifiquen les dessaturases presents a la glàndula feromonal i al cos gras de *S. littoralis*

La reacció de la polimerasa en cadena (PCR, *polymerase chain reaction*) es basa en l'amplificació exponencial d'un fragment concret de DNA *in vitro*. Aquest procediment està basat en repeticions successives de 3 cicles de temperatura (un total de 30-40 cicles), com són (1), desnaturalització de la cadena de DNA; (2), hibridació d'una sèrie d'oligonucleòtids o *primers* a aquesta cadena i (3), extensió d'aquests *primers* mitjançant una polimerasa de DNA termoestable, com és ara l'enzim aïllat del bacil *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa) (Figura 2.5).

En l'etapa de desnaturalització, les cadenes de DNA es separen a una temperatura determinada degut, en part, al seu contingut de guanines i citosines (G+C). Les regions amb un contingut de G+C més alt es separaran amb més dificultats. La hibridació és l'etapa clau de la PCR. Si la temperatura d'hibridació ( $T_h$ ) és massa elevada, els *primers* gairebé no s'hibridaran a la cadena de cDNA, mentre que si la temperatura és massa baixa, s'obtingran hibridacions no específiques amb qualsevol regió de la cadena. Finalment, en la fase d'extensió, que es duu a terme a uns 72-78°C, la *Taq* polimerasa afegeix oligonucleòtids (dATP, dTTP, dGTP i dCTP) presents al medi de reacció sobre el *primer* hibridat tot construint una nova cadena complementària a la primera.

La identificació de les dessaturases en les biblioteques de cDNA es va fer per amplificació del cDNA tot emprant *primers* capaços hibridar-se amb regions del gen característiques de dessaturases de membrana, com són els fragments que codifiquen les agrupacions conservatives d'histidines<sup>[26]</sup> i que, al llarg d'aquesta memòria, anomenarem "regions centrals" (CRs). En concret, s'optà per l'ús de *primers* degenerats (Taula 2.2, pàgina 117), que van ser dissenyats d'acord amb les seqüències de nucleòtids d'altres gens de dessaturases identificats anteriorment<sup>[181, 182]</sup>. Així, tot utilitzant la biblioteca 3'RACE, tant de glàndula feromonal com de cos gras, com a motllo i mitjançant cada parella de *primers*: PR3+PR4, PR5+PR6 i PR9+PR10 (un per a cadascuna de les cadenes de DNA resultants de la etapa de desnaturalització), s'obtingueren les CRs dels diferents gens que suposadament codifiquen les acil-CoA dessaturases en *S. littoralis*.



**Figura 2.5** Etapas seguides en l'amplificació d'un fragment de DNA mitjançant la PCR.

Un cop s'havia amplificat la zona d'interès, els DNAs obtinguts s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa. Tal com es mostra a la Figura 2.6, els extractes de DNA presentaven, en tots els cassos, una banda al voltant de 570 bp, que era la mida esperada pels productes d'ampliació de les CRs. Aquest resultat indicava que els diferents primers emprats havien amplificat correctament aquestes regions. Juntament amb les bandes d'interès, s'observaven altres bandes de diferents grandàries. Això era degut a què, en emprar primers degenerats, es necessita una temperatura d'hibridació baixa, inferior als 50°C, que facilita la formació de diferents fragments derivats d'hibridacions inespecífiques. Ara bé, tot i que aquests fragments també seran clonats, s'eliminaran en la fase de selecció dels clons positius.

**Taula 2.2** *Primers* utilitzats en aquest treball. El primer grup de *primers* específics (SLF-Z9-5'-1 fins SLG-CR22-3'-3) està dissenyat a partir de les regions centrals trobades en la PCR realitzada amb els *primers* degenerats i serveixen per obtenir la seqüència completa del gen i el seu ORF. El segon grup correspon als *primers* dissenyats per amplificar la seqüència de l'ORF. Finalment, els *primers GeneRacer*<sup>®</sup> estan dissenyats per tal d'hibridar-se amb els adaptadors existents a cadascuna de les biblioteques de cDNA (3'RACE i 5'RACE).

---

**PRIMERS DEGENERATS**

ATCACNGCHGGBMYCAYMG	PR3
GGRAASDYRTGRTGRWARTT	PR4
GGYATYACVCHGGNGCWCA	PR5
TGRTARTTRTGGAABSCYTCNCC	PR6
GACCAYMGNHWSAYCA	PR9
GGRWAVRYRTGRTGRTARTT	PR10

**PRIMERS ESPECÍFICS**

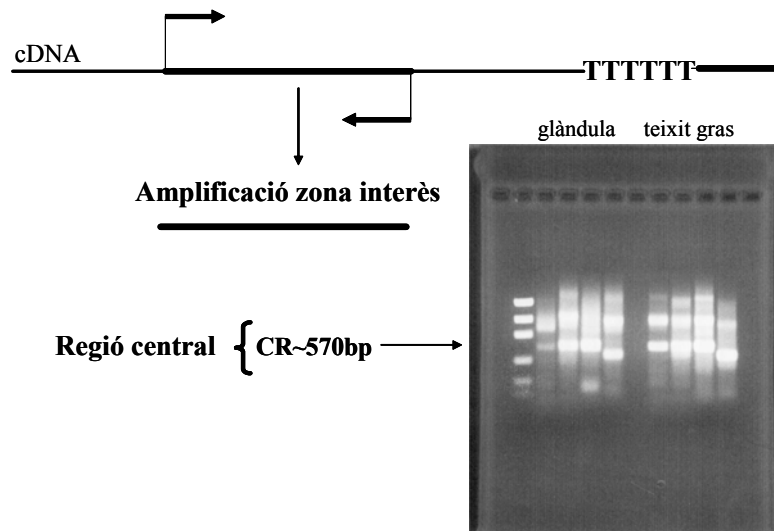
GTTTCCACCGGGTTGATGTTCTTAT	SLF-Z9-5'-1
GTAACGAAAGATGGAGCACACGAA	SLF-Z9-5'-2
GATGCATCACAAGTACTCCGAAACC	SLF-Z9-3'-1
GTATTGAACGTGACTTGGCTGGTGA	SLF-Z9-3'-2
CCGATGATGGAGTGGATGGTCTTC	SLG-CR5-5'-1
GACTGTGTTTTGAAACGCAAGGGA	SLG-CR5-5'-2
GACTTTGGTCGCATAAACTTAC	SLG-CR5-3'-1
CGTAGGATCTTTCTATTCCACATCG	SLG-CR5-3'-2
TCACCGAGAGCTGCCAACTTACTA	SLG-CR4-5'-1
CAACAACGCGAACAATGGAATGAAGAAT	SLG-CR4-5'-2
GGAAGACCGGCGCATTGCACTAAAACC	SLG-CR4-3'-1
TCGTGAAATCGGTGGAGAATAGTC	SLG-CR4-3'-2
CTTATGAGCAGCGGAGTTGACGA	SLG-CR22-5'-1
TTTAGTGCCATTTAGCTTTATAGGATTTG	SLG-CR22-5'-2
CTCAAGGAAAAGGGCAAAGGAC	SLG-CR22-3'-1
GTTATGCCACGATGATTCCTGTAT	SLG-CR22-3'-2
TCATAAGTGGGGAGACAAACCT	SLG-CR22-3'-3
AGCCTCTAGAATGCCTCCTCAAGGGCAAACCTGGTGG	SLF-5'-ORF-1
TCATCTAGAATGCCTCCTCAAGGGCAAACCTGG	SLF-5'-ORF-2
TCATCTAGAATGCCTCCTCAAGGG	SLF-5'-ORF-3
TACTCTAGACTTCTAGTTGTGCTATTACAC	SLF-5'-ORF-4
AGCTGAGCTCTTATTCAGTCTTGTCTGGGTTA	SLF-3'-ORF-1
ACAGAGCTCCTTCGATCTAATGGAGTTTGAC	SLF-3'-ORF-2
ACTGGAGCTCAAATGGCGCAATGTGTAC	SLG-5'-ORF5
ACTGTCTAGACTATTCGCCTTTTGTATTTT	SLG-3'-ORF5
AGCTTCTAGAATGGCTCCAGCGCAAAAACAC	SLG-5'-ORF4-1
AGCTGAGCTCATGGCTCCAGCGCAAAAACAC	SLG-5'-ORF4-2
ACTGAGCTCACTATGGCTCCAGCGCAAAAACAC	SLG-5'-ORF4-3
AGCTGAGCTCTCATTTCGGCGTGACAT	SLG-3'-ORF4-1
AGCTTCTAGATCATTTCGGCGTGACAT	SLG-3'-ORF4-2
TTTTCTAGAATGGCTCCAAATATATCGGAGGA	SLG-5'-ORF22
TCAGAGCTCTTAATCATCCTTAGGGTTAATCCTA	SLG-3'-ORF22

**PRIMERS GENE-RACER<sup>®</sup>**

GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	GR-3'-P
CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	GR-3'-NP
CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	GR-5'-P
GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	GR-5'-NP

---

Per tal que es realitzi la replicació de DNA exogen dins d'una cèl.lula hoste, cal unir-lo a un altre fragment de DNA, el vector, que actuï de vehicle. Com a vectors més habituals s'utilitzen els plasmidis i els virus.



**Figura 2.6** Amplificació de la regió central de les dessaturases presents tant a la glàndula feromonal com al cos gras mitjançant la PCR. Les fletxes sobre el cDNA indiquen les parelles de *primers* degenerats utilitzats. A la dreta es mostra el gel d'agarosa amb els diversos fragments obtinguts tot emprant els diferents *primers*, indicant aquells fragments que per la seva mida (570 bp) podrien correspondre a una regió central.

En aquest treball es va optar pels plasmidis, els quals presenten les següents característiques:

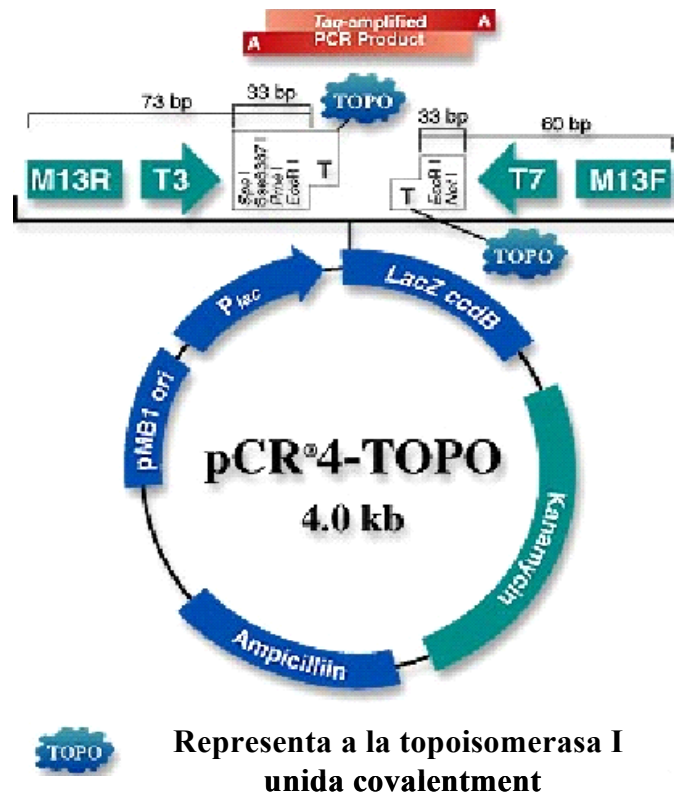
- Són molècules de DNA extracromosomal que presenten una existència independent en el bacteri. No es troben en mamífers i sí en bacteris i llevat, entre d'altres.
- Generalment, són estructures circulars de doble cadena, que poden ser aïllades en forma de superhèlix.
- Presenten al menys una seqüència de DNA que pot actuar com a origen de la replicació i, per tant, són capaços de multiplicar-se dins de la cèl.lula independentment del cromosoma bacterià principal.
- Contenen gens que codifiquen enzims útils pel bacteri, com per exemple gens que codifiquen proteïnes de resistència a determinats antibiòtics. Tal com es veurà més

endavant, aquests gens actuen com a marcadors selectius tot facilitant el procés de selecció dels clons.

- Poden ser de còpia alta, útils per DNA de menys de 15 kb, o de còpia baixa, d'utilitat quan es treballa amb gens inestables o letals per la cèl·lula. Generalment, quant més petit sigui el fragment de DNA més estable serà el plasmidi, tot augmentant l'eficiència de la transformació, el número de còpia, etc.
- Presenten incompatibilitat amb altres plasmidis dins d'una mateixa cèl·lula i, per tant, cada cèl·lula només podrà contenir un mateix tipus de plasmidi, fet que implica que una mateixa colònia només serà portadora d'un sol gen.

En el nostre cas, el plasmidi escollit en aquest punt va ser el PCR™ 4-TOPO de 4 kb (Figura 2.7). Aquest plasmidi presenta les següents característiques:

- Presenta extrems 3' timidina per tal d'afavorir la unió del DNA obtingut en la PCR. La *Taq* polimerasa és capaç de catalitzar l'addició no dependent de motlle d'un únic nucleòtid, concretament d'una adenina, a l'extrem 3' de la nova cadena emergent[191, 192]. Aquesta unió està catalitzada per una topoisomerasa I en comptes d'una ligasa.
- El lloc de clonació es troba dins del gen *LacZ*, tot permetent una fàcil selecció de les colònies positives mitjançant un senzill test colorimètric que serà explicat més endavant.
- Presenta el repressor de l'expressió *P<sub>lac</sub>*, amb el que s'evita que la proteïna, en aquest cas la dessaturasa, s'expressi a la cèl·lula hoste.
- Inclou dos gens marcadors que confereixen resistència a dos tipus diferents d'antibiòtics, com són l'ampicil·lina i la kannamicina, tot permetent la selecció dels clons que duguin el gen d'interès, simplement per creixement de les cèl·lules transformades en un medi que contingui algun d'aquests anitibiòtics.
- Presenta múltiples dianes de restricció per tal de poder alliberar el DNA d'interès amb les endonucleases de restricció adequades.
- Finalment, conté llocs de seqüenciació (*priming sites*), com són el M13F, M13R, T3 i T7.



**Figura 2.7** Plasmidi utilitzat com a vector per transferir les molècules de DNA obtingudes a la PCR a un bacteri per tal d'augmentar la quantitat de material genètic.

Així, tot seguint les instruccions del fabricant, les diferents CRs obtingudes, tant de glàndula feromonal com de cos gras, s'uniren al vector i amb els plasmidis construïts es passà a transformar cèl·lules d'*E. coli*.

En circumstàncies normals, els bacteris només poden incorporar una quantitat limitada de DNA. Per tal d'augmentar l'eficiència de la transformació, les cèl·lules hoste han d'esdevenir competents. Aquesta característica es pot induir experimentalment per tractaments físics (electroporació) o químics (amb  $\text{CaCl}_2$ ), que modifiquen l'estructura de la paret cel·lular bacteriana, amb el que augmenta la capacitat de les cèl·lules d'incorporar DNA.

Les cèl·lules competents van ser transformades amb cadascun dels plasmidis i es van fer créixer en medi LB sòlid en presència d'ampicil·lina. En una primera selecció, només els bacteris que duïen els plasmidis i eren, per tant, resistents a l'antibiòtic, van poder créixer i colonitzar la placa. Ara bé, l'eficiència del procés d'unió del DNA amplificat amb el vector és molt baixa i, per tant, també es van obtenir bacteris mutants amb vectors buits, que, en presentar el gen de resistència a l'antibiòtic, van formar

colònies en el medi selectiu. Aquestes colònies es van poder identificar ja que presentaven activitat  $\beta$ -galactosidasa en tenir el gen *LacZ* intacte i, per tant, degradaven el X-gal (derivat de la galactosa) present al medi de cultiu a un derivat de color blau. En canvi, les colònies transformades amb els plasmidis correctes no presentaven activitat  $\beta$ -galactosidasa, ja que el lloc de clonatge està a l'interior del gen *LacZ*, el qual, amb la inserció del fragment de DNA, no es pot traduir. Com a conseqüència, les colònies són blanques.

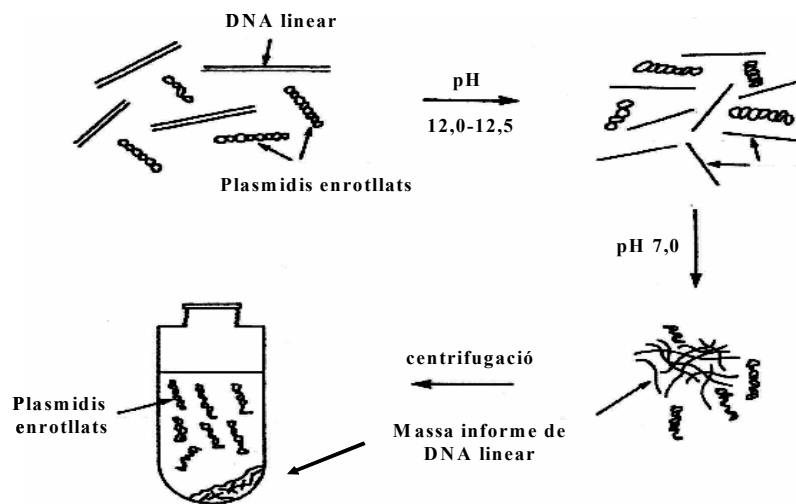
Finalment, la darrera etapa de selecció consistí en l'amplificació selectiva dels fragments units al vector mitjançant la PCR colonial, amb la qual va ser possible identificar els clons "falsos positius", que porten fragments de DNA diferents dels corresponents a les CR de les dessaturases. Com que els *primers* emprats en les construccions de les biblioteques de cDNA presentaven un adaptador (Figura 2.4, pàgina 114), era possible fer una nova PCR amb *primers* que presentessin homologia amb aquest adaptador com són els oligonucleòtids GeneRacer™ GR-3'-P i GR-5'-P.

Per tant, es seleccionaren uns 10-20 clons blancs de cadascuna de les plaques selectives, procedents de les transformacions amb els productes de PCR tot emprant els *primers* degenerats PR3+PR4, PR5+PR6 i PR9+PR10, tant pel cDNA procedent de glàndula feromonal com de cos gras. De cada colònia, una part es tornà a fer créixer en plaques de medi selectiu LB i una altra part s'amplificà per PCR colonial. Els productes de reacció s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa per tal de comprovar quins dels clons escollits contenien el DNA de grandària correcta.

Cada colònia positiva s'inoculà en medi de cultiu LB líquid, a fi d'obtenir suficient material biològic per a l'extracció, purificació i seqüenciació del DNA clonat.

La purificació del DNA plasmídic consisteix, bàsicament, en la separació d'aquest de l'abundant material genètic bacterià endogen. La separació d'aquests dos tipus de DNA es basa en les diferències físiques entre els plasmidis i el DNA bacterià, especialment les diferències referents a la grandària i a la conformació (circular o bé lineal) de cadascun. El mètode d'elecció és la purificació de plasmidis per desnaturalització alcalina (Figura 2.8), basat en la diferent conformació existent entre les dues classes de DNA presents a l'organisme hoste. El fonament d'aquesta tècnica és que el DNA que no es troba en forma de superhèlix (DNA cromosòmic o lineal) es desnaturalitza quan es sotmet a un determinat rang de pH (12,0-12,5) en el qual els plasmidis són estables (si el temps d'exposició no és massa llarg). A aquest pH, els ponts d'hidrogen del DNA lineal es trenquen i les dues cadenes de polinucleòtids es

separen, mentre que les dues cadenes del DNA circular es mantenen hibridades, ja que es troben topològicament enllaçades. Si en aquest moment s'acidifica el pH, el DNA bacterià desnaturalitzat forma agregats els quals, en centrifugar, precipiten, mentre que les molècules de DNA plasmídic romanen al sobrenedant. Amb aquest procediment també és possible eliminar la major part de les proteïnes i RNA presents a l'extracte[188, 189, 193]. En el nostre cas, la purificació es va realitzar emprant el *kit Quantum Prep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep* (BIO-RAD).

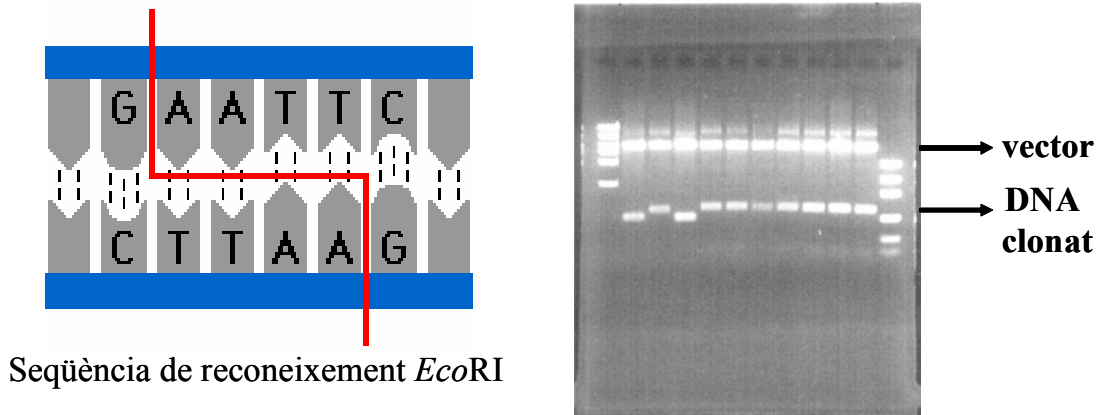


**Figura 2.8** Mètode de purificació dels plasmidis per desnaturalització alcalina.

Un cop es disposava dels diferents plasmidis amb les CRs dels gens de dessaturasa, calia confirmar la presència del fragment de DNA correcte en cadascun. A tal fi, es procedí a alliberar aquest fragment de DNA clonat del vector per digestió amb enzims de restricció. Aquests enzims són endonucleases capaces de reconèixer seqüències curtes i específiques de DNA (generalment palíndroms, de 4 a 6 parells de bases) i trencar els enllaços de tipus fosfodièster d'una cadena de DNA per uns llocs específics que es troben a dins o adjacents a aquesta seqüència de reconeixement (dianes de restricció). Tal com s'ha explicat abans, el vector PCR<sup>™</sup> 4-TOPO (Figura 2.7, pàgina 120) presenta diverses dianes de restricció que flanquegen el DNA unit. En el nostre cas concret, es va utilitzar l'enzim *EcoRI*, que reconeix la seqüència 5'-GAATTC-3' (Figura 2.9). Un cop finalitzades les digestions de tots els plasmidis purificats seleccionats, els diferents fragments s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa.



S'observaren dos tipus de fragments (Figura 2.9), un de grandària al voltant de les 4 kb corresponent al vector digerit, i un altre, d'unes 0,6 kb, corresponent al DNA clonat.



**Figura 2.9** Seqüència de reconeixement de l'enzim de restricció *EcoRI* i gel corresponent a la digestió del vector, on es pot apreciar tant el plasmidi ( $\approx 4$  kb) com el DNA alliberat ( $\approx 0,6$  kb).

Els diferents fragments de DNA clonats es seqüenciaren i les seqüències s'analitzaren informàticament (DNASTAR LaserGene™), tot obtenint 4 tipus diferents de CRs, 3 per a la glàndula feromonal i una pel cos gras (Figura 2.10). La traducció d'aquestes seqüències va proporcionar les regions d'histidines, d'elevada homologia amb les CRs d'altres dessaturases d'insecte conegudes. Aquests resultats confirmaven que s'havia aconseguit aïllar les CRs de 4 enzims amb funció dessaturasa a partir del mRNA purificat de glàndula feromonal i de cos gras. Aquestes CRs es denominaren: SLG-CR5, SLG-CR22, i SLG-CR4 (procedents de la glàndula feromonal), i SLFB (procedent del cos gras).

- El fragment SLG-CR5 corresponia a una regió central de 569 bp la qual presentava una elevada homologia amb altres regions centrals de gens que codifiquen una  $\Delta 11$  dessaturasa. Concretament, un 86% amb *H. zea*<sup>[184]</sup>, un 78% amb la regió central de *T. ni*<sup>[181]</sup>, un 71% amb la de *A. velutinana*<sup>[185]</sup>, i un 60% amb la regió central de *E. postvittana*<sup>[18]</sup>, entre altres.
- El fragment SLG-CR22 (564 bp) presentava una homologia elevada amb regions centrals que codifiquen  $\Delta 9$  dessaturases, com un 92% amb *H. zea*<sup>[184]</sup>, un 85% amb *A. velutinana* i *P. octo*<sup>[183, 185]</sup> i un 70% amb *T. ni*<sup>[182]</sup>.

- Un altre fragment, el SLG-CR4, de 455 bp, tot i presentar els dominis rics en histidines, mostrava una homologia baixa amb altres regions centrals (<45%).
- Finalment, procedent del cos gras, es va trobar el fragment SLFB, de 557 bp, amb una homologia alta amb altres regions centrals que codificaven  $\Delta 9$  dessaturases. Així, presentava una homologia del 90% amb *T. ni*<sup>[182]</sup>, del 72% amb *P. octo*<sup>[183]</sup> i *A. velutinana*<sup>[185]</sup>, del 70% amb *H. zea*<sup>[184]</sup> i del 69% amb *O. nubilalis*<sup>[187]</sup>.

*Regió central SLF (557 bp)*

GTATTACGGCAGGGGCACAGGCTATGGGCTCACAAATCATACAAAGCTCGTCTGCCACTGCGAATTCTACTTACTCTC  
 TTCAACTTTGGCCTTCCAAGATGCCGTAATCGACTGGGCCGCGATCATCGGATGCATCACAAAGTACTCCGAAACC  
 GATGCTGATCCTCACAAATGGGACTCGAGGCTTTTTCTTCTCCACGTCGGATGGCTGCTGGTTCAGGAAACACCCGCGAG  
 ATCAAGGCTAAAGGACACACTATTGACCTGAGCGATCTTAAGAATGATCCATTCTGCGCTTCCAAAAGAAACACTA  
 TCTGATCCTTATGCCTCTGGTCTGCTTCATCCTGCCGTGCTACATCCCGACCCTGTGGGGCGAATCTCTGTGGAATGCA  
 TACTTCGTGTGCTCCATCTTTTCGTTACGTCTACGTATTGAACGTGACTTGGCTGGTGAACCTCCGCTGCCACCTGTGGG  
 GCGCCAAGCCTTACGATAAGAACATCAACCCGGTGAAACCAAACCCGCTCCTCTCGTGGTGTCTGGCGAAGGCTC  
 CACAATTATCA

*Seqüència d'aminoàcids corresponent a SLF*

VLRQGHRLWAHKSYPKARLPLRILLTLFNTLAFQDAVIDWARDHRMHHKYSSETDADPHNATRG  
 FFFSHVWLLVRKHPQIKAKGHTIDLSDLKNDPILRFQKKHYLILMPLVCFILPCYIPTLWGESLW  
 NAYFVCSIFRYVYVNLVNTWLVNSAAHLWGAKPYDKNINPVETKPVSLVVLGEGFHNY

*Regió central SLG-CR5 (569 bp)*

ATCACGGCAGGGCACCATAGACTTTGGTCGCATAAAAACCTTACAAAGCAAAACTACCTTTACAAAATTCTGCTAATGGT  
 GATGAATTCCTTGGCTTCAAAAACACAGTCATTGATTGGGTGAGAGACCATCGACTCCATCATAAGTATAGCGACAC  
 TGATGCCGATCCCCATAATGGCTCCCGAGGATTTTTCTATTTCGCACGTCGGTGGCTGCTGTGTGAAAACACCCGTA  
 TGTCAGAAGAACGAGGAAAGGAAATTGATATATCTGATATTACAACAATCCGGTACTGAGGTTCCAGAAGAAGTACG  
 CAATTCCTTTCATCGGGGAGTTTTGTTTCGTTTTACCAACATTGATACCGGTTTACGGTTGGGGAGAAAACCTGGACTA  
 ATGCCTGGCACGTCGCCATGCTGCGGTACATTATGAACCTAACGTCACCTTCTGGTCAACAGCGCTGCTCATATAT  
 ATGGAAAGAGACCTTATGACAAGAAGATTCTACCATCACAAAACATAGCTGTGTCCATTGCAACCTTTGGGGAAAGT  
 TTCCATAATTACCACCACACCTTCCC

*Seqüència d'aminoàcids corresponent a SLG-CR5*

VTAGSHRLWSHKTYKAKLPLQILLMVMNSLAFQNTVIDWVRDHRLLHHKYSDDADPHNASR  
 GFFYSHVWLLVRKHPDVKKRGKEIDISDIYNNPVLRFQKKYAIPFIGAVCFVLPTLIPVYGWGE  
 TWTNAWHVAMRLRYIMNLNVTFLVNSAAHIYGKRPYDKKILPSQNIASVSIATFGEGFHNYHHVFP

*Regió central SLG-CR4 (455 bp)*

GACCATAGTCACCACAAGTATGCGGAGACGGTGGCAGACCCCTCATGACATCAGGCGCGGATTTTGGTTCCGCCACGT  
 CGGTTGGCTGGTGTAACTCCCATCCGGCTGTGGAAGACCGGCGCATTGCACTAAAACCTACATGTTTCAGATCTACT  
 CGCTGATCCAGTAGTCAGGTTACAAAACAATTCTTCACTTCCATTGTTTCGCGTTGTTGAACATCGCGATACCTATCTG  
 GGTGCCATGGTACTGCTGGAACGAGACCCCTGATAAACAGTTTCGTCATCAGCTTTGTGATGAGGTTACCATCACGCT  
 GAACATCGCCTTCTGTGTCAACAGCTTCGCTCATCTTTGGGGCAATAAACCTTATGACAGGTTCTGTGAAATCGGTGGA  
 GAATAGTCTAGTAAGTTTGGCAGCTCTCGGTGAGGTTGGCACAATTACCACCACACTTACCC

*Seqüència d'aminoàcids corresponent a SLG-CR4*

DHSHHKYAETVADPHDIRRGFWFAHVWLVLTTPHVEDRRRIALKPTCSDLLADPVVRLQKQF  
 FIPLFALLNIAPIWVPWYCWNETLINSFVISFVMRFTITLNFIAFCVNSFAHLWGNKPYDRFVKSVE  
 NSLVSLAALGEGWHNYHHTY

*Regió central SLG-CR22 (564 bp)*

GGTATTACAGCTGGGGCTCATCGTTTGTGGGCCACAAATCCTATAAAAGCTAAATGGCCACTAAAAGTTATCCTGATC  
 ATTTTCAACACGGTTGCGTTCAGGATGCTGCTATGGACTGGGCACGCGACCACCGCATGCATCACAAAGTACTCGGA  
 GACTGACGCGGATCCTCACAAACGCGACCCGTGGCTTCTTCTCTCCCATATCGGCTGGCTTCTGTCAGGAAGCATCC

```
AGACCTCAAGGAAAAGGGCAAAGGACTTGACATGAGCGACTTGCTTGCTGATCCTGTACTGAGATTCCAGAAAAAGT
ACTATCTACTGCTGATGCCCTAGCTTGCTTCGTTATGCCACGATGATTCCTGTATATCTGTGGGGTGAAACCTGGAC
CAACGCCTTCTTCGTGGCTGCCATGTTCCGTTACGCATCAACCTCAACGTGACTTGGCTCGTCAACTCCGCTGTCAT
AAGTGGGGAGACAAACCTTACGACAAAAGCATCAAGCCCTCGGGGAACATGTCCGGTAGCGATGTTCCGCTCGGTG
AAGGGTTCCAATAATTATCA
```

*Seqüència d'aminoàcids corresponent a SLG-CR22*

```
GITAGAHRLWAHKSYPKAKWPLKVLIIIFNTVAFQDAAMDWARDHRMHHKYSETDADPHNAT
RGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGLDMSDLLADPVLRFQKKYLLLMPLACFVMPTMIPVYL
WGETWTNAFFVAAMFRYAFNLTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIKPSGNMNSVAMFALGEGFQ
```

**Figura 2.10** Seqüència de nucleòtids i traducció en aminoàcids de cada CR identificada. En negreta es mostren les diferents regions d'histidines.

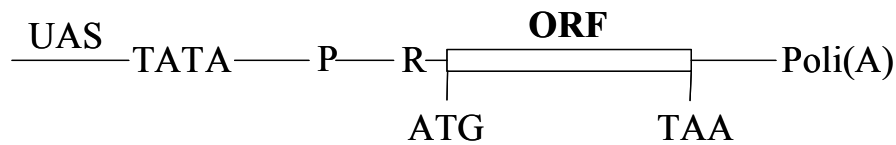
Val a dir que no tots els fragments clonats procedents de la PCR tot emprant els *primers* degenerats conduïren a seqüències vàlides i que es van haver de realitzar nombrosos experiments, no recollits en aquesta memòria, tot modificant les temperatures d'hibridació o emprant totes les parelles de *primers* degenerats possibles.

**2.3.1.3. Obtenció de les seqüències completes dels gens que codifiquen les dessaturases presents a la glàndula feromonal i al cos gras de *S. littoralis***

Un cop es disposava de les CRs dels diferents gens de dessaturasa, calia identificar la seqüència completa (FLS, *Full Length Sequence*) del gen, que consta de diferents parts diferenciades (Figura 2.11):

- L'ORF (*Open Reading Frame*), que és el fragment de DNA a dins del genoma que codifica una determinada proteïna. L'ORF consta d'un origen de transcripció (generalment un triplet o *codon* format per les bases ATG, les quals tradueixen l'aminoàcid metionina) i un final de transcripció o *stop codon* (generalment la seqüència TAA).
- Un promotor, situat just davant de l'inici de transcripció, que indica a quin punt del gen ha de començar la transcripció; cada espècie té el seu promotor i no és possible expressar un gen de planta utilitzant, per exemple, un promotor de mamífer.
- Un lloc d'unió a ribosomes, format per una petita seqüència de nucleòtids reconeguda pel ribosoma, com el punt d'unió del mRNA, situat just abans del codon ATG.
- Un origen de transcripció, integrat per una seqüència del tipus TATA, que indica on comença el gen que s'ha d'expressar.

- Una seqüència de terminació, formada per la cua de poliadenines, que evita que en el moment de la transcripció es segueixi llegint la següent proteïna.
- Un activador de l'expressió (UAS, *Upstream Activator System*), que decideix quan s'ha d'expressar la proteïna.

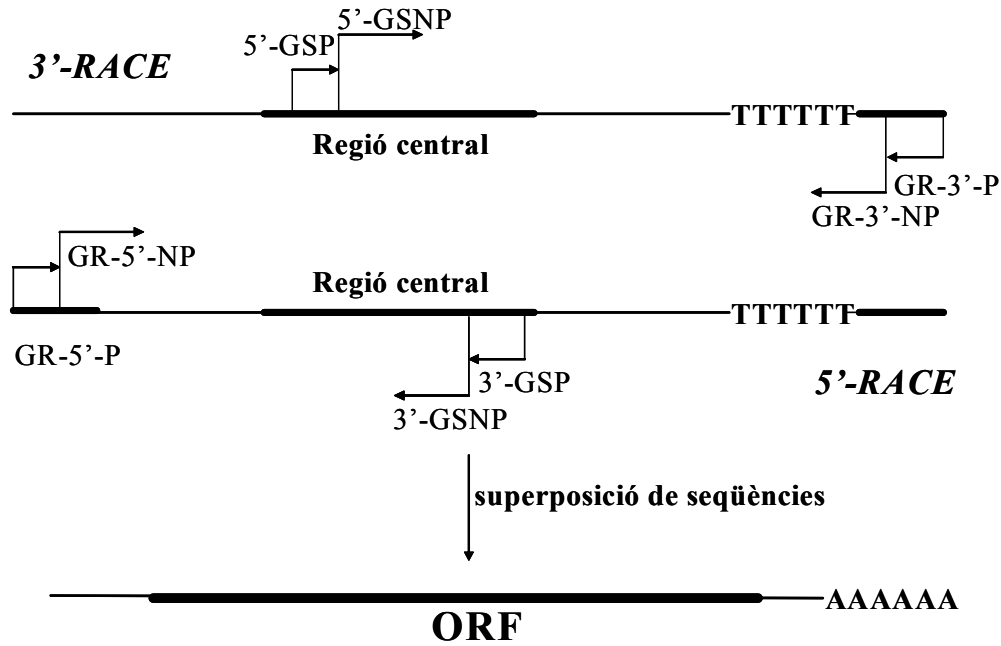


### Seqüència completa del gen

---

**Figura 2.11** Diferents parts en què està dividit un gen, en el qual està integrat l'ORF que és la seqüència que porta la informació que després es traduirà en una proteïna. P indica promotor i R el lloc d'unió del ribosoma.

Per tal d'identificar els ORFs de les 4 CRs disponibles, calia dissenyar nous primers específics per cada CR, realitzar l'amplificació per PCR tot utilitzant les dues biblioteques de cDNA i, un cop assolit un fragment adequat per a cada biblioteca, seguir els mateixos passos descrits amb anterioritat. Així es van obtenir, per a cada gen, dues seqüències, una a partir de la biblioteca 3'RACE i una altra a partir de la biblioteca 5'RACE. L'anàlisi informàtica d'ambdues seqüències va permetre identificar la seqüència completa del gen i conseqüentment, la identificació de l'ORF (Figura 2.12).



**Figura 2.12** Esquema general d'obtenció de l'ORF a partir de la CR. Mitjançant els primers GeneRacer® (GR-3'-P i GR-3'-NP per a la biblioteca de cDNA 3'RACE i GR-5'-P i GR-5'-NP per a la 5'RACE, on N indica que es tracta de *nested primers*) que hibriden amb els adaptadors situats tant a l'extrem 3' de la cadena com a l'extrem 5', adaptadors afegits en construir ambdues biblioteques de cDNA, i els primers específics dissenyats d'acord amb les seqüències obtingudes de les regions centrals (5'-GSP i 5'-GSNP per a la biblioteca 3'RACE i 3'-GSP i 3'-GSNP per a la biblioteca 5'RACE), és possible l'obtenció de les dues parts completes del gen, les quals, un cop superposades, condueixen a l'obtenció de l'ORF.

El disseny dels primers mereix especial atenció. Per a cada gen, es dissenyaren primers derivats dels GeneRacer®, capaços d'hibridar-se amb la seqüència dels adaptadors, i primers específics, dirigits a la CR. A més, per cada CR es va dissenyar una parella de *nested primers*. Quan l'eficiència de la reacció de PCR amb els primers específics és massa baixa i s'obtenen productes resultants d'hibridacions no específiques, el rendiment del producte d'interès pot incrementar-se en una segona ronda de PCR, en la que la seqüència desitjada fa de motlle. En aquesta segona PCR, s'utilitzen els *nested primers*, que s'hibridaran només a la seqüència d'interès, ja que estan dissenyats a partir de la CR, amplificant-la (Figura 2.12).

Els primers específics es van dissenyar amb el programa informàtic DNASTAR-LaserGene™, considerant que han d'ajustar-se al màxim als següents requisits:

- Han de presentar una temperatura de fusió ( $T_m$ ) elevada, ja que aquesta temperatura és directament proporcional a la temperatura d'hibridació utilitzada en la PCR. Si la  $T_m$  (i per tant la temperatura d'hibridació) és baixa, s'obtingran molts productes d'amplificació resultat d'hibridacions no específiques. La  $T_m$  està relacionada amb el contingut de G i C de l'oligonucleòtid (*primer*) d'acord amb la fórmula  $T_m=2^{\circ}\text{C}_x(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C}_x(\text{G}+\text{C})$ , d'aquí que sigui aconsellable que el contingut de G i de C estigui entre un 40-60%. A més, sempre que sigui possible, és recomanable que els *primers* tinguin  $T_m$  similars.
- Han de contenir entre 18 i 30 nucleòtids.
- S'ha d'evitar al màxim la formació de dímers entre *primers* utilitzats en la mateixa PCR (en aquest cas entre els *primers* específics i els *primers* GeneRacer<sup>®</sup>) i entre un mateix *primer*, ja que aquests dímers no es poden hibridar amb el DNA a amplificar.
- L'extrem 3' terminal ha de presentar, sempre que sigui possible, una base de G o C a fi d'evitar la formació de bucles en l'estructura del *primer*.

Considerant aquestes recomanacions, es va dissenyar una parella de *primers* específics per a cada CR. Els primers 5' (o *forward primers*) serveixen per amplificar les cadenes de DNA des de 5' a 3'. Amb els primers 3' (o *reverse primers*), s'amplifiquen les cadenes complementàries, també de 5' a 3' dels fragments escollits per a cada CR. Per tant, si el fragment escollit de la regió central inclou els nucleòtids ACTT, el *primer* 3' contindrà a la seva seqüència les bases AAGT.

D'entre els diferents *primers* específics dissenyats i assajats per a cadascuna de les 4 CRs trobades (Taula 2.2, pàgina 117), els que van donar millors resultats i van permetre identificar els corresponents ORF van ser els següents:

A partir de la SLFB: SLF-Z9-5'-1 (25 bp,  $T_m=60,2^{\circ}\text{C}$ ) i SLF-Z9-3'-1 (25 bp,  $T_m=59,5^{\circ}\text{C}$ ) per a realitzar la primera ronda de PCR i SLF-Z9-5'-2 (24 bp,  $T_m=57,4^{\circ}\text{C}$ ) i SLF-Z9-3'-2 (25 bp,  $T_m=61,0^{\circ}\text{C}$ ) com a *nested primers*.

A partir de la SLG-CR5: SLG-CR5-5'-1 (24 bp,  $T_m=60,5^{\circ}\text{C}$ ) i SLG-CR5-3'-1 (23 bp,  $T_m=53,8^{\circ}\text{C}$ ) per a la primera ronda de PCR, i SLG-CR5-5'-2 (24 bp,  $T_m=60,0^{\circ}\text{C}$ ) i SLG-CR5-3'-2 (25 bp,  $T_m=56,4^{\circ}\text{C}$ ) per a la segona ronda.

A partir de la SLG-CR4: SLG-CR4-5'-1 (25 bp,  $T_m=61,5^\circ\text{C}$ ) i SLG-CR4-3'-1 (27 bp,  $T_m=65,9^\circ\text{C}$ ) per a la primera ronda de PCR, i SLG-CR4-5'-2 (28 bp,  $T_m=60,7^\circ\text{C}$ ) i SLG-CR4-3'-2 (24 bp,  $T_m=58,0^\circ\text{C}$ ) com a *nested primers*.

A partir de la SLG-CR22: SLG-CR22-5'-1 (23 bp,  $T_m=60,4^\circ\text{C}$ ) i SLG-CR22-3'-1 (22 bp,  $T_m=57,6^\circ\text{C}$ ) per a la primera ronda de PCR, i SLG-CR22-5'-2 (30 bp,  $T_m=57,8^\circ\text{C}$ ) i SLG-CR22-3'-3 (22 bp,  $T_m=57,1^\circ\text{C}$ ) per a la segona ronda.

Combinant aquests oligonucleòtids amb els *primers* GeneRacer<sup>®</sup>, tot seleccionant una temperatura d'hibridació adient i utilitzant tant la biblioteca 5'RACE com la 3'RACE, es van realitzar les reaccions de PCR. Els DNAs obtinguts es van unir al vector PCR<sup>™</sup> 4-TOPO i es van transferir a cèl·lules competents d'*E. coli*, tot seguint la mateixa metodologia explicada en els apartats anteriors. Dels clons positius s'obtingué la suficient quantitat de DNA per a realitzar la seqüenciació.

L'anàlisi informàtica (DNASTAR Lasergene<sup>™</sup>) de les seqüències obtingudes va permetre aconseguir les seqüències completes dels gens de dessaturasa corresponents a cada CR. Aquestes seqüències completes inclouen el fragment de nucleòtids anomenats ORF (*Open Reading Frame*), el qual conté la informació necessària per traduir el gen de dessaturasa en l'enzim corresponent. Aquests ORFs es van comparar amb altres seqüències d'ORF descrites a la literatura per tal de predir la regiospecificitat de les dessaturases identificades.

- Així, a partir de la regió central de cos gras, SLFB, es va trobar un gen que abasta 1418 nucleòtids, en el qual existeix un ORF (SLF-ORF) de 1062 bp que codifica una proteïna de 354 aminoàcids. La seqüència deduïda d'aminoàcids presenta elevada homologia amb d'altres  $\Delta 9$  dessaturases d'insecte conegudes. En concret, un 92% amb *T. ni*[182], un 63% amb *O. nubilalis* i *P. octo*[183, 187] i 64% amb *A. velutinana*[185].
- Anàlogament, pel cas de la regió SLG-CR5 de glàndula, el gen trobat abasta 1470 bp, amb un ORF (SLG-ORF5) de 1017 nucleòtids que codifica una proteïna de 339 aa. Aquesta seqüència presenta una homologia gran amb altres  $\Delta 11$  dessaturases clonades fins el moment; per exemple, un 79% amb *H. zea*[184], un 68% amb *T. ni*[181], un 62% amb *A. velutinana*[185] i un 61% amb *O. nubilalis* i *E.*

*postivittana*[18, 187], mentre que l'homologia amb altres dessaturases, com la  $\Delta 9$  dessaturasa és escassa.

- Derivat de la regió central SLG-CR22, es va trobar un gen que s'expandeix en 1879 nucleòtids, amb un ORF de 1062 bp (SLG-ORF22), el qual tradueix una proteïna de 354 aa. Aquesta seqüència presenta una homologia elevada amb altres  $\Delta 9$  dessaturases, un 95% amb *H. zea*[184], un 85% amb *O. nubilalis* i *A. velutinana*[185, 187], un 63% amb *T. ni*[182], i un 62% amb la pròpia  $\Delta 9$  dessaturasa de cos gras, SLF-ORF.
- Pel que fa al gen localitzat a partir de la regió central SLG-CR4, es va trobar un fragment de 1585 nucleòtids amb un ORF (SLG-ORF4) de 1131 bp, el qual codifica una proteïna de 377 aa. Tal com es va fer notar pel cas de la regió central, aquest fragment d'ORF no evidencia una homologia molt elevada amb cap de les dessaturases clonades fins el moment. Així, l'homologia amb diferents  $\Delta 11$  dessaturases és del 39% amb *H. zea*[184], del 38% amb *T. ni*, *A. velutinana* i *O. nubilalis*[181, 185, 187] i d'un 36% amb *E. postvittana*[18]; i amb seqüències de  $\Delta 9$  dessaturases és de 47% amb *T. ni*[182], 41% amb *O. nubilalis*[187], 40% amb *H. zea*[184], 39% amb *A. velutinana* i *E. postvittana*[18, 185] i 38% amb *P. octo*[183]. Tanmateix, la seqüència terminal de l'extrem carboxílic (123 aa) presenta una homologia elevada amb seqüències parcials de cDNA corresponents als insectes *Helicoverpa assulta*, *Spodoptera frugiperda* i *Spodoptera exigua*.

Les seqüències de nucleòtids juntament amb les seqüències d'aminoàcids corresponents als ORFs de cadascuna de les dessaturases identificades es mostren a la Figura 2.13.

#### *SLF-ORF (1062 bp que codifiquen una $\Delta 9$ dessaturasa de 354 aminoàcids)*

**ATGCCTCTCAAGGGCAAACCTGGTGGCTCCTGGGTCTGTATGAAACAGATGCTGTGAACGTGGACACAGAGGCCCC**  
**GGTTATCGTACCTCCATCGGCCGAAAAAAGGGAATGGAAGATTGTATGGAGAAACGTCATCCTGATGGGATTGCTCC**  
**ACATCGGAGGAGTTTATGGAGCATACTCTTCTTACTACAGCTATGTGGCGAACGAGTTTATTGCTGTGTTCTTGTGA**  
**CATATGCTCTGGTCTGGGCATCACCGCCGTTGCGCACAGGCTATGGGCTCACAAATCATACAAAGCTCGTCTGCCACT**  
**GCGAATTCTACTTCTTCAATACTTTGGCCTTCCAAGATGCCGTAATCGACTGGGCCCGCGATCATCGGATGCA**  
**TCACAAGTACTCCGAAACCGATGCTGATCCTACAATGCGACTCGAGGCTTTTTCTTCTCCACGTCGGATGGCTGCT**  
**GGTCAGGAAACACCCGCAGATCAAGGCTAAAGGACACACTATTGACCTGAGCGATCTTAAGAATGATCCCATTCTGC**  
**GCTTCCAAAAGAAACACTATCTGATCCTTATGCCTCTGGTCTGCTTCATCCTGCCGTGCTACATCCCGACCCTGTGGG**  
**GCGAATCTCTGTGGAATGCATACTTCTGTGCTCCATCTTTCGTTACGTCTACGTATTGAACGTGACTTGGCTGGTGAA**  
**CTCCGCTGCCACCTGTGGGGCGCCAAGCCTACGATAAGAACATCAACCCGGTGGAAACCAAACCCGTCCTCCCTCG**  
**TGGTCTCGGCGAAGGATTCCACAACATATCACAACCTTTCCTTGGGACTACAAGACCACTGAACTCGGAGACTACC**  
**CCCTCAATCTACCAAATGTTTCATAGATTTTCATGGCCGCTATCGGATGGGCATATGACCTCAAGACTGTATCTTCGG**  
**ATGTTATCCAGAAACCGTGAAGAGAACCGGTGACGGTAGCCACGCGGTGTGGGGTTGGGACGACCACGAGGTACA**  
**CCAGGAGGACAAGGAATTAGCTGCAATTATTAACCCAGACAAGACTGAATAA**



*Proteïna codificada per SLF-ORF*

MPPQGQTGGSWVLYETDAVNVDTEAPVIVPPSAEKREWKIVWRNVILMGLLHIGGVY GAYLFL  
TTAMWRTSLFAVFLYICSGLGITAGAHRLWAHKSYKARLPLRILLTLFNTLAFQDAVIDWARDH  
RMHHKYSETDADPHNATRGGFFSHVGVLLVRKHPQIKAKGHTIDLSDLKNDPILRFQKKHYLIL  
MPLVCFILPCYIPTLWGESLWNA YFVCSIFRYVYVLNVTLVNSAAHLWGAKPYDKNINPVETK  
PVSLVVLGEGFHNYHHTFPWDYKTTTELGDYPLNLTCLFIDFMAAIGWAYDLKTVSSDVIQKR  
KRTGDGSHAVWGWDDHEVHQEDKELAAIINPKTEStop

*SLG-ORF5 (1017 bp que codifiquen una  $\Delta 11$  dessaturasa de 339 aminoàcids)*

ATGGCGCAATGTGTACAAAACAACGATTTTGGAAACAAAAAGAGAAAAACAGTAACCTTGTGGTACCTCAAG  
CGGGAAAGAGGAAGTTGAAATTGTGATTTTAAATATCATCACCTTCGCTTACTGGCATATAGCTGGACTATATGGCC  
TTTATTTGTGCTCACTTCAACAAAATGGGGCAGAGTTTATTCTCATTCTTCTATTCTGCTAGCAGAAAGTAGGGGT  
CACGGCTGGCTCCCACAGACTTGGTCGCATAAACTTCAAAAGCAAACACTACCTTACAAATCTGCTAATGGTGAT  
GAATTCCCTTGCATTTCAAAAACACAGTCATTGATTGGGTGAGAGACCATCGACTCCATCATAAGTATAGCGACACTGA  
TGCCGATCCCATAATGCCTCCCGAGGATTTTCTATTTCGCACGTCGGTTGGCTGCTGTGAGAAAAACACCCTGATGT  
CAAGAAACGAGGAAAGGAAATGATATATCTGATATTTCAACAATCCGGTACTGAGGTTCCAGAAGAAGTACGCA  
ATTCCTTTCATCGGGCAGTTTGTTCGTCTTACCAACATTGATACCGGTTTACGGTTGGGGAGAAAACCTGGACTAAT  
GCCTGGCACGTCGCCATGTGCGGTACATTATGAACCTTAAACGTCACCTTCCCTGGTCAACAGCGCTGCTCATATATAT  
GGAAAGAGACCTTATGACAAGAAGATCCTACCATCTCAAAACATAGCTGTGTCCATTGCAACCTTTGGGGAAGGTTT  
CCATAATTATCATCATGTATTTCCATGGGATTATCGCGCAGCTGAACCTGGAAATAACAGTTTGAATTTCCCTACGAA  
ATTTATTGATTTCTTTCGCTGGATCGGATGGGCGTATGACCTAAAGACTGTTTCGAAAGAAATGATAAAACAAAGGTC  
AAAAAGAACTGGTATGGAACCTATATGGGGGTTAGAAGATGTGGATACCCCGAGGATTTAAAAAATACAAAA  
GGCGAATAG

*Proteïna codificada per SLG-ORF5*

MAQCVQTTTILEQKEEKTVTLLVPQAGKRKFEIVYFNITFAYWHIAGLYGLYLCFTSTKWATVL  
FSFFLVVAEVGVTAGSHRLWSHKTYKAKLPLQILLMVMNSLAFQNTVIDWVRDHRLHHKYS  
DTDADPHNASRGGFFYSHVGVLLVRKHPDVKKRGKEIDISDIYNNPVLRQKKYAIPFIGAVCFVL  
PTLIPVYVWGETWTNAWHVAMLRIMNLTFLVNSAAHIYGKRPYDKKILPSQNIASVIATFG  
EGFHNYHHVFPWDYRAAELGNNSLNFPTKFIDFFAWIGWAYDLKTVSKEMIKQRSKRTGDGTN  
LWGLEDDVTPEDLKNKTKGSEStop

*SLG-ORF4 (1131 bp que codifiquen una dessaturasa de 377 aminoàcids)*

ATGGCTCCAGCGCAAAAACACGTCCAAATGTGTGGCGAAGAGATTCAATCAGGACTGAAAATCAGTCCTATCACATA  
CGATGCTGACAAATTAACGAAGCTCCACAGTACGAAAAACAATAATACAGTGTGAGGAACAGTGCTAATGATAAA  
GTGAATAGTGAAGCAGACTTTGACATTAATAAATATGAAGCTATAGATTTAAGGCAAAAATTAGTAGGCCGGATCT  
AACCGTGCAAAATACTTTTGCATTTAGTATCAATCTACGGATTGTACCTGACGATTAGTAACCAAGTGAAGATATTAAC  
TTTATTGTTTGGCTTTAGGCACGATATACAGTCCGGGTTTGGAAATCACCGCGGGCGTTCATAGGCTGTGGTCACCCG  
AGCGTACAGAGCGGATTACCACTGCGGATAATACTAGCGTTGCTGTTACTGTTACTGGACAGCGTGATATATACAC  
ATGGGCGTTGGACACAGAGTGCACCACAAGTATGCGGAGACGGTGGCAGACCCTCATGACATCAGGCGCGGATTTT  
GGTTCGCCACGTGCGGTTGGCTGGTAACTCCCATCTGGGTGAGGAAAGACCGCGCATTGCACTAAAACCTACAT  
GTTCCAGATCTACTCGCTGATCCAGTAGTCAGGTTACAAAAACAATTCTTCATTCCATTGTTTCGCTGTTGAAACATCGC  
GATACCTATCTGGGTGCCATGGTACTGCTGGAACGAGACCCTGATAAACAAGTTTCGTCATCAGCTTTGTGATGAGGTT  
CACCATCAGCTGAACATCGCCTTCTGTGTCAACAGCTTCGCTCATCTTTGGGGCAATAAACCTTATGACAGGTTTCGT  
GAAATCGGTGAGAAATAGTCTAGTAAAGTTTGGCAGCTTGGGTGAGGTTGGCACAACCTACCACCTGCTTTCCCTG  
GGACTACAGGACCTCGGAGTTGGGCAAACTGAACATTCCACAGGGTTTCATTGACTTCTCGCCAAGATTGGATGGG  
CTTATGATTTAAAAGCTGCTACAACCGATATGATATCAAAACAGGGCTAAACGATGTGGAGACGGAACCTTTGGAGAG  
TCCGAAGAGCCATACCAACTTCAGAAAAATGTCACGCCGAATGA

*Proteïna codificada per SLG-ORF4*

MAPAQKHVQMCGEIISGLKISPITYDADKLNEAPQYENNTVLRNSANDKVNSEADFDINKYE  
AIDFKAKIRWPDLTQILLHLVSIYGLYLTISNQVKILTLLFALGTIYTSFGGITAGVHRLWSHRA  
YRARLPLRILLALLFTVTGQRDIYTWALDHRVHHKYAETVADPHDIRRGFWFAHVGWLVLPHP  
AVEDRRIALKPTCSDLLADPVVRLQKQFFIPLFALLNIAPIWVPWYCWNETLINSFVIFVMRFTI  
TLNIAFCVNSFAHLWGNKPYDRFVKSVENSLVSLAALGEGWHNYHHVFPWDYRTSELGKLNIS  
TGFIDFFAKIGWAYDLKAATDMISNRAKRCGDGTFGESEEPYPTSEKCHAEStop

*SLG-ORF22 (1062 bp que codifiquen una  $\Delta 9$  dessaturasa de 354 aminoàcids)*

ATGGCTCCAAATATATCGGAGGACGTGAATGGAGTGCTCTTTGAGAGCGATGCGGCTACTCCGGACTTGGCGCTGGC  
CAGACCTCCAGTCCAAAAAGCTGACAACAAACCAAGCAACTGGTGTGGAGGAATATCATATTGTTTGTCTATCTTC  
ACTTAGCAGCTCTGTATGGTGGTTACCTGTCTCTCTCTGCAAAGTGGCAAAACAGACATTTTGCCTACATCTTGTA  
TGTGATATCGGGACTGGGGATCACGGCTGGAGCACATCGTTTGTGGGCCCAAAATCTATAAAGCTAAATGGCCAC

TAAAAGTTATCCTGATCATTTTCAACACGGTTGCGTTCCAGGATGCTGCTATGGACTGGGCACGCGACCACCGCATGC  
 ATCACAAGTACTCGGAGACTGACGCCGATCCTCACAACGCGACCCGTGGCTTCTTCTTCTCCCATATCGGCTGGCTTC  
 TCGTCAGGAAGCATCCAGACCTCAAGGAAAAGGGCAAAGGACTTGACATGAGCGACTTGCTTGGTACTGATCCTGTACTG  
 AGATTCCAGAAAAAGTACTATCTACTGCTGATGCCCTAGCTTGCTTCGTTATGCCACGATGATTCTGTATATCTGT  
 GGGGTGAAACCTGGACCAACGCCTTCTTCGTGGCTGCCATGTTCCGTTACGCATTCAACCTCAACGTGACTTGGCTCG  
 TCAACTCCGCTGCTCATAAGTGGGGAGACAAAACCTTACGACAAAAGCATCAAGCCCTCGGAGAACATGTCGGTAGCG  
 ATGTTCCGCTCGGTGAAGGTTCCACAACCTACCACACACCTTCCCCTGGGACTACAAAACCTGTAACCTCGGTAAC  
 AACAAAACCTGAATTTACCACAGCGTTTATTAATTTCTTTGCTAAAATCGGCTGGGCTACGACATGAAAACCTGTATCT  
 GAGGACATTGTCAAGAACAGGGTAAAGCGCACTGGAGATGGCTCACATCATCTGTGGGGCTGGGGTGACGAGAACC  
 AACCCAAAGAAGAAATTGAGGCTGCTACTAGGATTAACCCTAAGGATGATTA

*Proteïna codificada per SLG-ORF22*

MAPNISEDVNGVLFESDAATPDLALARPPVQKADNPKQLVWRNIILFAYLHLAALYGGYFLF  
 SAKWQTDIFAYILYVISGLGITAGAHRLWAHKSYPKAKWPLKVLIIIFNTVAFQDAAMDWARDH  
 RMHHKYSETDADPHNATRGFFFSHIGWLLVRKHPDLKEKGKGLDMSDLLADPVLRFQKKYYL  
 LLMPLACFVMPMTMIPVYLWGETWTNAFFVAAMFRYAFNLNVTWLVNSAAHKWGDKPYDKSIK  
 PSENMSVAMFALGEGFHNYHHTFPWDYKTAELGNNKLNFTTAFINFFAKIGWAYDMKTVSEDI  
 VKNRVKRTGDGSHHLWGWGDENQPKKEIEAATRINPKDDStop

**Figura 2.13** Seqüències de nucleòtids dels ORFs identificats per clonatge de les diferents CRs de dessaturasa de *S. littoralis*. En negreta s'indiquen el codó (ATG) i els *stop codon* (TAA, TAG i TGA). També es mostren les seqüències d'aminoàcids producte de la traducció d'aquestes ORFs, tot senyalant en negreta la metionina (M) inicial i els 3 dominis d'histidina.

El següent pas consistia en la transformació de cèl.lules de llevat amb cada ORF per tal de realitzar l'assaig funcional; abans, però, calia amplificar els ORFs disponibles.

Com que ja es coneixien les seqüències dels gens precursors de les proteïnes d'interès, només calia disposar de dos *primers* diferents per a cada gen, un per amplificar en sentit 5'→3' (*primer 5'*) i l'altre per amplificar la cadena complementària (*primer 3'*, de seqüència complementària).

A més, a l'inici de cada oligonucleòtid s'afegiren dianes de restricció, que serien necessàries en la fase d'unió al vector. Concretament, s'escolliren els enzims *XbaI* i *SacI*, que presenten una seqüència de tall 5'-TCTAGA-3' i 5'-GAGCTC-3', respectivament.

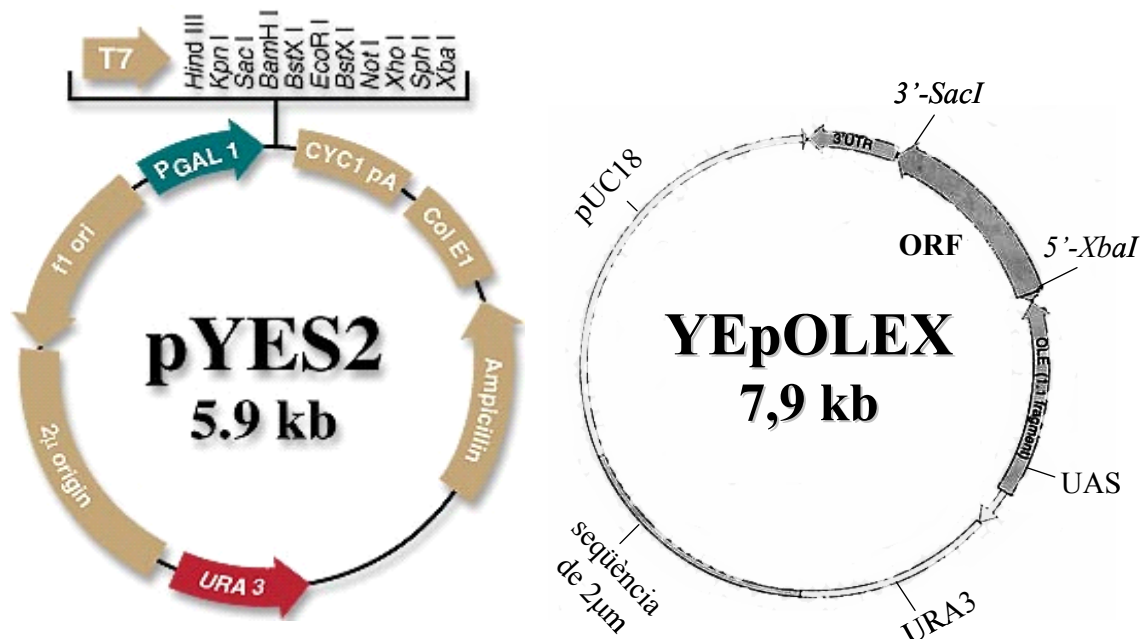
De tots els *primers* provats per amplificar cada ORF, els que van oferir millors resultats (Taula 2.2, pàgina 117) foren:

- A partir de SLF-ORF, la parella SLF-5'-ORF-4 (30 bp,  $T_m=57,3^\circ\text{C}$ , el qual inclou una seqüència de restricció per a l'enzim *XbaI*, ) i SLF-3'-ORF-2 (31 bp,  $T_m=63,2^\circ\text{C}$ , amb una seqüència de restricció per l'enzim *SacI*).
- A partir de SLG-ORF5, la parella SLG-5'-ORF5 (29 bp,  $T_m=66,7^\circ\text{C}$ , amb una seqüència de reconeixement per a l'enzim *SacI*) i SLG-3'-ORF5 (30 bp,  $T_m=61,3^\circ\text{C}$ , amb una seqüència per l'enzim *XbaI*).

- A partir de SLG-ORF4, les parelles: SLG-5'-ORF4-1 (31 bp,  $T_m=66,4^\circ\text{C}$ , amb una seqüència de reconeixement per a l'enzim *XbaI*) i SLG-3'-ORF4-1 (26 bp,  $T_m=65,8^\circ\text{C}$ , amb una seqüència per a l'enzim *SacI*); i SLG-5'-ORF4-3 (33 bp,  $T_m=68,7^\circ\text{C}$ , amb una seqüència de reconeixement per a l'enzim *SacI*) i SLG-3'-ORF4-2 (26 bp,  $T_m=61,8^\circ\text{C}$ , amb una seqüència per a l'enzim *XbaI*).
- A partir de SLG-ORF22, la parella SLG-5'-ORF22 (32 bp,  $T_m=61,1^\circ\text{C}$ , amb una seqüència de reconeixement per a l'enzim *XbaI*) i SLG-3'-ORF22 (34 bp,  $T_m=61,7^\circ\text{C}$ , amb una seqüència per a l'enzim *SacI*).

Les reaccions de PCR conduïren a la obtenció d'un únic fragment, per a cadascuna de les seqüències amplificades, que presentava la grandària esperada per a cada ORF (al voltant d'1,1 kb). Aquests fragments es purificaren (*QIAquick PCR Purification Kit Protocol*, Qiagen) i es digeriren de forma seqüencial amb cadascun dels enzims de restricció escollits (*SacI* i *XbaI*), tot purificant cada cru de reacció immediatament abans de realitzar la segona digestió (*MiniElute Reaction Cleanup Kit Protocol*, Qiagen). Un cop digerits i purificats, els fragments de DNA corresponents als diferents ORF que codifiquen les dessaturases s'uniren a un vector per tal de transformar cèl·lules d'*E. coli*, tal com es detalla a la part experimental.

Els vectors escollits en aquesta fase foren els plasmidis pYES2, de 5,9 kb i el YEpOLEX, de 7,9 kb [181, 182], (Figura 2.14). Ambdós plasmidis presenten les característiques següents:



**Figura 2.14** Mapa genòmic dels plasmidis pYES2 i YEpOLEX.

- Permeten transformar tant cèl·lules de bacteri com de llevat (*shuttle vectors*) i poden replicar-se sense cap problema ja que la seva seqüència de nucleòtids inclou fragments tant de llevat (fragment 2 µm) com de bacteri (fragments pUC18 a YEpOLEX i Col E1 a pYES2).
- Presenten el gen URA3, que codifica la molècula d'uracil, com a marcador per a la selecció dels clons positius. Amb aquests vectors, caldrà emprar mutants auxotròfics d'uracil com a cèl·lules hoste, que presentin un gen URA3 no funcional i necessitin uracil exogen per poder créixer i replicar-se. Per tant, només les cèl·lules transformades, que portaran el gen URA3 funcional, podran colonitzar en un medi sense uracil.
- Inclouen un marcador de resistència a l'ampicil·lina (no mostrat en el cas del vector YEpOLEX).
- Presenten expressió controlada per promotors. El vector pYES2 porta el gen P<sub>GAL1</sub>, el qual permet la traducció del gen en presència de galactosa, mentre que l'expressió està reprimida en presència de glucosa. En el cas del vector YEpOLEX, l'expressió està controlada pel gen *OLE1*, el qual codifica la proteïna en absència d'àcids grassos insaturats, que inhibeixen l'expressió si s'afegeixen al medi [25, 178].

- Presenten diferents dianes de restricció entre les quals es troben els enzims *XbaI* i *SacI*.

Donat que els fragments de DNA corresponents als diferents ORFs d'interès presenten dianes de restricció *SacI* i *XbaI*, la unió als vectors requeria una primera etapa de digestió dels plasmidis amb cadascun d'aquets enzims. El vector linearitzat es purificà i s'uní, tot emprant la ligasa T4, a cadascun dels fragments de DNA amplificats, també digerits amb els enzims anteriors.

Atenent a la posició de les dianes de restricció, els fragments amplificats amb els primers SLG-5'-ORF5 i SLG-3'-ORF5 pel cas de l'ORF5 i SLG-5'-ORF4-3 i SLG-3'-ORF4-2 pel cas de l'ORF4 van ser clonats tot utilitzant el vector pYES2, mentre que els fragments obtinguts amb els altres primers es van clonar tot emprant el vector YEpOLEX.

Prèviament a la transformació de llevat per tal de realitzar l'assaig funcional, que sol ser poc eficient, calia obtenir quantitats suficients de DNA. Aprofitant la capacitat dels vectors emprats de replicar-se tant en bacteri com en llevat, es transformaren cèl·lules d'*E. coli*, les quals presenten una capacitat de creixement molt més elevada que les cèl·lules de *S. cerevisiae* i permeten obtenir quantitats elevades de DNA. La transformació es va fer tot seguint el procediment habitual.

Donat que tant en la reacció de PCR com en l'amplificació dels plasmidis en *E. coli* es poden produir mutacions, es procedí a analitzar les seqüències dels plasmidis d'uns 10 clons per cada gen, mitjançant PCR colonial, purificació del DNA i seqüenciació. Després de l'estudi de les seqüències, s'escolliren els clons més fidels a la seqüència original de cada ORF per tal de realitzar la transformació de cèl·lules competents de *S. cerevisiae*.

Les cèl·lules d'*E. coli*, tal com es va explicar a la introducció del Capítol 1, no presenten citocrom  $b_5$  ni citocrom  $b_5$  reductasa i, per tant, encara que s'expressessin els gens que codifiquen les dessaturases, aquestes no serien funcionals. És per això que l'expressió es realitza en cèl·lules de *S. cerevisiae*, ja que aquest organisme eucariota sí que presenta tots els components de la cadena de transport electrònic necessaris per la dessaturació<sup>[194]</sup>. De fet, la  $\Delta 9$  dessaturasa de llevat és una proteïna modular que conté un domini del tipus citocrom  $b_5$  al seu extrem carboxílic.

A banda d'aquest requeriment, la transformació de llevat en comptes d'*E. coli* presenta els següents avantatges[188, 189]:

- Donat que l'*E. coli* és un organisme procariota, pot succeir que el gen clonat contingui seqüències que actuïn com a *stop codon* en aquest bacteri, produint una proteïna no funcional. A més, el significat dels diferents codons pot canviar d'un organisme a un altre.
- Les proteïnes recombinants poden ser degradades per l' *E. coli* si aquesta no les reconeix com a pròpies. Encara més, aquestes proteïnes poden tenir efectes tòxics sobre el bacteri, provocant-ne la mort.
- Els processos de modificacions post-traducció no són idèntics en organismes procariotes que en eucariotes.
- L'expressió de proteïnes de més de 100 aminoàcids és difícil en bacteri, però no així en *S. cerevisiae*.

Ara bé, la producció de DNA en llevat és molt més baixa que en bacteri, alhora que l'eficiència de la transformació és considerablement menor.

### **2.3.2. Assaigs funcionals**

Un cop s'han transformat cèl·lules de llevat, la darrera etapa va consistir en l'expressió del gen que codifica la proteïna d'interès. Donat que no és possible aïllar aquests enzims ja que, tal com s'ha comentat en apartats precedents, es tracta de proteïnes lligades a la membrana del reticle endoplasmàtic, força hidrofòbiques i que per tant perden la seva funció quan s'intenta la seva purificació, l'única manera de saber si s'ha aconseguit clonar i expressar el cDNA que codifica aquests enzims, és mitjançant l'anàlisi de les transformacions realitzades per aquestes dessaturases recombinants sobre un substrat adequat.

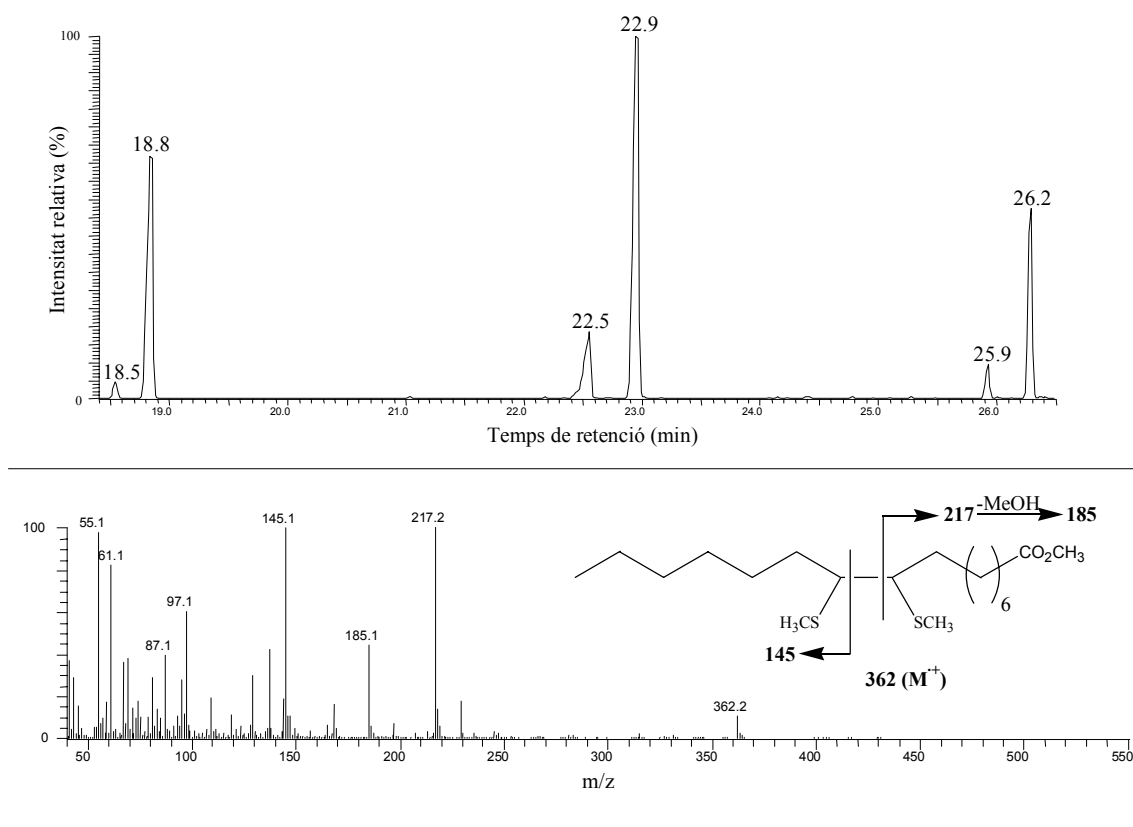
En aquest cas particular, per tal de confirmar que els gens clonats corresponen a dessaturases i determinar la regioselectivitat es van conduir assaigs funcionals, consistents en determinar l'estructura dels àcids grassos insaturats que es formen a partir de diferents substrats que s'afegeixen al medi de cultiu. L'anàlisi estructural es va realitzar per CG-EM.

### 2.3.2.1. Assaig funcional dels gens *SLG-ORF22* i *SLF-ORF*

En aquests assaigs s'emprà la soca mutant de *S. cerevisiae* L8-14C, deficient en el gen *OLE1*, responsable de la formació dels àcids oleic i palmitoleic[25, 178]. Com que els àcids grassos monoinsaturats són essencials pel creixement del llevat, aquests mutants esdevenen auxòtrofs pels àcids grassos insaturats i només els mutants transformats que portin i expressin els gens de dessaturasa seran capaços de créixer en absència dels àcids oleic i palmitoleic. Les cèl·lules es transformaren amb els plasmidis constitutius YEpOLEX portadors dels fragments de DNA SLF-ORF i SLG-ORF22 i es van fer créixer en medi YPD-agar, en absència d'àcids grassos monoinsaturats. Ambdós mutants generaren colònies, tot indicant que amb els dos plasmidis s'havia rescatat la funció dessaturasa. A continuació, les cèl·lules s'inocularen en un medi de cultiu YPD líquid, es van fer créixer a 30°C durant 24 h, s'extregueren els lípids, es metanolitzaren i els extractes s'analitzaren per CG-EM.

Les anàlisis van demostrar que el SLF-ORF traduïa una dessaturasa capaç de sintetitzar els àcids palmitoleic i oleic en una proporció 3:2 (Figura 2.15). Les mateixes anàlisis van evidenciar que el SLG-ORF22 proporcionava una dessaturasa que conduïa als mateixos àcids en una proporció 7:3. La localització exacte de la posició del doble enllaç va ser confirmada per les anàlisis dels espectres de masses dels adductes formats amb disulfur de dimetil (DMDS)[195-200], els quals exhibien un fragment a  $m/z$  217 característic dels dobles enllaços situats en els carbonis 9-10. La geometria *Z* de cada àcid va ser confirmada per comparació dels temps de retenció en CG de mostres estàndards.

En un altre bloc d'experiments, les cèl·lules transformades es van fer créixer en presència d'àcid mirístic. Quan es fan créixer els mutants en presència d'aquest àcid gras, apareix un nou producte corresponent a l'àcid (*Z*)-9-tetradecenoic. La posició del doble enllaç va ser determinada novament mitjançant la formació d'adductes amb (DMDS) i posterior anàlisi per CG-EM. (Figura 2.15). La relació entre aquest àcid i el palmitoleic i oleic va ser de 1:7:2, respectivament, tant en el llevat transformat amb el SLF-ORF com en el transformat amb el SLG-ORF22.

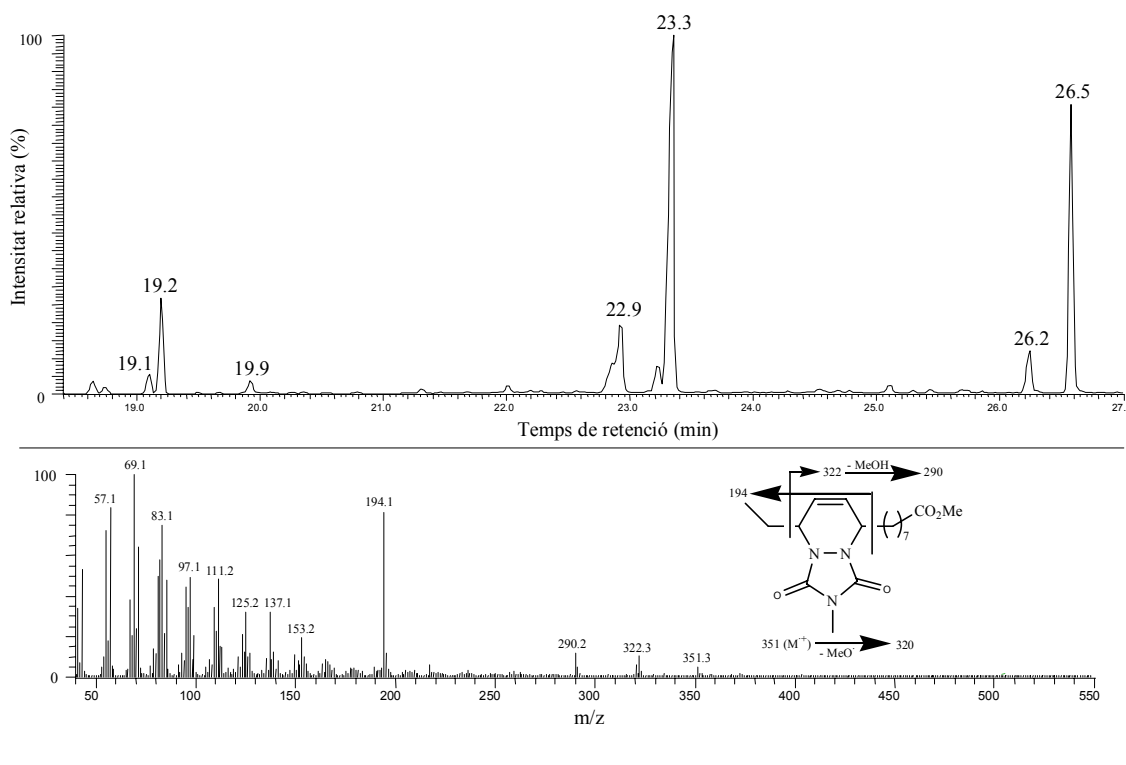


**Figura 2.15** Cromatograma de CG-EM corresponent a un extracte lipídic metanolitzat de cèl·lules mutants de *S. cerevisiae* transformades amb el plasmidi YEpOLEX unit al gen SLF-ORF i incubades en presència d'àcid mirístic. Els productes presenten els següents temps de de retenció: àcid (*Z*)-9-miristoleic, 18,5 min; àcid mirístic, 18,8 min; àcid (*Z*)-9-palmitoleic, 22,5 min; àcid palmític, 22,9 min; àcid (*Z*)-9-oleic, 25,9 min; i àcid esteàric, 26,2 min. Pel cas del llevat transformat amb el fragment SLG-ORF22, el perfil cromatogràfic és idèntic a aquest, tot modificant-se la relació entre les olefines, tal com es mostra al text. A la part inferior es mostra, a mode d'exemple, l'espectre de masses de l'adducte de l'àcid palmitoleic amb el DMDS on s'observen els fragments característics ( $m/z$  362, 217, 185 i 145).

També es van fer créixer ambdós tipus de cèl·lules recombinants en presència de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic (**132**) i (*Z*)-11-tetradecenoic (**121**) per tal de comprovar si aquesta  $\Delta 9$  dessaturasa era també la responsable de la formació dels diens conjugats presents a la glàndula feromonal (els àcids (*Z,E*)-9,11 i (*E,E*)-10,12-tetradecadienics). En el cas d'utilitzar l'àcid **132**, va aparèixer un nou producte no present als controls el qual, segons les anàlisis de les mostres derivatitzades amb 4-metil-1,2,4-triazolin-2,5-diona (MTAD)[41, 201], corresponia a l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic. L'adducte va exhibir ions majoritaris a  $m/z$  351, 196, i 322, indicatius de l'existència d'un sistema conjugat als carbonis 9,11 en un èster metílic de 14 carbonis (Figura 2.16). El temps de



retenció en els cromatogrames de gasos coincidia amb el d'una mostra patró. Quan l'àcid **132** va ser afegit al medi de cultiu, la relació entre els àcids palmitoleic, oleic i (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic va ser de 2:2:1, respectivament, en el cas del llevat que conté el gen SLF-ORF i de 6:3:1, respectivament, en el cas del llevat amb el gen SLG-ORF22. Contràriament, si s'utilitzava l'àcid **121**, de configuració *Z*, no s'obtenia cap diè. Semblava doncs, que la dessaturasa present a la glàndula (SLG-ORF22) no produïa el diè minoritari, l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic.



**Figura 2.16** Cromatograma de CG-EM corresponent a un extracte lipídic metanolitzat de cèl.lules mutants de *S. cerevisiae* transformades amb el plasmidi YEpOLEX unit al gen SLG-ORF22 i incubades en presència de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic. Els productes presenten els següents temps de retenció: àcid (*E*)-11-tetradecenoic, 19,1 min; àcid mirístic, 19,2 min; àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic, 19,9 min; àcid palmitoleic, 22,9 min; àcid palmític, 23,3 min; àcid oleic, 26,2 min; i àcid esteàric, 26,5 min. Com es pot observar, no s'aprecia la formació de l'àcid (*Z*)-9-miristoleic, el qual hauria d'aparèixer a un temps de retenció de 18,9 min. Pel cas del llevat transformat amb el fragment SLF-ORF, el perfil cromatogràfic és idèntic a aquest, tot modificant-se la relació entre les olefines, tal com es mostra al text. A la part inferior es mostra, a mode d'exemple, l'espectre de masses de l'adducte format entre l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic i el MTAD (tant en glàndula com en cos gras), tot exhibint els ions més destacats en la fragmentació d'aquest adducte de Diels-Alder (*m/z* 351, 322, 290 i 194).

Quan es van fer créixer cadascun dels mutants en presència d'una mescla d'àcid mirístic i de **132**, no es va poder detectar la presència de l'àcid (*Z*)-9-tetradecenoic en

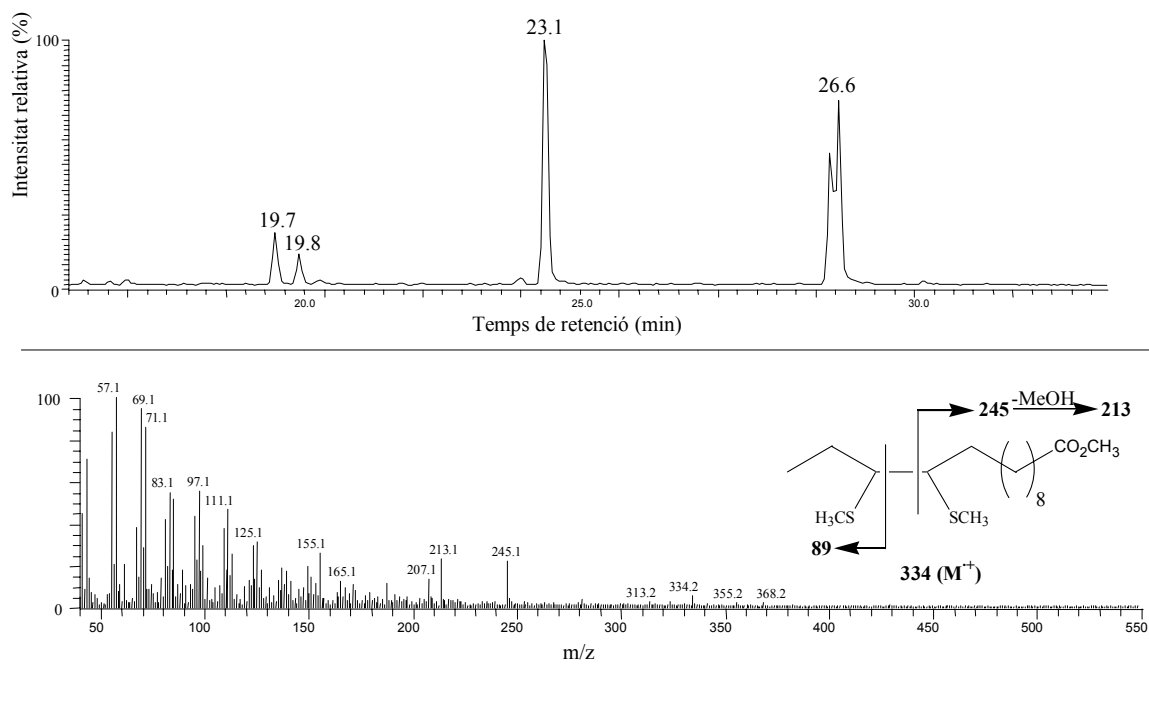
els extractes metanolitzats de cada llevat, tal com es pot apreciar a la Figura 2.16. En canvi, l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic sí que es va seguir formant. El mateix resultat es va obtenir tot utilitzant l'àcid **121**, de configuració *Z*, tot i que en aquest cas no es va formar cap estructura diènica.

Finalment, en tots els cassos es detectà la formació d'àcids insaturats de 16 i 18 àtoms de carboni fruit de l'allargament de les cadenes de 14 carboni per l'activitat de l'enzim elongasa 1[202].

### 2.3.2.2. Assaig funcional del gen *SLG-ORF5*

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'expressió en el vector pYES2 està sota el control del gen  $P_{GAL1}$ . Així, les cèl·lules de *S. cerevisiae* pertanyents a la soca L8-14C (deficients en el gen *OLE1*) transformades amb aquest vector unit al gen *SLG-ORF5* es van fer créixer en plaques amb medi selectiu SD-agar en absència d'uracil i en presència d'un 2% de glucosa. A més, donat que la glucosa reprimeix l'expressió de les dessaturases, era necessària l'addició d'àcids grassos insaturats (solució 0,5 mM d'àcids oleic i palmitoleic) per tal d'assegurar el creixement de les colònies. Per tal de solubilitzar aquests àcids grassos orgànics en un medi aquós com és el SD, s'addicionà una solució 1% de tergitol, que actua de tensioactiu. Posteriorment, les cèl·lules s'inocularen en medi líquid SD-glucosa-tergitol en presència d'àcids oleic i palmitoleic (0,5 mM) i es deixaren en creixement a 30°C durant 48 h. Transcorregut aquest temps, les cèl·lules es rentaren i es transferiren a 30 mL de medi líquid SD-tergitol en presència de galactosa, per tal d'activar l'expressió, i d'àcid mirístic (0,5 mM) i es van fer créixer durant 72 h a 26°C. Finalment, s'extregueren els lípids i els extractes metanolitzats s'analitzaren per CG-EM.

Les anàlisis dels èsters metílics procedents dels extractes lipídics del llevat, van revelar que *SLG-ORF5* codificava una dessaturasa capaç de transformar l'àcid esteàric en l'àcid (*Z*)-11-octadecenoic, l'àcid palmític en l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic i l'àcid mirístic en una mescla dels àcids (*E*)-11 i (*Z*)-11-tetradecenoics (proporció 3:2), en una relació global 31:53:10:6, respectivament (Figura 2.17).



**Figura 2.17** Cromatograma de CG-EM corresponent a un extracte lipídic metanolitzat i derivatitzat amb DMDS de cèl·lules mutants de *S. cerevisiae* transformades amb el plasmidi pYES2 unit al gen SLG-ORF5 i incubades en presència de l'àcid mirístic. Els temps de retenció mostrats pertanyen als adductes de DMDS amb cadascun dels àcids i són: pels àcids (*E*)-11 i (*Z*)-11-tetradecenoics, 19,7 i 19,8 min, respectivament; àcid (*Z*)-11-hexadecenoic a 23,1 min; i l'àcid (*Z*)-11-octadecenoic a 26,6 min. L'espectre de masses mostra els ions corresponents a la fragmentació de l'adducte dels àcids 11-tetradecenoics amb DMDS ( $m/z$  334, 245, 213 i 89).

L'allargament de la cadena dels àcid (*Z*) i (*E*)-11-tetradecenoics deguda a l'acció de l'enzim elongasa 1 va produir els àcid (*Z*) i (*E*)-13-hexadecenoics.

La regioespecificitat de la  $\Delta 11$  dessaturasa codificada pel gen SLG-ORF5 va ser confirmada per les anàlisis dels adductes de DMDS per CG-EM, mentre que la geometria del doble enllaç ho va ser per comparació amb els temps de retenció en CG de mostres sintètiques pures.

### 2.3.2.3. Assaig funcional del gen SLG-ORF4

En el cas del fragment de gen corresponent a SLG-ORF4, es van realitzar les transformacions tot utilitzant els dos tipus de vector.

En el cas d'emprar el vector YEpOLEX, es van transformar cèl·lules de *S. cerevisiae* pertanyents a la soca L8-14C de forma anàloga a la transformació amb SLG-ORF22 i SLF-ORF. En aquest cas, les cèl·lules transformades no van ser capaces de créixer en

plaques de YPD, a menys que s'addicionessin àcids grassos insaturats (oleic i palmitoleic). Seguidament, les colònies van ser inoculades en medi líquid YPD amb un 1% de tergitol, en presència d'una sèrie d'àcids (de concentració final 0,5 mM), com l'àcid (Z)-11-tetradecenoic (**121**), (E)-11-tetradecenoic (**132**), i (Z)-9-tetradecenoic, tots tres conjuntament amb l'àcid (Z)-11-octadecenoic. Després de 19 h d'incubació a 30°C, les cèl·lules van ser recollides, els lípids van ser extrets i els extractes hexànics que contenen els èsters metàlics dels àcids van ser analitzats per CG-EM, juntament amb els corresponents adductes amb DMDS i MTAD.

Tot utilitzant el vector pYES2, es van transformar dues soques diferents de llevat; una del tipus L8-14C (sense el gen *OLE1*) i una altra del tipus  $\Delta$ Elo1, a la qual se li ha suprimit el gen responsable de l'allargament de les cadenes alifàtiques, el gen *Elo1*[202]. Un cop es disposava de suficients colònies, s'inoculà en medi líquid SD-glucosa en presència d'una solució d'àcid oleic i palmitoleic 0,5 mM i un 1% de tergitol i es van fer créixer durant 48 h a 30°C. Les cèl·lules es van rentar i es transferiren a 30 mL de medi líquid SD-galactosa amb un 1% de tergitol i en presència, per separat, d'una sèrie d'àcids grassos insaturats (solucions 0,5 mM), com l'àcid (Z)-9-tetradecenoic, (Z)-11-tetradecenoic (**121**), (E)-11-tetradecenoic (**132**) i (Z)-9-octadecenoic, durant 72 h a 26°C. Un cop extrets els lípids, els extractes hexànics, juntament amb els corresponents adductes amb DMDS i MTAD, s'analitzaren per CG-EM.

En cap dels experiments realitzats, tant amb el vector YEpOLEX com amb el pYES2, va ser possible detectar l'aparició d'alguns nous productes de dessaturació. Sí que es van poder detectar els productes d'allargament de la cadena hidrocarbonada per mitjà de l'enzim elongasa 1. Aquests productes no van aparèixer en el cas d'utilitzar una soca de llevat  $\Delta$ Elo1.

Tampoc el fet de variar la temperatura d'inducció, a la qual es feien créixer els llevats, va resultar satisfactori. Les temperatures escollides van ser 18°C, 24°C i 30°C, a més des 26°C, que és la temperatura d'inducció habitual amb aquest tipus de vector.

## 2.4. DISCUSSIÓ

Com ja s'ha comentat al llarg d'aquesta memòria, les dessaturases es poden dividir en dos grups, tot atenent a la seva topologia. Aquesta divisió comprèn les dessaturases solubles i les dessaturases integrades a la membrana del reticle endoplasmàtic[6]. La seqüència d'aminoàcids en relació amb les diferents regioselectivitats de les dessaturases ha pogut ser investigada en els enzims solubles de plantes, degut a la seva fàcil purificació i estabilitat. Així, s'ha pogut determinar l'estructura de la dessaturasa de llavors de garrofer mitjançant cristal·lografia de raigs X[7]. Tanmateix, pel cas de les dessaturases de membrana, degut a la seva poca estabilitat i a la dificultat en la seva purificació, la informació trobada només es sustenta en evidències indirectes, mitjançant assaigs bioquímics amb diferents substrats no naturals[28, 45, 83, 203].

L'evolució de les dessaturases de membrana en les glàndules feromonal d'arnes per tal de biosintetitzar components feromonal específics ha generat diversos enzims amb diferents regio i estereoespecificitats. El coneixement d'aquestes dessaturases a nivell tant de proteïna com genètic és enormement important a l'hora de definir els aminoàcids implicats en les diferents especificitats, ja que poden després ser modificats tot introduint mutacions controlades. És en aquest terreny on juga un paper decisiu la biologia molecular, amb la tècnica del clonatge com a principal argument. En aquest sentit, s'han caracteritzat diferents dessaturases de membrana, com la  $\Delta 9$ [18, 182-185], la  $\Delta 11$ [18, 181, 184-186],  $\Delta 10$ [183] i la  $\Delta 14$ [187].

En el nostre cas, es va plantejar el clonatge i expressió funcional de les dessaturases que intervenen en la biosíntesi de la feromona sexual de *S. littoralis*, i que condueixen a la formació dels àcids (*Z*)-11-hexadecenoic, i (*Z*) i (*E*)-11-tetradecenoics a partir dels àcids palmític i mirístic, respectivament, i dels àcids (*Z,E*)-9,11- i (*E,E*)-10,12-tetradecadienoics a partir dels àcids (*E*)-11- i (*Z*)-11-tetradecenoic, respectivament (vegeu Figura 1.8, pàgina 18). El clonatge d'aquests enzims hauria de revelar el nombre de dessaturases implicades en la biosíntesi de tots aquest intermedis biosintètics de la feromona sexual d'aquest insecte plaga.

L'expressió del gen que codifica la  $\Delta 11$  dessaturasa (SLG-ORF5) en *S. cerevisiae* va permetre obtenir, a partir de l'àcid mirístic, la mescla dels dos isòmers geomètrics, els àcids (*E*) i (*Z*)-11-tetradecenoics en una proporció 3:2. A més, també es van obtenir els àcids (*Z*)-11-hexadecenoic i (*Z*)-11-octadecenoic a partir dels àcids palmític i esteàric, respectivament, però no es detectaren els corresponents isòmers (*E*) en cap cas. Aquest

resultat està d'acord amb la hipòtesi formulada en treballs anteriors en els quals es proposava una única  $\Delta 11$  dessaturasa que intervindria en la formació de la feromona sexual de *S. littoralis*, proporcionant un únic isòmer geomètric o tots dos, tot depenent de la longitud de la cadena<sup>[46]</sup>. Així, per a longituds de cadena entre 12 i 14 àtoms de carboni, la  $\Delta 11$  dessaturasa proporciona mescles dels isòmers *E* i *Z*, mentre que per a longituds de cadena superiors a 14 àtoms de carboni, tan sols s'obté l'isòmer de geometria *Z*, tal com succeeix amb el llevat transformat.

D'altra banda, en aquest treball de Tesi s'ha aconseguit clonar i caracteritzar amb èxit dues  $\Delta 9$  dessaturases, una present al cos gras i l'altra a la glàndula feromonal. Els dos enzims difereixen en les proporcions dels productes que resulten de la reacció de dessaturació, els àcids palmitoleic i oleic, que és de 7:3 en el cas de l'enzim glandular i de 3:2 en la dessaturasa del cos gras.

A més, els dos enzims produeixen l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic quan el medi de cultiu conté l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic. La formació de diens a partir d'un àcid de configuració *E*, ja ha estat descrita en altres espècies, com la *E. postvittana*<sup>[18]</sup> i s'ha suggerit que la  $\Delta 9$  dessaturasa és capaç d'acceptar substrats monoinsaturats de geometria *E* i formar els corresponents diens. En canvi, no transforma monoens de geometria *Z*. Aquesta diferència s'ha explicat tot considerant que la disposició espacial d'un alquè de geometria *E* és bastant similar a la conformació típica de les cadenes hidrocarbonades saturades, mentre que les olefines de geometria *Z* exhibeixen una organització tridimensional diferent, i per tant no són reconegudes com a substrats per la  $\Delta 9$  dessaturasa<sup>[204]</sup>.

La formació del diè en el cas de l'enzim glandular era lògica, ja que l'acetat de (*Z,E*)-9,11-tetradecadienil és el component majoritari de la feromona sexual de *S. littoralis*. Tanmateix, la formació de diè per l'acil-CoA dessaturasa de cos gras fou, en certa manera, sorprenent, ja que el cos gras no conté cap sistema diènic. Ara bé, donat que tampoc hi és present l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic, sembla lògic pensar que l'absència de diè no és pas deguda a una elevada especificitat de la  $\Delta 9$  dessaturasa de cos gras, sinó més aviat a la manca de substrat precursor del diè.

Per altra banda, tal com s'ha mencionat en l'apartat de resultats, les proteïnes resultants d'ambdós gens són capaces de produir l'àcid (*Z*)-9-tetradecenoic quan s'expressen en presència de l'àcid mirístic. Contràriament, en experiments de marcatge<sup>[32]</sup> es demostrà que la glàndula feromonal de *S. littoralis* només és capaç de

sintetitzar l'àcid (*Z*)-9-tetradecenoic per  $\beta$ -oxidació de l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic, però no pas a partir de l'àcid mirístic (vegeu Figura 1.8, pàgina 18). Aquesta aparent contradicció entre l'enzim expressat en llevat i el present en cèl·lules de la glàndula feromonal podria ser explicada tot considerant que alguns dels àcids grassos presents a la glàndula inhibissin, o bé l'expressió de la  $\Delta 9$  dessaturasa o bé la seva activitat catalítica[181, 205].

Donat que el substrat real de la  $\Delta 9$  dessaturasa de la glàndula feromonal és l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic (**132**), el qual no es troba present en cèl·lules de llevat ni de cos gras, hom va proposar que l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic interferia amb l'activitat normal de la  $\Delta 9$  dessaturasa. D'acord amb aquesta hipòtesi, es van fer créixer cèl·lules de llevat transformades amb cadascun dels plasmidis que portaven el gen de la  $\Delta 9$  dessaturasa en presència de l'àcid mirístic i de l'àcid **132**, sense observar-se la formació de l'àcid miristoleic. A més, la proporció d'àcids oleic i palmitoleic també va decreïxer substancialment. El mateix resultat va ser obtingut tot utilitzant l'isòmer *Z*, (àcid **121**), tot i que en aquest cas, a diferència de l'isòmer *E*, no es va formar cap estructura diènica.

Per tant, quedava palès que l'àcid miristoleic present a la glàndula feromonal prové de l'escurçament de la cadena de l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic, donat que la presència de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic inhibeix la dessaturació en la posició 9 de l'àcid mirístic. L'absència d'àcid (*E*)-11-tetradecenoic en el cas del cos gras fa que la  $\Delta 9$  dessaturasa sigui activa sobre l'àcid tetradecanoic. Aquest resultat representa el primer exemple fins el moment de l'existència d'una regulació endògena de l'activitat de les dessaturases en glàndules feromonals de lepidòpters.

Per altra banda, cap de les dues  $\Delta 9$  dessaturases no va proporcionar l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic a partir del seu precursor natural, l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic.

Aquest resultat suggeria que la formació d'ambdós tetradecadienoats, (*Z,E*)-9,11- i (*E,E*)-10,12-, estava catalitzada per enzims diferents, en contra de la nostra hipòtesi d'un únic enzim. Donat que no hi havia cap precedent a la literatura sobre la seqüència d'enzims del tipus 1,4-dessaturasa en animals era raonable suposar que el gen que codificaria aquesta dessaturasa hauria de presentar poca homologia amb altres dessaturases descrites. És per això que, tot assumint l'existència de dues dessaturases diferents, es va pensar en la possibilitat que el gen SLG-ORF4 traduís la 1,4-dessaturasa.

Tanmateix, les incubacions realitzades amb l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic tot utilitzant cèl·lules de llevat transformades amb el gen SLG-ORF4, tant emprant el vector YEpOLEX com el vector pYES2, no van proporcionar l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic, tal com es desprenia dels cromatogrames de CG-EM. Per tant, no semblava que el gen SLG-ORF4 fos el precursor de la 1,4-dessaturasa.

Algunes poblacions de *S. littoralis* presenten a la seva feromona sexual l'àcid (*Z,E*)-9,12-tetradecadienoic, el qual és biosintetitzat per l'acció d'una  $\Delta 12$  dessaturasa sobre l'àcid miristoleic<sup>[31]</sup>. Tot i que aquest diè no conjugat no estava present en la colònia criada als nostres laboratoris, era possible que el gen SLG-ORF4 codifiqués una  $\Delta 12$  dessaturasa no funcional. Per tal motiu, els mutants de *S. cerevisiae* portadors del gen SLG-ORF4 es van fer créixer en presència de l'àcid miristoleic al medi de cultiu. Malauradament, amb cap dels dos vectors utilitzats es va formar l'àcid (*Z,E*)-9,12-tetradecadienoic.

Un fet interessant era l'elevada homologia (91%) que el gen SLG-ORF4 presentava amb una sèrie de seqüències parcials d'una acil-CoA dessaturasa identificada en els lepidòpters *S. litura*<sup>[206]</sup> (número d'accés AF482943), *S. exigua*<sup>[207]</sup> (número d'accés AF482937), i *H. assulta*<sup>[208]</sup> (número d'accés AF482907). Aquest resultat suggeria que aquests gens, juntament amb el SLG-ORF4, haurien de codificar una proteïna comuna a totes quatre espècies. Per tant, no es podia tractar de la 1,4-dessaturasa de l'àcid (*Z*)-11-tetradecenoic, ja que cap de les tres espècies presenta cap derivat de l'àcid (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic. Com que totes les dessaturases comunes, la  $\Delta 9$  dessaturasa i la  $\Delta 11$  dessaturasa, ja havien estat identificades, es va proposar que el gen SLG-ORF4 podria codificar una proteïna no implicada en la biosíntesi del complex feromonal, malgrat haver estat trobada en la glàndula feromonal de l'insecte.

La primera candidata va ser la  $\Delta 12$  oleoïl-CoA dessaturasa, que transforma l'àcid oleic en l'àcid (*Z,Z*)-9,12-octadecadienoic (àcid linoleic). Si bé aquesta dessaturasa és pròpia del regne vegetal, s'ha descrit activitat  $\Delta 12$  oleoïl-CoA dessaturasa en diferents teixits d'insectes<sup>[209]</sup>, tot i que es creu que no es troba en lepidòpters<sup>[207]</sup>. Així, les cèl·lules de llevat transformades amb el vector pYES2 que portava el gen SLG-ORF4 es van incubar en presència d'àcid oleic. Els cromatogrames de CG-EM no presentaren cap evidència de la formació del linoleoat de metil, fet que semblava indicar que el gen SLG-ORF4 no traduïa aquesta dessaturasa.

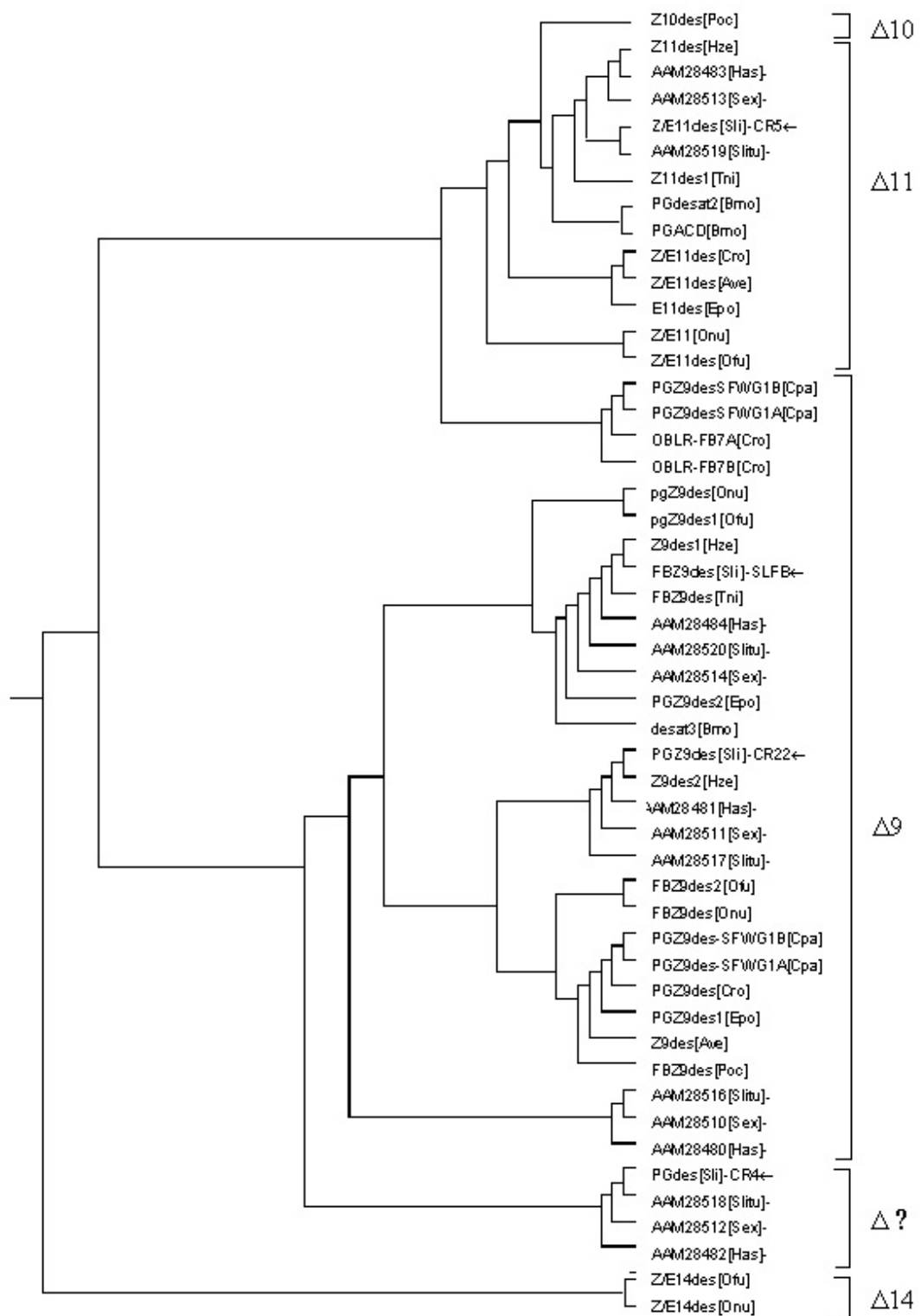


Els experiments dirigits a identificar la funció d'aquest gen SLG-ORF4 prossegueixen dins de la Tesi Doctoral de la Montserrat Serra, que continua també investigant sobre el gen precursor de la "1,4-dessaturasa".

Com es pot observar a l'arbre filogenètic de la Figura 2.18, les branques on es localitzen les dessaturases clonades en aquest treball es corresponen amb les especificitats trobades en els assaigs funcionals. Així, la proteïna procedent de SLG-CR5 es situa juntament amb les  $\Delta 11$  dessaturases d'altres espècies. La construcció de l'arbre filogenètic també permet aventurar que les seqüències parcials AAM28483 (*H. assulta*), AAM28513 (*S. exigua*) i AAM28519 (*S. litura*) corresponen a  $\Delta 11$  dessaturases. En totes tres espècies, s'ha descrit activitat  $\Delta 11$  dessaturasa en la biosíntesi de les seves feromones sexuals.

D'altra banda, els gens SLFB i SLG-CR22 es situen a les branques corresponents a  $\Delta 9$  dessaturases, ja siguin de glàndula feromonal o de cos gras. En les branques de  $\Delta 9$  dessaturases es troben també les seqüències parcials AAM28484 i AAM28481 (*H. assulta*), AAM28520 i AAM28517 (*S. litura*) i AAM28514 i AAM2851 (*S. exigua*), que possiblement corresponen a  $\Delta 9$  dessaturases de cos gras i glàndula feromonal de cadascuna d'aquestes tres espècies.

La proteïna codificada pel gen SLG-CR4 es localitza juntament amb les seqüències parcials AAM28482 (*H. assulta*), AAM28512 (*S. exigua*) i AAM28518 (*S. litura*). La regioselectivitat d'aquests enzims encara no ha pogut establir-se, però, tal com s'ha comentat abans, es tracta possiblement d'una dessaturasa no implicada en la biosíntesi de la feromona sexual.



**Figura 2.18.** Arbre filogenètic de les acil-CoA dessaturasa clonades de glàndula feromonal i cos gras de diferents espècies de lepidòpters. Les seqüències dels ORFs es van alinear i agrupar d'acord amb les diferents regioselectivitats tot emprant el programa CLUSTALX i TreeView. Els números d'accés corresponents a cada proteïna

són: Z11des[Hze], AAF81787; AAM28483[Has], AAM28483; AAM28513[Sex], AAM28513; **Z/E11des[Sli]-CR5**, FALTA; AAM28519[Slitu], AAM28519; Z11des1[Tni], AAD03775; PGdesat2[Bmo], AAG16901; PGACD[Bmo], AAF80355; Z10des[Poc], AAG54077; Z/E11des[Cro], AAN41250; Z/E11des[Ave], AAL16642; E11des[Epo], AAL11496; Z/E11[Onu], AAL35331; Z/E11des[Ofu], AAL32060; PGZ9desSFWG1B[Cpa], AAN39694; PGZ9desSFWG1A[Cpa], AAN39693; OBLR-FB7A[Cro], AAN39698; OBLR-FB7B[Cro], AAN39699; pgZ9des[Onu], AAL29454; pgZ9des1[Ofu], AAL27034; Z9des1[Hze], AAF81790; **FBZ9des[Sli]**, FALTA; FBZ9des[Tni], AAB92583; AAM28484[Has], AAM28484; AAM28520[Slitu], AAM28520; AAM28514[Sex], AAM28514; PGZ9des2[Epo], AAK94070; desat3[Bmo], AAG16902; **PGZ9des[Sli]-CR22**, FALTA; Z9des2[Hze], AAF81788; AAM28481[Has], AAM28481; AAM28511[Sex], AAM28511; AAM28517[Slitu], AAM28517; FBZ9des2[Ofu], AAL27033; FBZ9des[Onu], AAF44710; PGZ9des\_SFWG1B[Cpa], AAN39701; PGZ9des\_SFWG1A[Cpa], AAN39700; PGZ9des[Cro], AAN39697; PGZ9des1[Epo], AAL35750; Z9des[Ave], AAF44709; FBZ9des[Poc], AAF73073; AAM28516[Slitu], AAM28516; AAM28510[Sex], AAM28510; AAM28480[Has], AAM28480; **PGdes[Sli]-CR4**, FALTA; AAM28518[Slitu], AAM28518; AAM28512[Sex], AAM28512; AAM28482[Has], AAM28482; AAM28486[Has], AAM28486; Z/E14des[Ofu], AAL35746; Z/E14des[Onu], AAL35330; AAM28485[Has], AAM28485; AAM28515[Sex], AAM28515. Les abreviatures entre corxets indiquen l'espècie i corresponen a: *Bombyx mori*, Bmo; *Choristoneura rosaceana*, Cro; *Ostrinia furnacalis*, Ofu; *Ostrinia nubilalis*, Onu; *Choristoneura parallela*, Cpa; *Planotortrix octo*, Poc; *Epiphyas postvittana*, Epo; *Argyrotaenia velutinana*, Ave; *Helicoverpa zea*, Hze; *Trichoplusia ni*, Tni; *Spodoptera litura*, Slitu; *Spodoptera exigua*, Sex; *Helicoverpa assulta*, Has; *Spodoptera littoralis*, Sli. L'asterisc indica seqüències parcials i ←, les proteïnes codificades pels gens clonats en aquesta Tesi. A la dreta s'indiquen les regioselectivitats de cada dessaturasa.



***3.- SÍNTESI ENZIMÀTICA DE L'ÀCID (Z,E)-9,11-  
OCTADECADIENOIC (CLA) TOT UTILITZANT EL LLEVAT  
S.CEREVISIAE***



### **3. SÍNTESI ENZIMÀTICA DE L'ÀCID (Z,E)-9,11-OCTADECADIENOIC (CLA) TOT UTILITZANT EL LLEVAT *S. CEREVISIAE***

#### **3.1. INTRODUCCIÓ**

La funció fisiològica de la  $\Delta 9$  dessaturasa, àmpliament distribuïda en diferents organismes<sup>[176, 178]</sup>, és la formació dels àcids grassos oleic i palmitoleic ambdós encarregats de conferir fluïdesa a la membrana cel·lular<sup>[5]</sup>. Ara bé, un resultat interessant obtingut en el capítol precedent fou la capacitat de la  $\Delta 9$  dessaturasa del cos gras de *S. littoralis* de transformar l'àcid (E)-11-tetradecenoic en l'àcid (Z,E)-9,11-tetradecadienoic.

Aquest resultat estava d'acord amb altres de similars obtinguts per Liu i col<sup>[18]</sup>, que trobaren que la  $\Delta 11$  dessaturasa clonada en l'espècie *E. postvittana* era capaç de formar l'àcid (E,E)-9,11-tetradecadienoic a partir de l'àcid (E)-9-tetradecenoic. Aparentment, els precursors que contenen un doble enllaç de geometria E són estructuralment similars als precursors saturats<sup>[204]</sup> i són reconeguts com a substrat per aquests enzims. El fet de no trobar diens de forma habitual en els teixits és simplement degut, al menys en part, a l'absència d'àcids grassos amb insaturacions (E).

#### **3.1.1. Àcids grassos diènics conjugats: àcid linoleic conjugat (CLA)**

Fins a la data, s'han identificat centenars d'àcids grassos que presenten un ús potencial tant industrial com farmacèutic, destacant especialment els àcids grassos poliinsaturats.

Generalment, en aquest tipus d'àcids grassos, els dobles enllaços tendeixen a presentar un grup metilè entre els dos dobles enllaços, i solen ser de configuració Z, com és el cas de l'àcid linoleic (àcid (Z,Z)-9,12-octadecadienoic). Tanmateix, també es

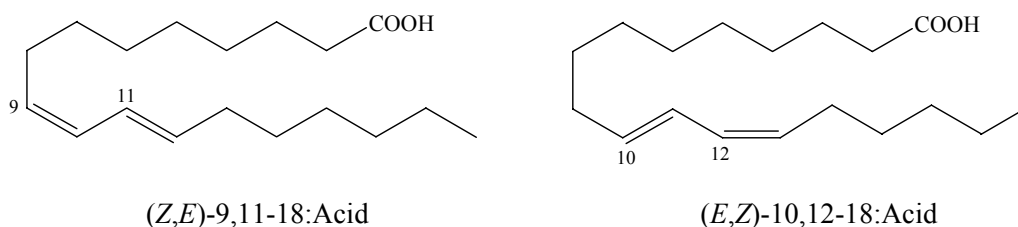
poden trobar a la natura àcids grassos amb dobles enllaços conjugats de diverses geometries, com és el cas dels insectes ja tractats en apartats precedents, bacteris, algues i especialment en plantes on es poden trobar àcids tan diversos com el (*Z,E,E*)-9,11,13-octadecatrienoic (àcid  $\alpha$ -eleostàric), (*Z,E,Z*)-9,11,13-octadecatrienoic (àcid puníic) i (*Z,E,Z*)-8,10,12-octadecatrienoic (àcid jarcàric)[41], entre altres.

La presència de dobles enllaços conjugats incrementa la velocitat d'oxidació en comparació amb els altres àcids grassos que presenten les insaturacions alternades. Aquesta propietat fa que els olis rics en àcids grassos diènics conjugats hagin estat aprofitats com a agents assecants en pintures, vernissos i tintes, donat que requereixen menys oxigen per tal de realitzar les reaccions de polimerització que tenen lloc durant el procés d'assecat[20].

Un dels àcids grassos amb dobles enllaços conjugats amb un interès creixent en la indústria farmacèutica degut als seus diversos efectes fisiològics sobre animals i humans ho conforma la família dels àcids linoleics conjugats (CLAs).

S'ha demostrat que aquests àcids presenten una activitat antitumoral molt elevada[210, 211] i inhibeixen el desenvolupament de diversos tipus de càncer en models animals[212]. També està descrit que redueixen el desenvolupament de l'arteriosclerosi en conills[213], milloren la proporció entre proteïnes i greixos presents en pollastres i porcs[214, 215] i serveixen d'adjuvants en tractaments contra l'obesitat[212]. A més, una alimentació amb una proporció baixa de CLAs (un 0,5% en la dieta), estimula la funció del sistema immunològic en rosegadors[216].

L'isòmer més actiu és l'àcid (*Z,E*)-9,11-octadecadienoic i, amb menys efectes, l'àcid (*E,Z*)-10,12-octadecadienoic[210] (Figura 3.1).

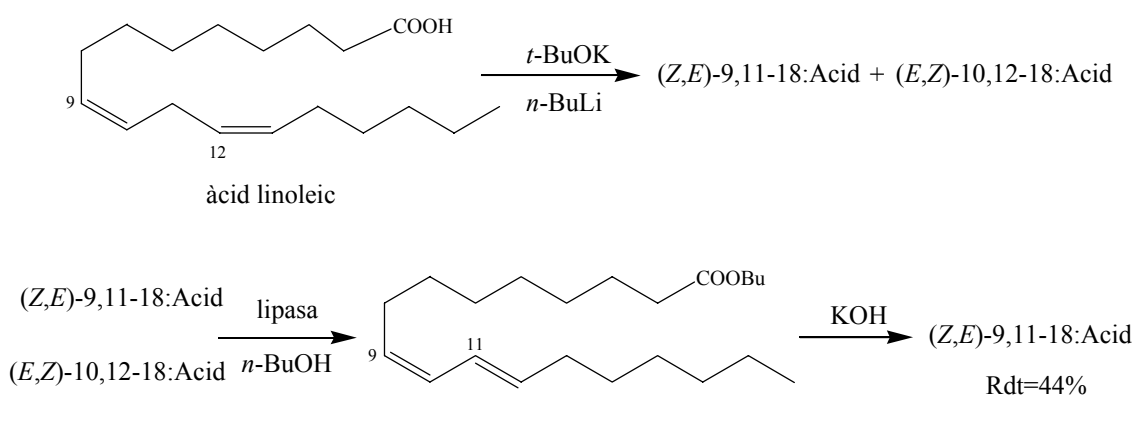


**Figura 3.1** Estructura dels isòmers principals dels àcids linoleics conjugats (CLAs).



Amb aquestes propietats, no és d'estranyar el gran interès mostrat per aquest àcid. Malauradament, no existeix cap font natural que proporcioni els CLA. Aquests es troben presents de forma natural, tot i que en una proporció baixa, en la carn i els productes làctics de consum diari, principalment en aquells que procedeixen dels animals ruminants on és biosintetitzat a partir de l'àcid linoleic per mitjà dels bacteris presents al rumen[217].

Des d'un punt de vista sintètic, el CLA pot ser obtingut per isomerització de l'àcid linoleic en condicions bàsiques[218] o utilitzant catàlisi heterogènia[219], tot i que ambdós procediments proporcionen mescles d'isòmers. La reacció d'isomerització pot ser optimitzada tot obtenint sols dos productes que poden ser separats per mitjà de l'ús de lipases[220, 221], tal com es mostra a la Figura 3.2. Altres mètodes descrits inclouen la hidrogenació d'enins[222], l'eliminació d'èsters sulfònics derivats del ricinoleat de metil[223] i reaccions de tipus Wittig[224].



**Figura 3.2** Formació del (Z,E)-9,11-18:Acid per isomerització de l'àcid linoleic i successives resolucions amb la lipasa *Aspergillus niger*[220].

Tanmateix, la limitada regioselectivitat d'aquests processos, els quals proporcionen normalment mescles de diversos isòmers, unida als problemes que comporta la utilització de catalitzadors metàl·lics com són la dificultat d'eliminació i la falta de compatibilitat amb el medi ambient, fa que encara no es disposi d'un mètode simple i econòmic per a l'obtenció de quantitats substancials de l'àcid (Z,E)-9,11-octadecadienoic com a isòmer pur.

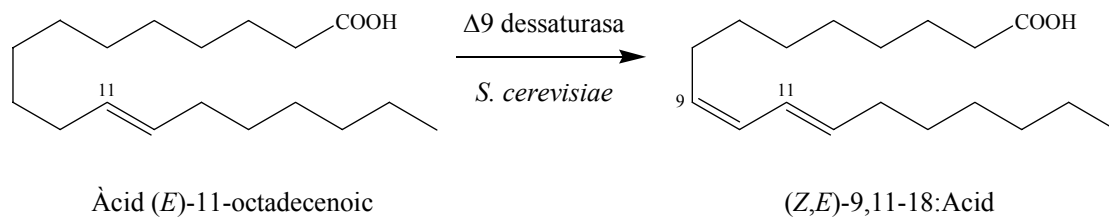
### 3.1.2. Utilització del llevat *S. cerevisiae* com a reactor bioquímic per a la formació del CLA

El llevat *S. cerevisiae* és un microorganisme molt útil en biotecnologia, ja que presenta una velocitat de creixement i replicació elevades i s'han desenvolupat una sèrie de mètodes que permeten una manipulació ràpida i senzilla del seu genoma, tot permetent la introducció de qualsevol mutació. La biologia de *S. cerevisiae* presenta moltes similituds i paral·lelismes amb la d'altres organismes eucariotes, entre els quals es troben els humans. És per tant que els estudis realitzats sobre *S. cerevisiae* són sovint rellevants en la biologia humana. En aquest sentit, el llevat ha estat objecte de moltes investigacions força extensives en els camps de la biologia cel·lular i molecular, com són els estudis sobre el cicle cel·lular, l'herència de material genètic, la secreció i transport de biomolècules, transcripció i traducció de proteïnes, etc.

Aquests estudis van començar cap a finals de la dècada dels setanta amb el descobriment de mètodes per transformar cèl·lules de llevat amb DNA de tipus plasmidi i l'adveniment de mètodes que utilitzen DNA recombinant. Durant els darrers vint anys, el llevat s'ha convertit en un dels sistemes més àmpliament i intensivament estudiats, tot contribuint a l'avenç de diferents camps de la biologia.

El genoma de *S. cerevisiae* va ser el primer d'un organisme eucariota en ser completament seqüenciat. Aquest comprèn aproximadament 12000 kb que codifiquen prop de 6000 gens<sup>[225]</sup>. La seqüenciació del DNA ha permès la identificació de molts d'aquests gens. Un d'aquests és l'*OLE1*, el qual codifica una  $\Delta 9$  dessaturasa (esteroil-CoA dessaturasa) encarregada de catalitzar la transformació de l'àcid esteàric en l'àcid (*Z*)-9-octadecenoic o oleic<sup>[25, 178]</sup>.

La geometria que presenta el CLA, amb un doble enllaç de configuració *Z* en la posició 9 i una insaturació *E* en la posició 11, juntament amb la capacitat de les  $\Delta 9$  dessaturases d'actuar sobre un substrat amb un doble enllaç de geometria *E*, van suggerir que el CLA podria ser obtingut mitjançant la dessaturació de l'àcid (*E*)-11-octadecenoic (àcid vaccènic) tot utilitzant cèl·lules de *S. cerevisiae* (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Possible formació del (Z,E)-9,11-18:Acid a partir de l'àcid vaccènic mitjançant la  $\Delta 9$  dessaturasa present en cèl·lules de *S. cerevisiae*.

Tot i que existeixen molts exemples a la literatura química sobre la utilització de cèl·lules de llevat en síntesi orgànica[226, 227], la seva utilitat per introduir dobles enllaços Z en la posició 9 d'una cadena no ha estat explotada tot i disposar, com ja s'ha comentat, d'una  $\Delta 9$  dessaturasa perfectament caracteritzada. Tot i així, Buist i col[66, 87] van suggerir que aquesta característica es podria utilitzar per a la síntesi de sulfòxids i de sulfurs insaturats.

### 3.2. OBJECTIUS

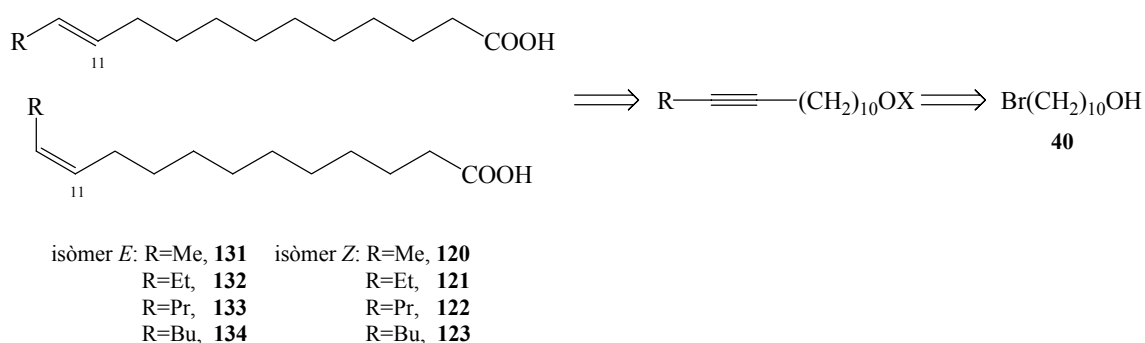
Amb aquests precedents, un dels objectius d'aquesta Tesi fou explorar la utilitat de les acil-CoA dessaturases per a l'obtenció d'àcids grassos d'alt valor afegit, tot fent especial èmfasi en l'obtenció de l'àcid (Z,E)-9,11-octadecadienoic (CLA) a partir de l'àcid vaccènic utilitzant la  $\Delta 9$  dessaturasa de *S. cerevisiae*.

### 3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Abans de passar a desenvolupar un procés de síntesi del CLA, es va voler determinar l'abast de la reacció enzimàtica de dessaturació en la posició (Z)-9 d'una sèrie d'àcids grassos de diferents longituds, monoinsaturats, tant de configuració *E* com *Z*, en la posició 11 de la cadena.

#### 3.3.1. Síntesi dels àcids grassos monoinsaturats 120-123 i 131-134

Els àcids **120-123** i **131-134** es van preparar d'acord amb l'anàlisi retrosintètica que es mostra a la Figura 3.4.



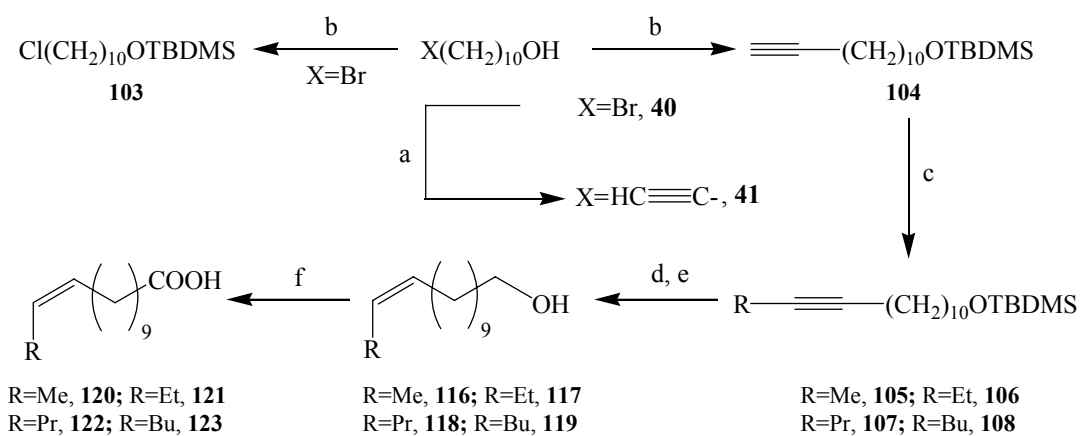
**Figura 3.4** Obtenció dels àcids **120-123** i **131-134** a partir del 10-bromo-1-decanol (**40**).

Així, tot partint del derivat **40**, aquest es protegiria i s'alquilaria amb acetilè/liti i el triple enllaç format es tornaria a alquilar amb els diferents radicals alquils necessaris. Les cadenes hidrocarbonades amb el doble enllaç de configuració *Z* s'obtindrien per hidrogenació parcial de l'alquí, mentre que les de configuració *E* es prepararien mitjançant la reacció del triple enllaç amb una mescla de sodi i amoníac. L'oxidació de Jones final rendiria finalment els àcids desitjats.

##### 3.3.1.1. Síntesi dels àcids de geometria (*Z*) 120-123

Per tal de realitzar la síntesi d'aquests compostos, es va escollir com a grup protector de l'alcohol, el *tert*-butil dimetilsilil (TBDMS). En una primera aproximació es va intentar la protecció a partir de l'alcohol **40** amb clorur de *tert*-butil dimetilsilil (TBDMSCl) tot emprant DMF i imidazole<sup>[49]</sup>, però es va obtenir com a producte únic l'alcohol protegit **103**, fruit de l'atac del clorur sobre el bromur de la cadena<sup>[163]</sup>. Per tant, es va decidir partir directament de l'alcohol **41**, ja amb la funció alquí en el carboni

11 i protegir-lo en aquest estadi, tal com es mostra a la Figura 3.5, tot obtenint el compost **104**.



*Reactius i condicions:* (a) acetilè, Li, NH<sub>3</sub>, DMSO, ta, 90 min, (**41**, 97%); (b) TBDMSCl, DMF, imidazole, ta, 16h, (**103**, 77%; **104**, 97%); (c) *n*-BuLi, THF/HMPA, RI, 0°C fins a ta, 1h, (R=Me, **105**, 72%; R=Et, **106**, 70%; R=Pr, **107**, 66%; R=Bu, **108**, 61%); (d) H<sub>2</sub>, Pd/BaSO<sub>4</sub>, quinoleïna, hexà, ta, 3h, llavors (e) TBAF, THF, ta, 1h, (**116**, 78%; **117**, 78% **118**, 75%; **119**, 74%); (f) CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, acetona, ta, 16h, (**120**, 62%; **121**, 60% **122**, 70%; **123**, 72%).

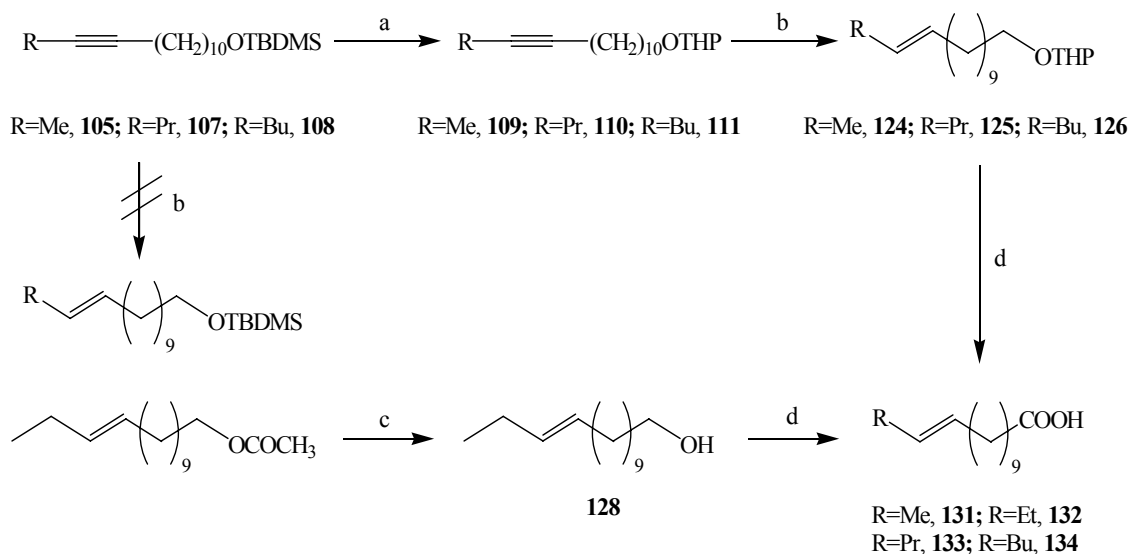
**Figura 3.5** Síntesi dels àcids grassos **120-123** a partir del 10-bromo-1-decanol (**40**).

Un cop es disposava de l'alquí **104**, calia alquilar-lo amb el radical *R* adequat, en aquest cas metil, etil, propil i butil. Es va seguir un procediment descrit per Schwartz i Waters<sup>[228]</sup> en el qual 1 equiv de l'alquí dissolt en THF anh es va fer reaccionar, a 0°C, amb 1,2 equiv de *n*-Buli (1,6 M en hexà). Seguidament, s'addicionà el iodur d'alquil apropiat (1,2 equiv) en HMPA seca, es deixà 5 min a 0°C i 1 h a ta. Un cop acabada la reacció es tractà el cru i aquest es purificà per cromatografia en columna de gel de sílice. Aquest alquí intern es transforma en l'alquè de configuració *Z* corresponent mitjançant hidrogenació tot utilitzant H<sub>2</sub> i Pd(10%)/C enverinat amb BaSO<sub>4</sub> i quinoleïna. El grup silil es desprotegí mitjançant la reacció amb 1,5 equiv d'una solució de fluorur de tetrabutyl amoni (TBAF) en THF 1 M durant 1 h, tot obtenint els corresponents alcohols grassos monoinsaturats **116-119**<sup>[49]</sup>. Finalment, l'oxidació de Jones amb CrO<sub>3</sub> proporcionà els àcids finals desitjats.

### 3.3.1.2. Síntesi dels àcids de geometria (*E*) 131-134

Els àcids grassos de geometria (*E*) es van sintetitzar d'una manera anàloga als àcids anteriorment descrits, únicament modificant el procediment de reducció del triple enllaç, que en aquest cas fou amb Na/NH<sub>3</sub> (Figura 3.6).

Tanmateix, es va haver de canviar de grup protector ja que en realitzar aquesta reducció, la reacció no funcionava amb el grup silil. Donat que l'alcohol lliure tampoc és un bon substrat, van haver-se de formar els alcohols alquínics protegits en forma d'èter tetrahidropiranílic (THP) **109**, **110** i **111** i conduir la reacció sobre aquests[229]. En un procediment estàndard, es condensen 50 mL d'amoniac gas i seguidament s'addicionen 1,7 mmol d'èter tetrahidropiranílic en THF anh. Es manté la reacció a -78°C i s'afegeixen 8,6 mmol de sodi metàl·lic, tot prenent la solució un color blau intens. Després de romandre a reflux durant 8 h, s'elimina l'amoniac i la reacció es tracta, per acabar obtenint 1,6 mmol d'alquè *E* amb un rendiment del 95%.



*Reactius i condicions:* (a) TBAF, THF, ta, 1 h; llavors DHP, *p*-TsOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 45 min, (**109**, 54%; **110**, 67%; **111**, 47%); (b) NH<sub>3</sub>, Na, THF, 8 h, -78°C, (**124**, 95%; **125**, 88%; **126**, 98%); (c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH, ta, 16 h, (**128**, 95%); (d) CrO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, acetona, ta, 16 h, (**131**, 68%; **132**, 66%; **133**, 74%; **134**, 66%).

**Figura 3.6** Síntesi dels àcids grassos **131-134**.

Un cop es disposava d'aquests substrats alquènics, s'oxidaren als corresponents àcids **131**, **133** i **134**, per mitjà del reactiu de Jones, tot seguint el mateix procediment descrit per a l'obtenció dels àcids de geometria *Z*.

Per altra banda, l'alcohol **128** s'obtingué a partir del corresponent acetat de (*E*)-11-tetradecenil, el qual és comercialment assequible. Aquest acetat s'hidrolitzà i l'alcohol fou oxidat a l'àcid **132** mitjançant la reacció de Jones.

### 3.3.2. Síntesi enzimàtica d'àcids grassos diènics mitjançant *S. cerevisiae*. Resultats dels experiments preliminars

Per tal d'explorar la utilitat d'aquest microorganisme per a l'obtenció de diens conjugats en les posicions 9 i 11 (de configuració *Z,E*) d'una cadena hidrocarbonada a partir de diferents àcids grassos insaturats en la posició 11 (de geometria *E*) i en especial per investigar la validesa d'aquest mètode per a l'obtenció del CLA, es van preparar cultius de llevat *S. cerevisiae* de diferents soques, tant salvatges (com la W303a tant diploide com haploide i la NCS) com mutants (la  $\Delta$ Elo1), a una escala analítica. En aquest cas, i tal com es detalla a la part experimental, es van incubar les distintes soques amb cadascun dels àcids monoinsaturats escollits (**120-123**, **131-134**, l'àcid vaccènic i l'àcid 11-tridecinoic (**170**), aquest últim disponible en el nostre laboratori).

Els extractes lipídics metanolitzats van ser analitzats per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (CG-EM), tot realitzant les corresponents derivatitzacions amb MTAD quan es va escaure.

Tal com es pot apreciar a la Taula 3.1, a partir de tots els àcids insaturats en (*E*)-11, es va obtenir el corresponent diè (*Z,E*)-9,11 en diferents proporcions segons la soca utilitzada.

Quan la soca utilitzada era la W303a, ja sigui en la seva forma diploide o haploide, van formar-se altres productes, identificats com els monoens procedents de l'allargament de la cadena de l'àcid gras de partida i del seu producte de dessaturació per mitjà de l'enzim elongasa 1 present en aquestes soques de llevat<sup>[202]</sup>. També es va formar el diè derivat de la dessaturació en C9 de l'àcid monoènic allargat.

**Taula 3.1** Àcids grassos mono i diinsaturats formats després d'incubar diversos àcids (*E*) i (*Z*)-11-alquenoics amb *S. cerevisiae* de diferents soques (W303a, ΔElo1 i NCS).

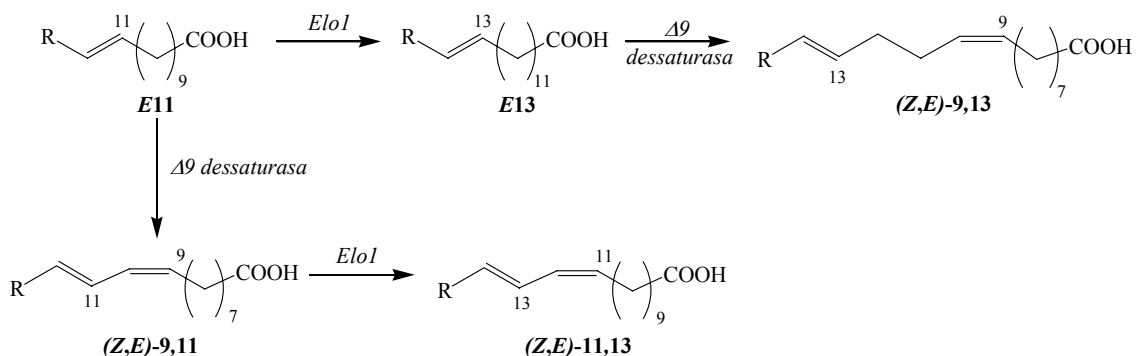
Substrat	Soca de llevat	Diè d'interès <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	Altres alquens obtinguts <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>
131	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z,E</i> )-9,11-13:Me (27)	( <i>Z,E</i> )-11,13-15:Me (37) ( <i>Z,E</i> )-9,13-15:Me (36)
	ΔElo1	( <i>Z,E</i> )-9,11-13:Me (100)	-----
120	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z</i> )-11-13:Me (42)	( <i>Z</i> )-11-15:Me (58)
	ΔElo1	( <i>Z</i> )-11-13:Me (100)	-----
132	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z,E</i> )-9,11-14:Me (6)	( <i>Z,E</i> )-11,13-16:Me (33) ( <i>Z,E</i> )-9,13-16:Me (62)
	ΔElo1	( <i>Z,E</i> )-9,11-14:Me (100)	-----
121	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z</i> )-11-14:Me <sup>d</sup>	( <i>Z</i> )-11-16:Me <sup>d</sup>
	ΔElo1	( <i>Z</i> )-11-14:Me (100)	-----
133	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z,E</i> )-9,11-15:Me (76)	( <i>Z,E</i> )-11,13-17:Me (12) ( <i>Z,E</i> )-9,13-17:Me (11)
	ΔElo1	( <i>Z,E</i> )-9,11-15:Me (100)	-----
122	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z</i> )-11-15:Me (85)	( <i>Z</i> )-11-17:Me (15)
	ΔElo1	( <i>Z</i> )-11-15:Me (100)	-----
134	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z,E</i> )-9,11-16:Me (99)	( <i>Z,E</i> )-11,13-18:Me (1)
	ΔElo1	( <i>Z,E</i> )-9,11-16:Me (100)	-----
123	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z</i> )-11-16:Me <sup>d</sup>	( <i>Z</i> )-11-18:Me <sup>d</sup>
	ΔElo1	( <i>Z</i> )-11-16:Me (100)	-----
170 <sup>e</sup>	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z</i> )-9,11,11-13:Me <sup>f</sup> (15)	( <i>Z</i> )-11,13,13-15:Me <sup>f</sup> (85)
	ΔElo1	( <i>Z</i> )-9,11,11-13:Me <sup>f</sup> (100)	-----
àcid vaccènic	W303a (hap o dip) <sup>c</sup>	( <i>Z,E</i> )-9,11-18:Me (100)	-----
	ΔElo1	( <i>Z,E</i> )-9,11-18:Me (100)	-----
	NCS	( <i>Z,E</i> )-9,11-18:Me (100)	-----

<sup>a</sup>Analitzats en forma d'èsters metàlics. Els àcids esteàric, oleic, palmític i palmitoleic procedents de la membrana cel·lular del llevat també es troben presents. <sup>b</sup>Proporció determinada a partir de les abundàncies de cada ió molecular en els cromatogrames de CG-EM. <sup>c</sup>soca de llevat haploide (hap) i diploide (dipl) <sup>d</sup>No es va poder realitzar la quantificació degut a interferències cromatogràfiques. <sup>e</sup>Presenta estructura d'alquí. <sup>f</sup>Presenta estructura d'ení.

Així, a partir de l'àcid monoinsaturat de partida, (*E*)-11, es va obtenir, per acció de l'elongasa 1, l'àcid carboxílic (*E*)-13, el qual és subsegüentment dessaturat per la Δ9 dessaturasa, tot originant l'àcid diènic no conjugat (*Z,E*)-9,13. A més, per allargament de la cadena a partir dels corresponents àcids (*Z,E*)-9,11, s'obtingueren els àcids (*Z,E*)-



11,13, tal com es mostra d'una manera esquemàtica a la Figura 3.7 i en un exemple real a la Figura 3.8.

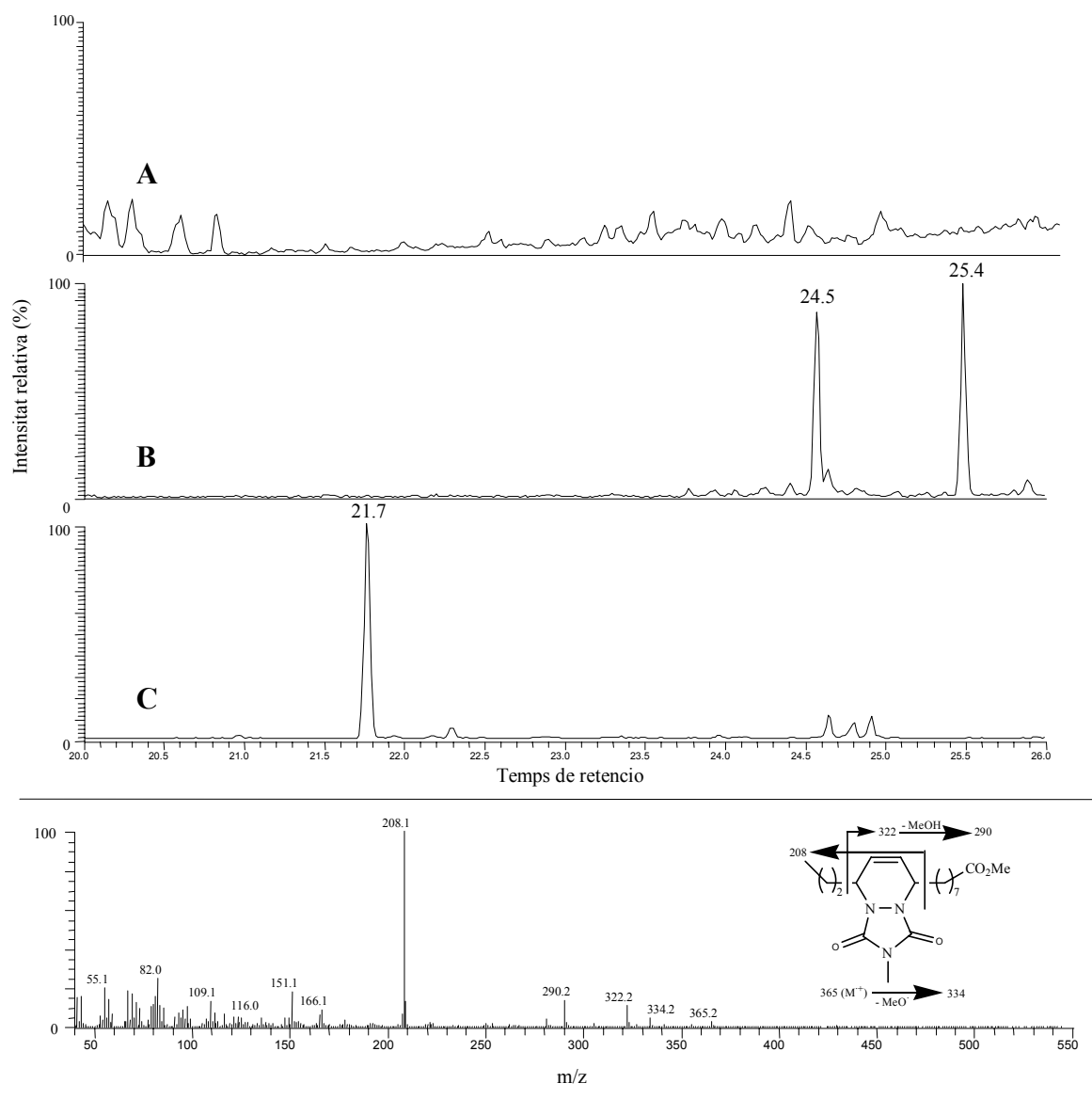


**Figura 3.7** Diferents productes de metabolització dels àcids (E)-11-alquenoics en la soca de llevat W303a. Aquests s'originen per acció conjunta de la  $\Delta 9$  dessaturasa i de l'elongasa 1.

Els resultats evidenciaven que totes les soques de llevat eren capaces d'introduir una dessaturació (Z) en la posició 9 de la cadena. La geometria dels diens resultants es va comprovar per comparació dels temps de retenció d'aquests productes amb mostres estàndard disponibles al nostre laboratori, confirmant que el llevat introdueix sempre un doble enllaç de tipus Z. Això confirma les observacions publicades anteriorment [18, 204] i els nostres resultats obtinguts en l'expressió i assaig funcional de dues  $\Delta 9$  dessaturases de *S. littoralis* (SLG-ORF22 i SLF-ORF), segons els quals els precursors amb un doble enllaç de geometria (E) són reconeguts per aquests enzims.

L'obtenció de barreges d'àcids derivats de l'activitat elongasa 1 va ser superada tot utilitzant la soca de llevat  $\Delta$ Elo1 la qual, en no disposar del gen *Elo1*, no presentava aquesta activitat. Amb aquesta soca només es van aconseguir els productes de dessaturació en (Z)-9 dels monoens de partida.

En el cas d'utilitzar els àcids grassos de geometria (Z), tal com era previsible d'acord amb els resultats obtinguts en el capítol anterior, no van formar-se els diens derivats de la  $\Delta 9$  dessaturasa. Amb la soca W303a només va ser possible aconseguir els productes d'allargament de la cadena.

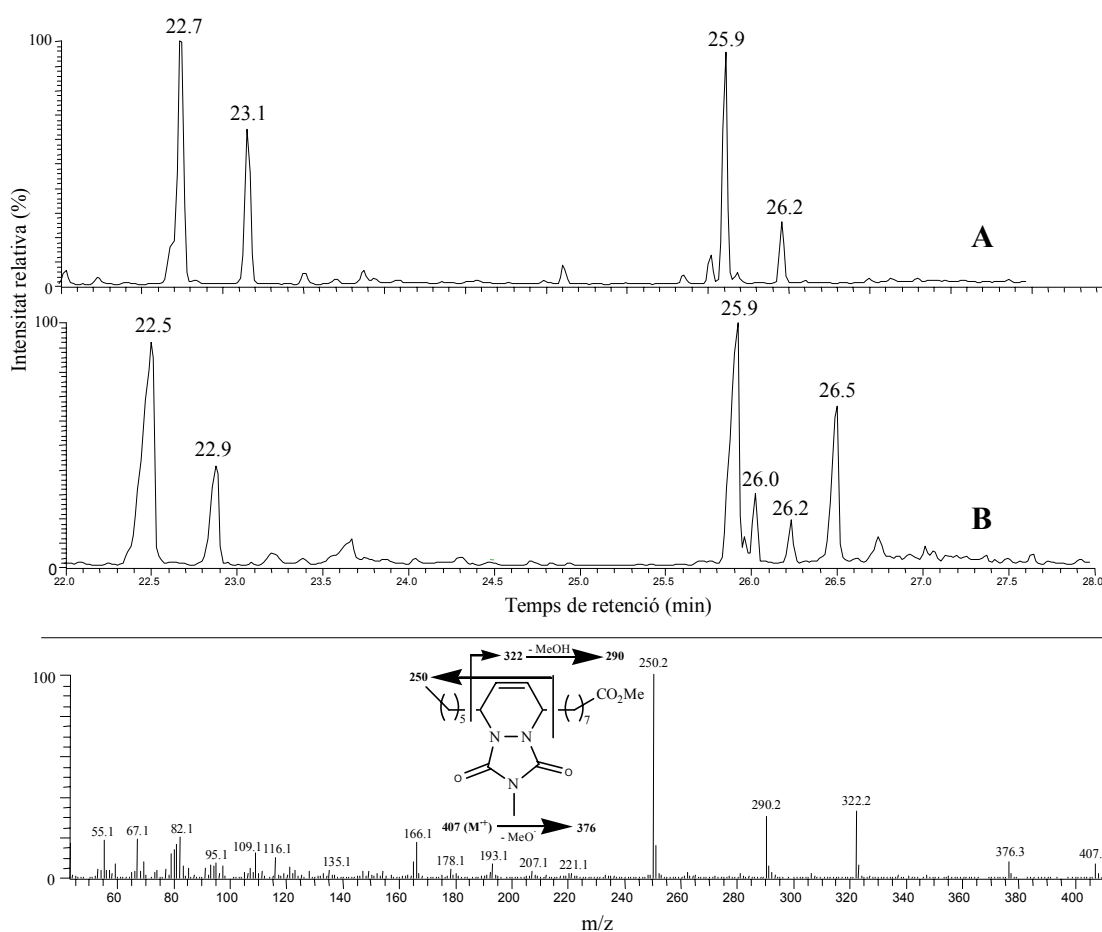


**Figura 3.8** Cromatogrames de CG-EM d'extractes lipídics metanolitzats de cèl·lules de llevat (soca W303a) amb l'àcid (*E*)-11-pentadecenoic (**133**). El cromatograma (A) correspon a un control negatiu. El cromatograma (B) mostra els èsters metàlics dels productes derivats de l'allargament de la cadena, els àcids (*Z,E*)-9,13 i (*Z,E*)-11,13-heptadecadienoic, a 24,5 min i 25,4 min, respectivament. El cromatograma (C) mostra el (*Z,E*)-9,11-pentadecadienoat de metil, a un temps de retenció de 21,7 min. L'espectre de masses correspon a l'adducte d'aquest darrer àcid amb el MTAD, que presentat els ions més significatius de la fragmentació (*m/z* 365, 334, 322, 290 i 208).

Per altra banda, en cas d'utilitzar un àcid acetilènic, el resultat de la transformació és prou interessant, ja que s'obté el corresponent ení, l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic. Tal com es veurà en el capítol següent, els enins constitueixen la feromona sexual de les processionàries, lepidòpters que constitueixen importants plagues forestals. Aquest

resultat, a més de la importància acadèmica que té, és d'interès econòmic, ja que pot conduir a un procediment de síntesi enzimàtica d'enins.

En el cas concret d'utilitzar l'àcid vaccènic, es va obtenir l'àcid (Z,E)-9,11-octadecadienoic com a únic producte diinsaturat independentment de la soca de llevat utilitzada. La seva identitat química va ser determinada mitjançant l'anàlisi per CG-EM de mostres derivatitzades amb MTAD. En aquest cas, el producte de cicloadició resultant exhibia en el seu espectre de masses nombrosos fragments diagnòstic com els ions a  $m/z$  322 i 250 (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Cromatogrames de CG-EM corresponents a un extracte lipídic metanolitzat de llevat de la soca NCS. El cromatograma (A) mostra un extracte control; els productes corresponen als èsters metàlics dels àcids palmitoleic (22,7 min), palmític (23,1 min), oleic (25,9 min) i esteàric (26,2 min). El cromatograma (B) mostra un extracte procedent de la incubació amb l'àcid vaccènic; els productes corresponen als èsters metàlics dels àcids vaccènic (26,0 min) i (Z,E)-9,11-18:Me (26,5 min). L'espectre de masses mostra l'adducte del (Z,E)-9,11-18:Me amb el MTAD, tot indicant els ions més característics.

Amb tot, malgrat que la conversió era molt elevada, en alguns casos total, el rendiment de producte final obtingut, calculat a partir de les àrees corresponents al CLA i a l'estàndard intern en els cromatogrames de CG, era bastant baix, al voltant d'un 0,1% (soques W303a i  $\Delta$ Elo1) i un 2% en el cas d'utilitzar la soca NCS, la qual presenta un creixement i replicació més elevats. Els resultats aconseguits amb les cèl·lules NCS, tot i que encara estaven molt lluny de tenir una utilitat sintètica, van suposar un impuls per a continuar els estudis amb aquesta soca, tot centrant-nos en la transformació de l'àcid vaccènic en el CLA.

Així, es va passar a incrementar el volum d'incubació, tot utilitzant 50 mL de medi de cultiu en comptes dels 2 mL utilitzats fins ara. En el cas d'utilitzar les soques W303a i  $\Delta$ Elo1 es van aconseguir 4  $\mu$ g de CLA (0,2 nmol de producte/mg de llevat sec), mentre que amb la soca NCS es van obtenir 80  $\mu$ g de CLA (4,0 nmol de producte/mg de llevat sec). Tot i que la conversió seguia essent molt elevada en tots el casos, el rendiment obtingut era encara força baix. Aquests resultats feien pensar que la cèl·lula transformava tot l'àcid vaccènic en el corresponent derivat diènic fins arribar a un nivell de saturació. L'àcid no transformat restava aparentment en el medi de cultiu líquid i podria ser novament aprofitat.

En aquest sentit, es va pensar en realitzar incubacions aproximant-les a un procés en discontinu, de la següent manera: s'iniciaria la primera incubació de la forma habitual i, un cop assolida una fase de creixement estacionari del llevat, aquest es retiraria del medi de cultiu, el qual, tot considerant que encara conté àcid vaccènic es tornaria a inocular amb noves colònies de llevat, de tal forma que, en successives etapes, l'àcid de partida es transformaria totalment en CLA. Finalment, per extracció dels lípids i metanolisi de tota la massa de llevat emprada s'esperaria que el rendiment en àcid diènic s'incrementés.

Aquest procediment s'assajà a una escala de 2 mL. Malauradament, tot i que el llevat va créixer i es va replicar de manera efectiva al llarg de tot l'experiment, la formació del CLA només es produí en la primera incubació. A partir de la segona incubació, els cromatogrames de gasos no mostraren diè final, però tampoc àcid vaccènic de partida. Els resultats foren similars en realitzar les incubacions a diferents temperatures.

Aquest resultat suggeria la possibilitat que el llevat desviés l'excedent d'àcid vaccènic cap a una altra ruta metabòlica, de forma que després de les primeres 24 h d'incubació, tot l'àcid de partida inicial s'havia exhaurit. Una possibilitat força raonable

era que la glucosa present al medi de cultiu s'esgotés transcorregudes unes poques hores d'incubació i el llevat, incapaç de realitzar la respiració, comencés a fermentar, tot consumint l'àcid vaccènic present al medi per  $\beta$ -oxidació[230].

Per tal, tot controlant els nivells de glucosa al medi, juntament amb altres paràmetres que poden resultar importants, seria possible arribar a assolir una conversió completa de l'àcid vaccènic.

En aquests moments es contiuna treballant en aquest tema, tot recollint els experiments futurs en el següent apartat.

### 3.4. EXPERIMENTS FUTURS

Tot i que el mètode de síntesi enzimàtica del CLA comentat en aquest capítol es prometedor, en quant a què forneix l'àcid (*Z,E*)-9,11-octadecadienoic isomèricament pur, cal optimitzar el procediment des de les següents perspectives:

1. S'ha d'incrementar el rendiment mitjançant la utilització de fermentadors que permetin controlar paràmetres crítics com són el grau d'oxigenació, la quantitat de glucosa i el pH del medi, tot possibilitant la realització de reaccions enzimàtiques d'una manera més eficient.
2. Cal posar a punt i optimitzar un procés de purificació, ja que el CLA (o qualsevol dels àcids diènics o enítics aconseguits) s'obté barrejat amb els àcids endògens de les membranes cel·lulars, com són els àcids palmític, esteàric, oleic i palmitoleic. D'acord amb alguns precedents bibliogràfics[220, 231], en experiments realitzats a petita escala, la cromatografia en columna de gel de sílice impregnat amb AgNO<sub>3</sub> va permetre separar el (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoat de metil de la resta d'èsters metílics de l'extracte. Ara bé, aquest mètode es tediós i car, fet que condueix a la recerca de nous mètodes més convenients des del punt de vista industrial. Una possibilitat atractiva, ja descrita a la literatura[223], és la reacció del cru amb urea i posterior cristal·lització, tot aprofitant la capacitat de la urea de formar complexos amb èsters grassos poliinsaturats de forma selectiva depenent de la configuració dels dobles enllaços.

Finalment, els resultats obtinguts en aquesta part de la Tesi obren la possibilitat d'utilitzar el llevat del pa (*S. cerevisiae*) per a obtenir, de forma senzilla i econòmica, àcids grassos i derivats d'interès elevat, com són, per exemple, el CLA i determinades feromones d'insectes (com la feromona sexual de *S. littoralis*, l'àcid (*Z,E*)-9,11-tetradecadienoic o la feromona de les ja esmentades Processionàries, formades en alguns casos per estructures de tipus ení).

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





## **4. ESTUDI COMPARATIU DE LA BIOSÍNTESI DE LES FEROMONES SEXUALS DE THAUMETOPOEA PITYOCAMPA I THAUMETOPOEA PROCESSIONEA.**

### **4.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS**

#### **4.1.1. Introducció**

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

Ambdues espècies no representen un perill important en el seu estat de papallona. Ara bé, en la fase d'eruga, esdevenen una plaga molt danyosa tant per pinedes, en el cas de la processionària del pi, com per rouredes, en el cas de les processionàries del roure (Figura 4.1). A més de constituir una important plaga per aquestes coníferes i arbres de fulles marcescents o caduques, aquests insectes originen problemes en la salut de les persones, degut a la presència d'un seguit de pèls especialment al·lèrgics, que apareixen a mode de defensa quan es troben en el seu estat nimfal, pèls que produeixen irritacions dèrmiques de caràcter sever i, en casos extrems, greus afeccions als ulls.



---

**Figura 4.1** Fotografia d'una femella de processionària del roure.

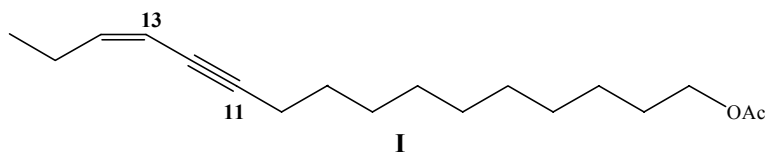
En general, tot atenent a les diferents estructures químiques emprades com a feromona sexual, un estudi comparatiu revela l'existència de dos grups diferenciats dins el gènere *Thaumetopoea*[232]:

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

#### **4.1.1.1. La processionària del pi**

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

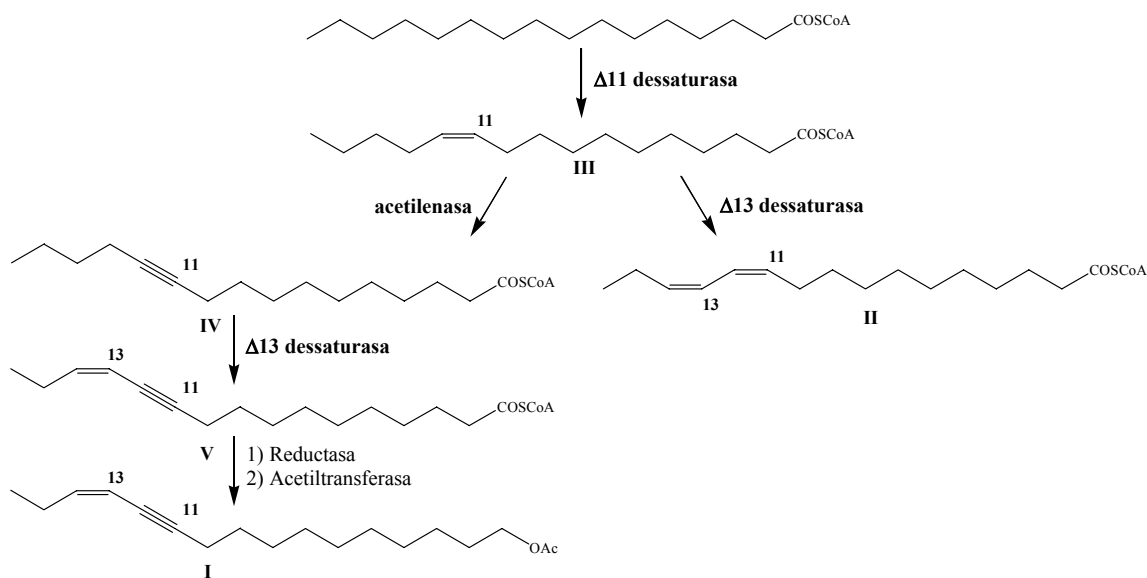
L'any 1981, Guerrero i col<sup>[233]</sup> van identificar l'acetat de (*Z*)-13-hexadecen-11-inil (**I**) com a component únic de la feromona sexual de la processonària del pi. Era el primer exemple d'una feromona sexual amb estructura d'ení (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Estructura de tipus ení corresponent a la feromona sexual de la processonària del pi.

A partir d'aquest descobriment i durant els anys posteriors es va estudiar intensament la biosíntesi d'aquest component a la glàndula feromonal de l'insecte, tot arribant a la conclusió, mitjançant un seguit d'estudis realitzats amb precursors marcats amb deuteri i amb isòtops radioactius<sup>[39, 234, 235]</sup>, que la biosíntesi començava a partir de l'àcid palmític, el qual era dessaturat en la posició 11 mitjançant el concurs d'una  $\Delta 11$  dessaturasa, tot fornint l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic **III** (Figura 4.3).

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



**Figura 4.3** Biosíntesi de la feromona sexual de la processionària del pi.

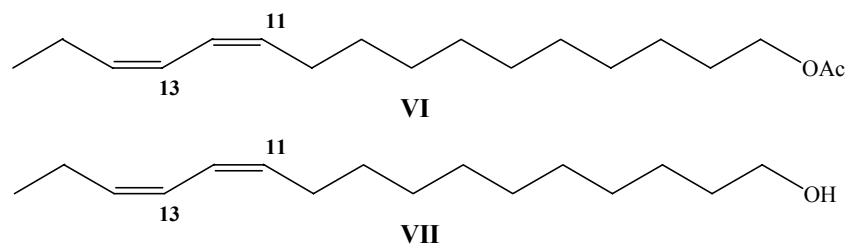
Dos trets mereixen ser destacats en aquesta ruta:

- Tot i que el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat de metil ha estat identificat en els extractes lipídics glandulars esterificats amb KOH/MeOH[234], els corresponents acetat, alcohol o aldehid no es troben presents en la feromona sexual[236]; de la mateixa manera succeeix amb l'acetilè, suggerint la presència d'una reductasa específica de l'ení.
- Per altra banda, es podria pensar que el dienoat **II** podria ser el precursor de l'ení mitjançant l'acció de l'acetilnasa. Tanmateix, s'ha comprovat que el precursor real del component majoritari és l'àcid 11-hexadecinoic (**IV**), intermedi format per l'acció, aquest cop sí, de l'acetilnasa[235] sobre l'àcid (Z)-11-hexadecenoic (**III**).

#### 4.1.1.2. La processionària del roure

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

En el seu complex feromonal<sup>[232]</sup> s'ha identificat l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil (**VI**) i el corresponent alcohol lliure (**VII**) en una proporció 9:1 (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Estructura dels components identificats en la feromona sexual de la processionària del roure.

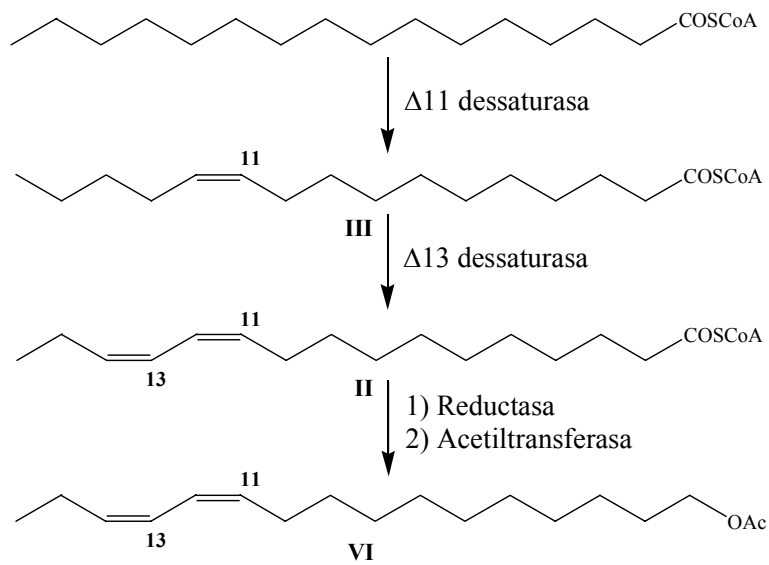
Com es pot observar, mentre que la processionària del pi presenta el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat a la glàndula feromonal, la seva feromona no conté els corresponents alcohol, aldehyd o acetat. En canvi, la processionària del roure no disposa de cap estructura de tipus ení, per bé que és capaç de biosintetitzar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

#### 4.1.2. Objectius

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

1. Desxiframent de la ruta biosintètica que rendeix el component majoritari de la feromona sexual de processionària del roure, l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil (**VI**). Com a hipòtesi de treball, la ruta biosintètica proposada parteix de l'àcid palmític, el qual, mitjançant successives dessaturacions en les posicions 11 i 13, utilitzant sengles  $\Delta_{11}$  i  $\Delta_{13}$  dessaturases, respectivament, condueix a l'intermedi diènic el qual és finalment reduït i acetilat per donar el component majoritari (**VI**), tal com es pot veure a la Figura 4.5.
2. Estudi de les bases bioquímiques que regeixen la variació fenotípica trobada en ambdues espècies pel que fa a les estructures dels seus components feromonals. És a dir, quin són els factors que determinen que la processionària del roure no utilitzi

una estructura de tipus ení i per què la processionària del pi no presenta cap derivat del (Z,Z)-11,13-hexadecadienoat.



**Figura 4.5** Ruta biosintètica proposada per a la formació del complex feromonal en *T. processionea*.

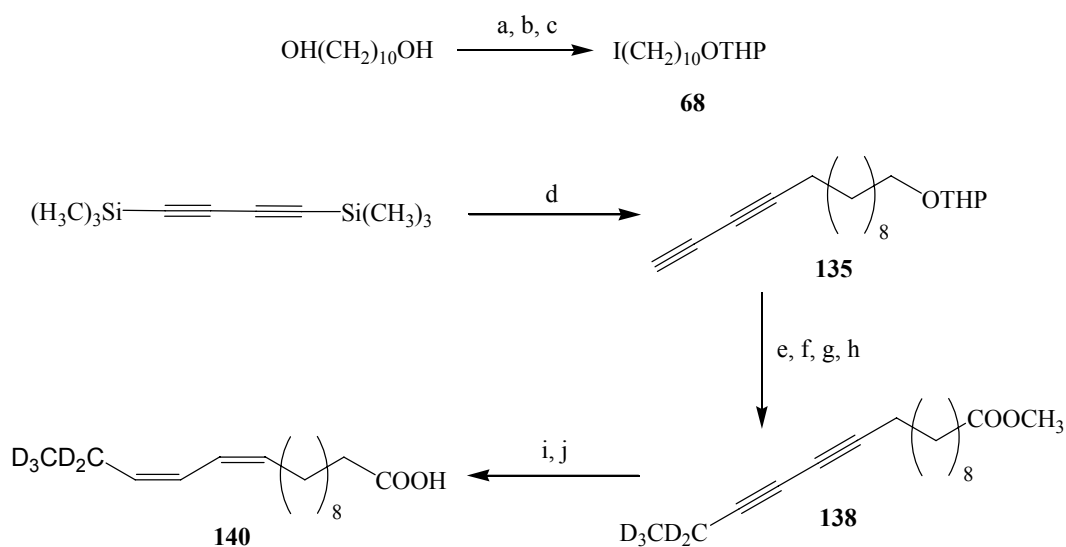
## 4.2. RESULTATS

### 4.2.1. Síntesi de l'àcid 140

Per tal de portar a terme l'estudi de la biosíntesi de la feromona sexual era necessari disposar de tots els possibles precursors marcats, com són l'àcid [16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-hexadecanoic (d<sub>3</sub>16:Acid), per tal de veure quants compostos marcats es formaven a partir del precursor inicial, l'àcid [13,13,14,14,15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>]-(*Z*)-11-hexadecenoic (d<sub>9</sub>(*Z*)-11-16:Acid), per tal de demostrar l'activitat Δ<sup>13</sup> dessaturasa, que forneix el diè majoritari i l'àcid [15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-(*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic (d<sub>5</sub>(*Z,Z*)-11,13-16:Acid), a fi de demostrar que aquest diè és el precursor immediat de l'acetat.

Al nostre laboratori es disposava tant del d<sub>3</sub>16:Acid com del d<sub>9</sub>(*Z*)-11-16:Acid, però s'havien exhaurit les existències d'àcid diènic marcat **140** (d<sub>5</sub>(*Z,Z*)-11,13-16:Acid), el qual es va haver de sintetitzar de nou seguint el procediment descrit al nostre grup de treball per la Dra M. Barrot[155, 235].

A continuació s'explicarà de forma breu la síntesi del compost **140** (Figura 4.6).



*Reactius i condicions:* (a) HBr (48%), toluè, 2 h 30 min, 130°C, (**40**, 93%); (b) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, DHP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 h, 0°C, (**65**, 95%); (c) NaI, acetona, 16 h, 65-70°C, (**68**, 86%); (d) CH<sub>3</sub>Li·LiBr, THF, -78°C a ta, 4 h, llavors, **68**, DMPU, -78°C a ta, 16 h, (**135**, 72%); (e) *n*-BuLi, THF, 2 h, -25°C, llavors CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>I, HMPA, -25°C a ta, 5 h, llavors, (f) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>OH, 16 h, ta, (**137**, 40%); (g) PDC, DMF, 16 h, ta, llavors, (h) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>I, DMF, 16 h, ta, (**138**, 66%); (i) Zn(Ag/Cu), CH<sub>3</sub>OH, H<sub>2</sub>O, 3 dies, ta, (**139**, 58%); (j) KOH, CH<sub>3</sub>OH, H<sub>2</sub>O, 16 h, ta, (**140**, 78%).

**Figura 4.6** Esquema sintètic d'obtenció de l'àcid diènic marcat **140**.

El compost clau de la síntesi és l'alcohol protegit **135**, que presenta en la seva estructura dos alquins conjugats, els quals rendiran, mitjançant reducció posterior, el diè conjugat de configuració (*Z,Z*). Aquest compost **135** es sintetitza a través de la reacció de l'anió del 1,4-bis(trimetilsilil)-1,3-butadií, generat amb el complex CH<sub>3</sub>Li·LiBr, amb el iodur d'alquil **68**, format a partir de l'1,10-decandiòl, mitjançant una seqüència de reaccions ja explicades en aquesta memòria.

Així, 1,0 mmol d'1,4-bis(trimetilsilil)-1,3-butadií es dissolen en THF sec, es refreda la solució a -78°C i s'addiciona 1,0 mmol de CH<sub>3</sub>Li·LiBr (1,1 M en Et<sub>2</sub>O). Després de 4 h a ta, es torna a refredar a -78°C i s'afegeix 1,0 mmol del iodur **68** dissolt en DMPU. La reacció es deixa evolucionar durant 16 h a ta, es tracta i el cru obtingut es purifica tot obtenint 0,69 mmol de bisalquí **135** amb un rendiment del 72%. Sorprenentment, al mateix temps que l'alquilació, també es va produir la desprotecció del dií terminal. Val a dir que l'ús d'HMPA en comptes de DMPU no proporciona els mateixos resultats, tot obtenint el mateix producte **135**, però amb un grup metil en la posició 14 de la cadena hidrocarbonada, en un rendiment considerable.

Posteriorment, l'alquilació d'aquest alquí amb el iodur de [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>-1,1,2,2,2]-metil, seguit de desprotecció del grup tetrahidropiranyl, oxidació de l'alcohol generat amb PDC/DMF i esterificació de l'àcid emergent amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>I, condueix a la formació de l'alquí conjugat **138**, proveït amb les corresponents marques de deuteri.

La reducció de **138** al corresponent diè conjugat de configuració (*Z,Z*) va ser portada a terme mitjançant el tractament amb Zn(Cu/Ag), seguint un procediment descrit per Avignon-Tropis i Pougny<sup>[237]</sup>. Val a dir que la transformació es troba molt influenciada pel tipus de metall utilitzat i que l'activació prèvia del Zn amb àcid clorhídric és del tot necessària per aconseguir una reducció completa de l'alquí a l'alquè conjugat. Emprant Zn no activat, s'arriba a una mescla dels dos possibles enins, els quals no són reduïts totalment als corresponents diens. Tot seguint la metodologia descrita a la part experimental d'aquesta memòria s'obtingué el diè **139** de configuració (*Z,Z*), geometria confirmada per RMN de <sup>1</sup>H.

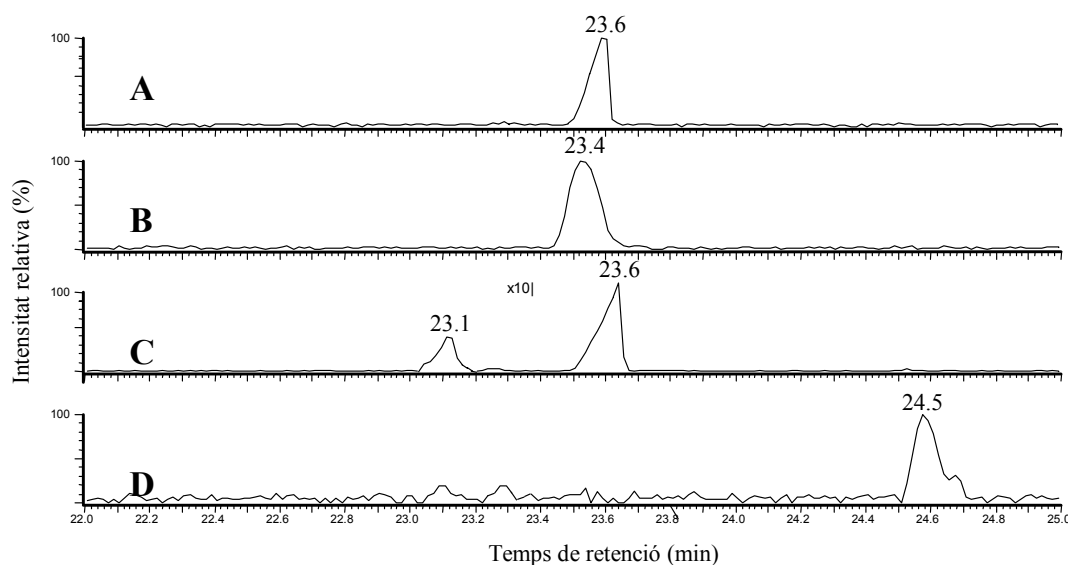
Finalment, la hidròlisi de l'èster metílic a àcid mitjançant el tractament amb KOH/MeOH, condueix a la formació de l'àcid diènic deuterat **140** amb un rendiment global des de **68** del 9%.



#### 4.2.2. Estudis de marcatge

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

En els primers experiments, es va determinar la incorporació de marcatge en intermedis biosintètics a partir del  $d_3$ 16:Acid i del  $d_9$ (Z)-11-16:Acid. Un cop finalitzades les incubacions, es van tallar les glàndules feromonals, s'extragueren els lípids i els extractes lipídics es metanolitzaren tal com s'especifica a la part experimental. Els extractes resultants, que contenen els èsters metílics dels àcids grassos que componen els lípids glandulars, s'analitzaren per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (CG-EM) en mode SIM, tot seleccionant les masses dels diferents èsters metílics marcats (273,  $d_3$ 16:Me i  $d_7$ (Z,Z)-11,13-16:Me; 271,  $d_3$ (Z)-11-16:Me; 269,  $d_3$ (Z,Z)-11,13-16:Me; 277,  $d_9$ (Z)-11-16:Me).

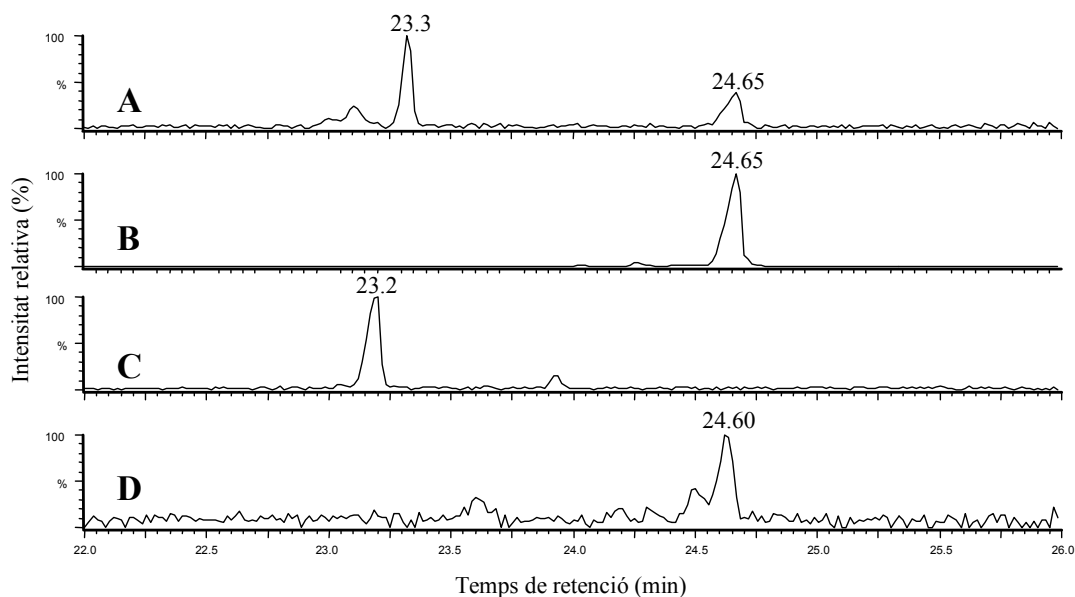


**Figura 4.7** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *T. processionea* tractades amb  $d_3$ 16:Acid (cromatogrames B-D) o amb dimetilsulfòxid (control) (cromatograma A). Els productes que es mostren en els cromatogrames són:  $d_3$ 16:Me ( $m/z=273$ ,  $t_R=23,4$  min, cromatograma B); (Z)-[16,16,16- $^2H_3$ ]-11-hexadecenoat de metil ( $m/z=271$ ,  $t_R=23,1$  min, cromatograma C); (Z,Z)-[16,16,16- $^2H_3$ ]-11,13-hexadecadienoat de metil ( $m/z=269$ ,  $t_R=24,5$  min, cromatograma D). El palmitoat de metil natural elueix a un  $t_R=23,6$  min ( $m/z = 270$ , cromatogrames A i C).

En el cas d'utilitzar el  $d_3$ 16:Acid com a precursor deuterat, els cromatogrames de CG-EM revelaren la formació de dos productes no presents als controls (Figura 4.7), de  $m/z$  271 i 269, els quals eluïen poc abans del (Z)-11-hexadecenoat de metil i el (Z,Z)-

11,13-16:Me endògens, respectivament, i que per tant, es van atribuir als corresponents èsters metílics deuterats. Aquest resultat demostrava que l'àcid palmític era el precursor dels àcids (*Z*)-11-hexadecenoic i (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic.

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



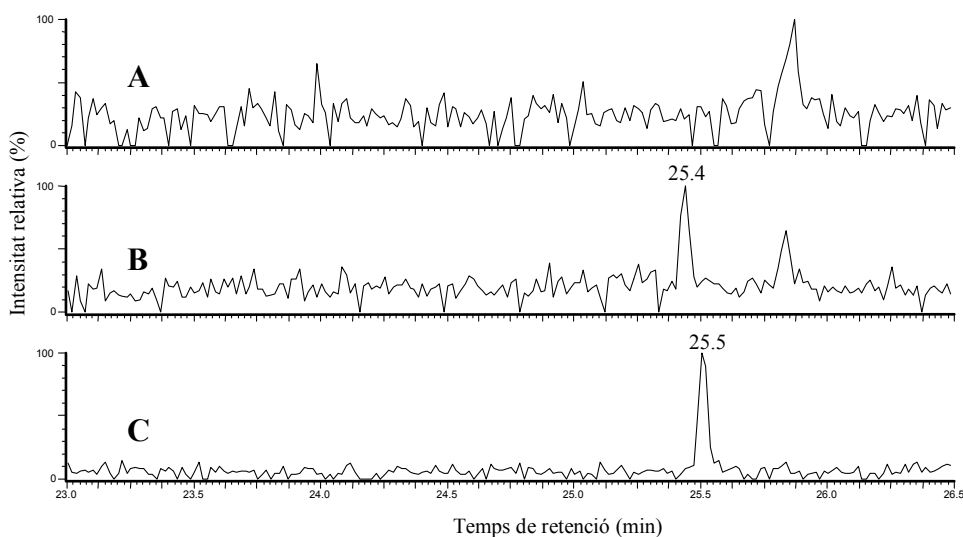
**Figura 4.8** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *T. processionea* tractades amb  $d_9$ (*Z*)-11-16:Acid (cromatogrames C i D) o amb dimetilsulfòxid (control, cromatogrames A i B). Els productes que es mostren en els cromatogrames són:  $d_9$ (*Z*)-11-16:Me ( $m/z=277$ ,  $t_R=23,2$  min, cromatograma C);  $d_7$ (*Z,Z*)-11,13-16:Me ( $m/z=273$ ,  $t_R=24,60$  min, cromatograma D); (*Z*)-11-16:Me ( $m/z=268$ ,  $t_R=23,3$  min, cromatograma B); (*Z,Z*)-11,13-16:Me ( $m/z = 266$ ,  $t_R=24,65$  min, cromatograma A).

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

Per tant, la ruta biosintètica proposada per a la formació de la feromona sexual de l'espècie *T. processionea* és l'anteriorment mostrada a la Figura 4.5 (pàgina 176). Tot partint de l'àcid palmític, una  $\Delta_{11}$  dessaturasa transforma aquest en l'àcid monoènic **III**, el qual és dessaturat de nou, aquest cop en la posició 13 a través d'una  $\Delta_{13}$  dessaturasa.

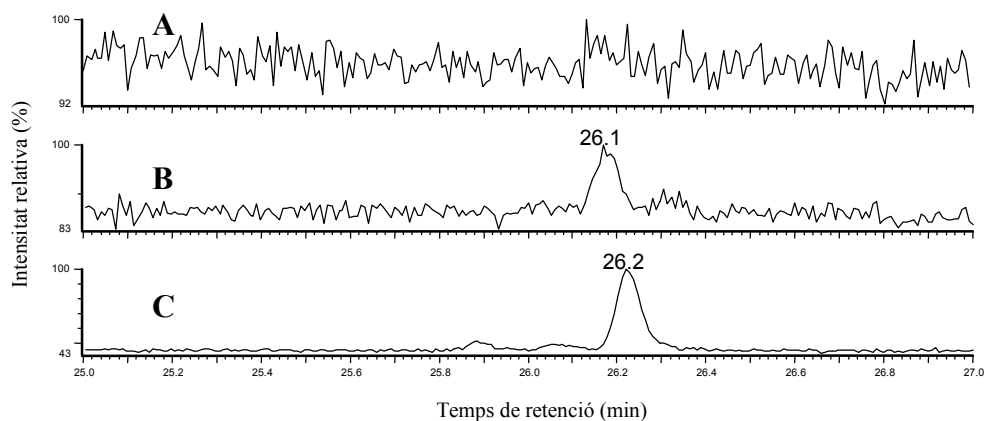
A fi de demostrar que l'àcid diènic (**II**) és reduït i acetilat a la feromona final, en una segona tanda d'experiments es va investigar la formació de feromona deuterada a partir del  $d_5(Z,Z)$ -11,13-16:Acid. En aquest cas, un cop finalitzades les incubacions, es van separar les glàndules feromonals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

Existeixen precedents bibliogràfics que demostren que la formació de feromona marcada a partir de qualsevol precursor requereix l'estimulació amb el pèptid activador de la biosíntesi<sup>[238]</sup> (PBAN, *Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide*). Aquest el es cas, per exemple, de la processonària del pi<sup>[145]</sup>. Per tant, els experiments es van repetir tot introduint una etapa d'estimulació de la biosíntesi per injecció de PBAN. En aquest cas, sí que es va detectar la feromona deuterada en les anàlisis per CG-EM (Figura 4.9) on es constata, en els cromatogrames corresponents, la presència d'un producte a  $m/z$  285, absent en els controls (incubació amb DMSO i estimulació amb PBAN), que presentava un temps de retenció lleugerament inferior al de l'acetat de  $(Z,Z)$ -11,13-hexadecadienil i que, per tant, s'assignà a la feromona pentadeuterada.



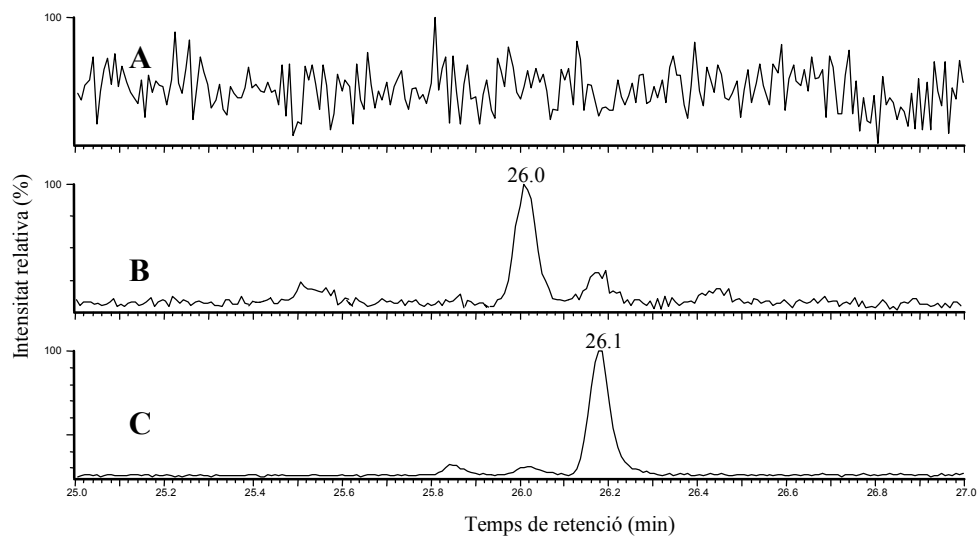
**Figura 4.9** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb  $d_5(Z,Z)$ -11,13-16:Acid i a continuació, amb PBAN (cromatogrames B i C) o amb dissolució salina (cromatograma A). En el cromatograma B es mostra l'acetat de  $d_5(Z,Z)$ -11,13-hexadecadienil a un a un  $t_R=25,4$  min ( $m/z$  285), mentre que en el cromatograma C es mostra el diè natural a un  $t_R=25,5$  min ( $m/z$  280).

La mateixa metodologia experimental es va aplicar després d'incubar les glàndules feromonals amb  $d_3$ 16:Acid i  $d_9$ (Z)-11-16:Acid. En ambdós casos, en els cromatogrames de CG-EM corresponents, s'observà la presència d'un producte a  $m/z$  283 (incubacions amb  $d_3$ 16:Acid, Figura 4.10) o 287 (incubacions amb  $d_9$ (Z)-11-16:Acid, Figura 4.11), ambdós absents en els controls (incubació amb DMSO i estimulació amb PBAN), que eluïa poc abans que l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil. Per tant, ambdós productes s'assignaren als acetats marcats en cada cas.



**Figura 4.10** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb  $d_3$ 16:Acid i a continuació, amb PBAN (cromatogrames B i C) o amb dissolució salina (cromatograma A). Es mostra l'acetat de  $d_3$ (Z,Z)-11,13-hexadecadienil a un  $t_R=26,1$  min ( $m/z$  283), i el diè natural a un  $t_R=26,2$  min ( $m/z$  280).

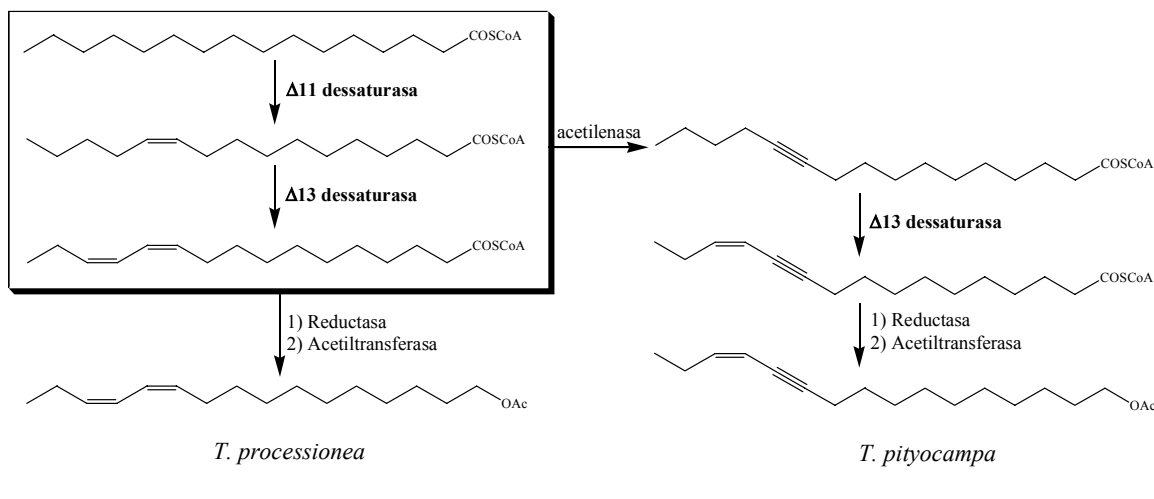
Tot atenent els resultats obtinguts, es fa palès que ambdues espècies d'insectes biosintetitzen les seves feromones sexuals a partir de l'àcid palmític, el qual és dessaturat mitjançant una  $\Delta 11$  dessaturasa a àcid (Z)-11-hexadecenoic (**III**). Aquest àcid és dessaturat de nou, aquest cop en la posició 13 mitjançant una  $\Delta 13$  dessaturasa, que fins el moment no s'ha descrit en cap altre ésser viu, tot fornint l'àcid diènic (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic (**II**), tal com es mostra a la Figura 4.12 (pàgina 184).



**Figura 4.11** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb  $d_9(Z)$ -11-16:Àcid i a continuació amb PBAN (cromatogrames B i C) o amb dissolució salina (cromatograma A). Es mostra l'acetat de  $d_7(Z,Z)$ -11,13-hexadecadienil a un a un  $t_R=26,0$  min ( $m/z$  287), i el diè natural a un  $t_R=26,1$  min ( $m/z$  280).

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

Ara bé, en aquest darrer insecte, ni l'àcid dienoic II, ni cap dels intermedis biosintètics ha pogut ser detectat en els extractes feromonal en forma d'acetat, alcohol o qualsevol altra forma reduïda del grup carboxilat<sup>[236]</sup>. Contràriament, en *T. processionea*, aquest àcid dienoic conjugat és reduït i acetilat per donar el compost majoritari de la feromona sexual.

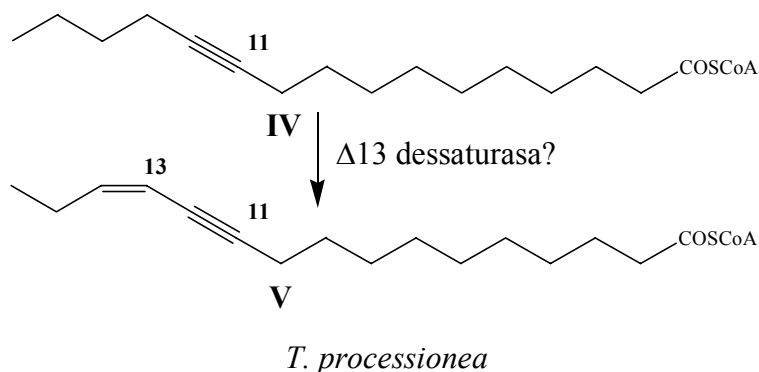


**Figura 4.12** Comparació de les rutes biosintètiques de *T. processionea* i *T. pityocampa*. A l'interior del quadre es troben els intermedis comuns en ambdues espècies.

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

#### 4.2.3. Formació de l'ení V en *T. processionea*

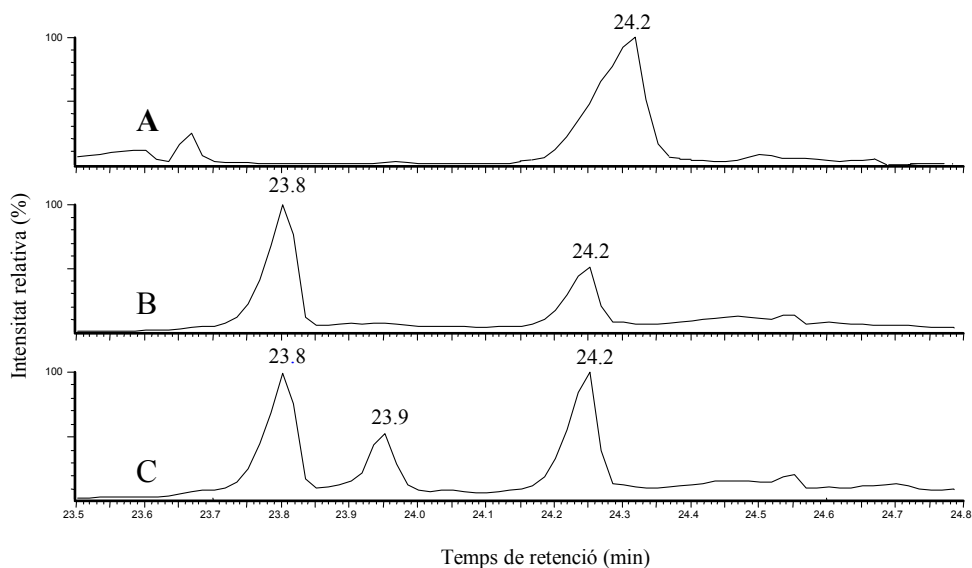
Una de les qüestions plantejades era si la *T. processionea*, la qual disposa d'una  $\Delta 13$  desaturasa, igual que la *T. pityocampa*, és capaç de desaturar un precursor acetilènic per donar l'estructura d'ení, tal com succeeix en la processionària del pi. (Figura 4.13). A fi d'investigar aquesta possibilitat, es van realitzar assaigs *in vivo*, tot incubant glàndules feromonals de *T. processionea* amb l'àcid 11-hexadecinoic (IV).



**Figura 4.13** Possible dessaturació de l'alquí **IV** en femelles de *T. processionea*, mitjançant la  $\Delta 13$  dessaturasa, per obtenir el corresponent ení **V**, present en femelles de *T. pityocampa*.

Els teixits es tractaren de la forma habitual per tal d'obtenir els èsters metílics dels intermedis biosintètics. En les anàlisis per CG-EM, els extractes de teixits tractats amb l'alquí presentaven dos nous productes no presents als extractes control, que corresponien, d'una forma inequívoca per comparació amb una mostra sintètica, al (*Z*)-13-hexadecen-11-inoat de metil (**V**) i a l'11-hexadecinoat de metil de partida (**IV**) tal com es pot apreciar a la Figura 4.14.

Per tant, quedava demostrat que la  $\Delta 13$  dessaturasa de *T. processionea*, era capaç d'actuar, de la mateixa forma que la  $\Delta 13$  dessaturasa de *T. pityocampa*, sobre una unitat d'11-hexadecinoat tot rendint l'ení corresponent.

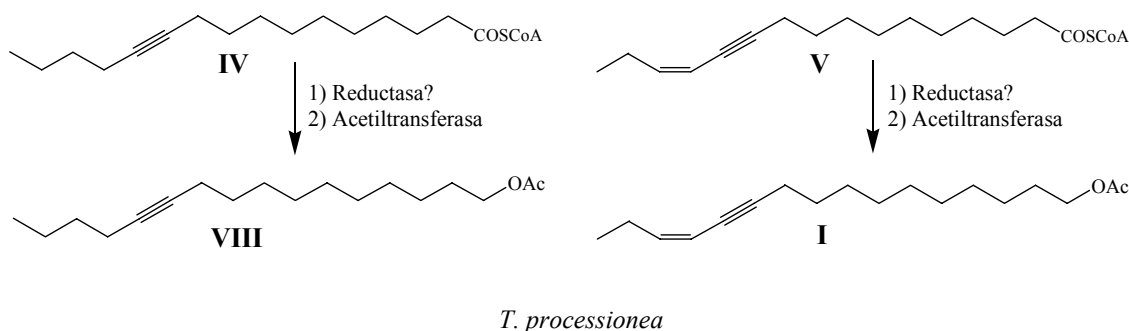


**Figura 4.14** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *T. processionea* tractades amb l'àcid 11-hexadecinoic (**IV**) (cromatogrames B i C) o amb dimetilsulfòxid (control) (cromatograma A). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: 11-hexadecinoat de metil ( $m/z=81$ ,  $t_R=23,8$  min, cromatograma B); (*Z*)-13-hexadecen-11-inoat de metil ( $m/z=79$ ,  $t_R=23,9$  min, cromatograma C). El de (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoat de metil natural elueix a un  $t_R=24,2$  min ( $m/z$  280).

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

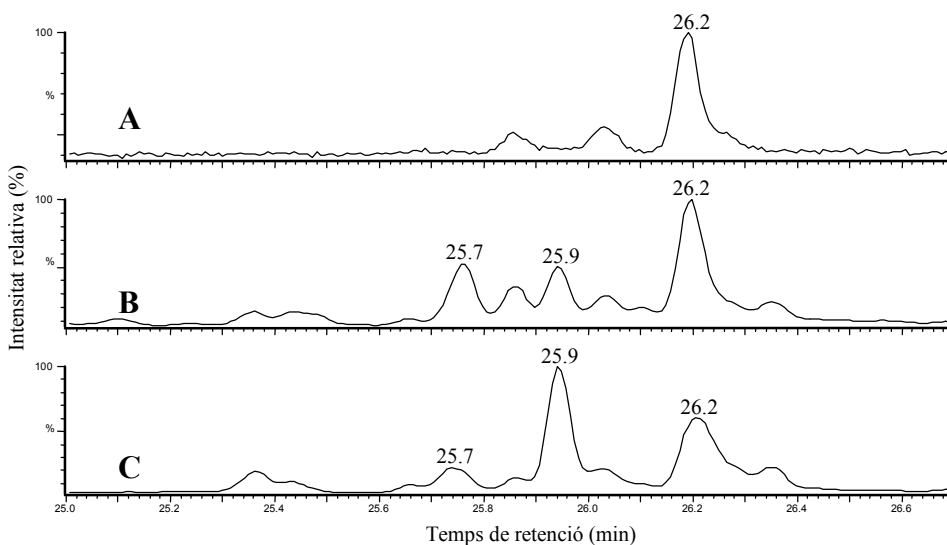
Com s'ha esmentat més amunt, la *T. processionea*, però no la *T. pityocampa*, és capaç de reduir l'àcid (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic (**II**) a l'alcohol precursor de la seva feromona (**VII**). Una altra de les qüestions a resoldre era si, a diferència de la *T. pityocampa*, la *T. processionea* era capaç de reduir tant l'11-hexadecinoat (**IV**) com el (*Z*)-13-hexadecen-11-inoat (**V**) als corresponents alcohols **VIII** i **I**, respectivament, si s'administraven de forma exògena. (Figura 4.15).





**Figura 4.15** Possible reducció i acetilació en *T. processionea* dels intermedis presents a *T. pityocampa* (IV i V).

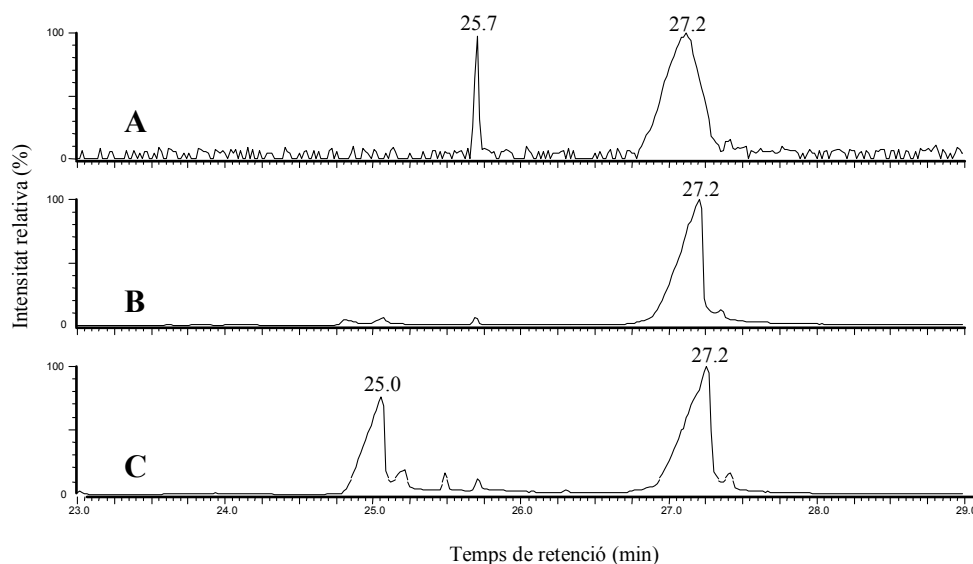
Es van realitzar experiments similars als descrits a l'apartat 4.2.2, però amb els àcids 11-hexadecinoic (IV) i (*Z*)-13-hexadecen-11-inoic (V), tot estimulant la producció de feromona per injecció de PBAN i tractant els teixits per tal d'obtenir la feromona sexual.



**Figura 4.16** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb àcid 11-hexadecinoic (cromatogrames B i C) o amb dimetilsulfòxid (cromatograma A) i posteriorment injectades amb PBAN (no es mostra el cromatograma control sense PBAN). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: l'acetat d'11-hexadecinil, a un  $t_R=25,7$  min ( $m/z=81$ , cromatograma C); l'acetat de (*Z*)-13-hexadecen-11-inil, a un  $t_R=25,9$  min ( $m/z=79$ , cromatograma C); i el diè natural, l'acetat de (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienil, a un  $t_R=26,2$  min ( $m/z=280$ , cromatograma A).

Els extractes orgànics van ser analitzats per CG-EM. En el cas de l'àcid 11-hexadecinoic (IV), els cromatogrames de CG-EM (Figura 4.16) presentaven dos productes, absents en els extractes control, que s'assignaren, per comparació tant dels temps de retenció com dels espectres de masses amb mostres sintètiques, als dos acetats VIII i I. El primer procediria de la reducció i acetilació successives de l'àcid 11-hexadecinoic (IV) i el segon, de la reducció i acetilació de l'àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic (V), format *in vivo* per acció de la  $\Delta$ 13 dessaturasa sobre l'alquí subministrat.

Per altra banda, en el cas de la utilització de l'ení V com a substrat de partida, també aquí els cromatogrames de CG-EM presentaven un nou producte, no detectable en els controls, que corresponia a l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil (I), feromona sexual de *T. pityocampa*, tal com es pot observar a la Figura 4.17.

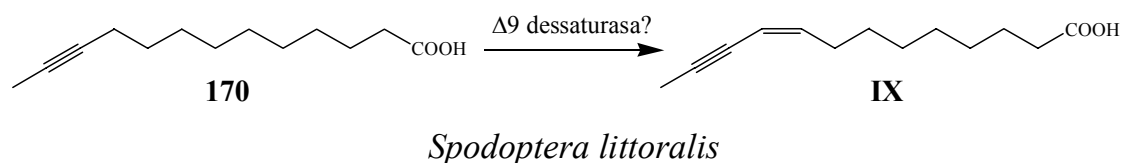


**Figura 4.17** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes de feromona de femelles de *T. processionea* tractades amb àcid (Z)-13-hexadecen-11-inoic (cromatogrames B i C) o amb dimetilsulfòxid (cromatograma A) i posteriorment injectades amb PBAN (cromatogrames A i C) o amb dissolució salina (cromatograma B). Els productes que es mostren en els cromatogrames són l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil, a un  $t_R=25,0$  min (cromatograma C) i el diè natural, l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil, a un  $t_R=25,7$  min (cromatograma A).

#### 4.2.5. Formació de l'àcid (Z)-9-tridecen-11-inoic (IX) a partir de l'àcid 11-tridecinoic (170) en *S. littoralis*

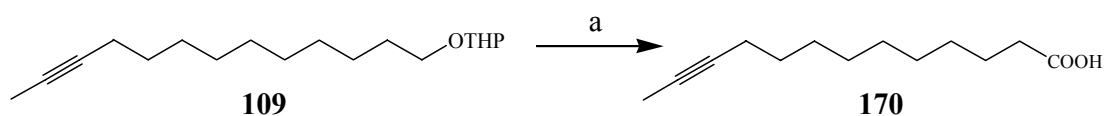
Arribat a aquest punt, es va pensar en la possibilitat que una espècie filogenèticament allunyada de les processionàries fos capaç de produir l'estructura

d'ení, tan característica d'una part de la família de les Thaumetopoiedae. Es va escollir, per disponibilitat al nostre grup, l'espècie *S. littoralis*, de la família dels Noctuidae. Aquesta arna biosintetitza la seva barreja feromonal tot combinant reaccions de dessaturació i de  $\beta$ -oxidació (vegeu Figura 1.8, pàgina 18). Entre les dessaturases implicades, hi ha una  $\Delta 9$  dessaturasa que transforma l'àcid (*E*)-11-tridecenoic (**131**) en l'àcid (*Z,E*)-9,11-tridecadienoic. Per tant, es va plantejar determinar si aquesta  $\Delta 9$  dessaturasa era capaç de catalitzar la formació de l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic (**IX**) a partir de l'àcid 11-tridecinoic (**170**) tal com es mostra a la Figura 4.18.



**Figura 4.18** Possible formació d'una estructura d'ení (**IX**) en l'espècie *S. littoralis* a partir de l'àcid acetilènic **170** per acció de la  $\Delta 9$  dessaturasa.

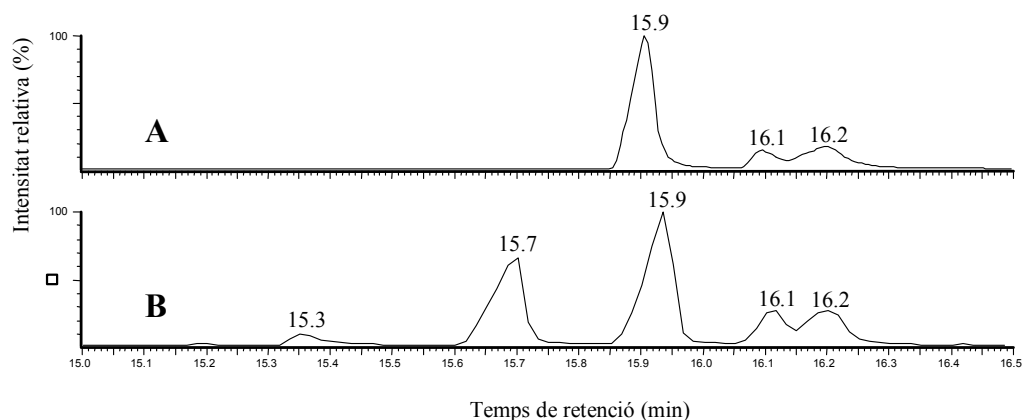
Com que al laboratori es disposava de l'alcohol protegit **109**, l'obtenció de **170** fou senzilla. Aquest es va formar per desprotecció en medi àcid de **109** i ulterior oxidació mitjançant el reactiu de Jones tal com mostra la Figura 4.19.



*Reactius i condicions:* (a)  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , acetona, 16 h, ta, (**170**, 70%)

**Figura 4.19** Síntesi de l'àcid alquínic **170**

Es van realitzar els experiments de forma similar als descrits a l'apartat 4.2.3, però amb l'àcid 11-tridecinoic (**170**). Després d'extreure els lípids glandulars i formar els èsters metílics, els extractes es van analitzar per CG-EM. Els cromatogrames mostraven un nou producte, no present en els extractes control, el qual es va atribuir, d'acord amb l'espectre de masses, i per comparació del seu comportament cromatogràfic amb el d'altres enins, a l'èster metílic de l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic (**IX**), tal com s'observa a la Figura 4.20.



**Figura 4.20** Cromatogrames de CG-EM corresponents a extractes lipídics metanolitzats de glàndules feromonals de femelles de *S. littoralis* tractades amb l'àcid 11-tridecinoic (**170**) (cromatograma B) o amb dimetilsulfòxid (control) (cromatograma A). Els productes que es mostren en els cromatogrames són: 11-tridecinoat de metil, a un  $t_R=15,3$  min (cromatograma B) i (*Z*)-9-tridecen-11-inoat de metil a un  $t_R=15,7$  min (cromatograma B).

### 4.3. DISCUSSIÓ

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

Pel que fa al primer punt, el component majoritari de la feromona sexual de la processionària del roure es sintetitza de forma anàloga al diè intermedi present en la processionària del pi, espècie de la mateixa família. Així, l'àcid palmític és dessaturat en la posició 11 mitjançant el concurs d'una  $\Delta 11$  dessaturasa, obtenint-se l'àcid (Z)-11-hexadecenoic (III), el qual és subsegüentment dessaturat en la posició 13 mitjançant una  $\Delta 13$  dessaturasa, per fornir l'àcid (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic (II). A diferència de la processionària del pi, en aquest cas l'àcid dienoic és reduït a alcohol per mitjà d'una reductasa i acetilat amb una acetiltransferasa, tot conduint al component actiu (VI) majoritari de la feromona sexual (vegeu Figura 4.5, pàgina 176).

Per altra banda, la regulació de la biosíntesi de la feromona sexual en Lepidòpters està, en general, regulada per una neurohormona present al cervell de l'insecte anomenada neuropèptid activador de la biosíntesi de feromones (PBAN, *pheromone biosynthesis-activating neuropeptide*), la qual és capaç d'induir la producció feromonal[238].

Els resultats obtinguts per diferents grups de recerca indiquen que el PBAN activa una etapa concreta de la seqüència biosintètica. En algunes espècies, el punt d'activació es troba abans de l'inici de la biosíntesi, probablement a nivell de la formació o aportació del primer precursor acílic, com és el cas dels lepidòpters *H. zea* i *A. velutinana*[239, 240]. En altres espècies, el PBAN activa una reacció enzimàtica entre la transformació del darrer precursor biosintètic i l'alcohol que se'n deriva, probablement la reductasa[32]. Finalment, en una altra espècie de lepidòpter, com és la *S. nonagrioides*, s'ha demostrat que el PBAN regula l'acetiltransferasa que transforma el (Z)-11-hexadecenol en el corresponent acetat[241].

A la vista dels resultats aconseguits en aquesta Tesi, es pot assegurar que la producció de feromona en femelles de *T. processionea* es troba regulada pel PBAN. Així, les quantitats de feromona sexual que s'extreuen de glàndules feromonals en

fotofase ( $1,8 \pm 0,3$  ng/femella,  $n=8$ ) són significativament més baixes que si s'estimula la biosíntesi per injecció d'aquesta hormona ( $18,3 \pm 3,3$  ng/femella,  $n=12$ ). D'altra banda, la formació de feromona marcada en fotofase a partir de qualsevol dels intermedis deuterats administrats només té lloc per estimulació de la biosíntesi amb PBAN. Aquests resultats indiquen que l'activació de la seqüència biosintètica es produeix després de la formació del darrer precursor, l'àcid (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic (**II**).

En experiments realitzats alguns anys enrera al nostre laboratori (E. Mas, resultats sense publicar), es va demostrar que l'acetilació del (Z,Z)-11,13-hexadecadienol, aplicat tòpicament sobre el teixit glandular, es produïa independentment del moment del fotoperíode, la qual cosa indicava que, d'acord amb els resultats obtinguts en altres espècies, l'acetiltransferasa no estava regulada hormonalment. Així doncs, el conjunt de resultats obtinguts suggereixen que el PBAN activa el pas de reducció del dienoat **II** a l'alcohol **VII**, catalitzat per una reductasa, de la mateixa forma que succeeix en altres espècies de lepidòpters[32, 145, 242, 243].

Des d'un punt de vista estructural, la feromona sexual emesa per les femelles de les espècies *T. pityocampa* i *T. processionea* presents a l'àrea del Mediterrani, està formada per diens o enins conjugats de cadenes hidrocarbonades de 16 àtoms de carboni de llargada[232], amb les insaturacions localitzades sobre els àtoms C11 i C13. Per tal d'investigar les bases bioquímiques d'aquesta variació de caràcter fenotípic, s'ha realitzat un estudi comparatiu de les rutes biosintètiques tant de la processionària del roure com de la del pi, les quals condueixen a l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil (**VI**) i l'acetat de (Z)-13-hexadecen-11-inil (**I**), respectivament.

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

Ara bé, quan l'àcid 11-hexadecinoic (**IV**) propi de *T. pityocampa* és administrat a *T. processionea*, aquesta espècie és capaç de dessaturar-lo en la posició 13 per produir l'ení. A més, l'eninoat fou transformat en el corresponent acetat, demostrant que tant la  $\Delta 13$  dessaturasa, la reductasa com l'acetiltransferasa presents en la glàndula feromonal de la processionària del roure són capaces de transformar els intermedis biosintètics de la processionària del pi en els corresponents acetats. Per tant, la reductasa de la

processionària del roure és poc específica envers el substrat i l'absència d'ení en la feromona sexual d'aquest insecte és deguda a la manca d'activitat acetilenasa.

Interessantment, ni l'acetat d'11-hexadecinil (**VIII**) ni l'acetat de (Z,Z)-11,13-hexadecadienil (**VI**) són formats a la glàndula feromonal de *T. pityocampa*, ja sigui a partir dels corresponents precursors endògens o després d'administrar tant l'àcid 11-hexadecinoic com el (Z,Z)-11,13-hexadecadienoic[39, 145, 235]. Per tant, tot i que la *T. processionea* és capaç de produir la feromona sexual de la *T. pityocampa*, prèvia administració de l'àcid 11-hexadecinoic, les femelles de *T. pityocampa* no poden produir la feromona sexual de l'espècie relacionada, malgrat disposar dels precursor adequats a la glàndula feromonal.

D'acord amb alguns estudis que addueixen la manca d'especificitat de les acetiltransferases[244-247], la *T. pityocampa* acetila de forma eficient tant el (Z,Z)-11,13-hexadecadien-1-ol com l'11-hexadecin-1-ol (E. Mas, resultats sense publicar). Per tant, el conjunt de resultats obtinguts suggereixen que la processionària del pi disposa d'una reductasa específica pel substrat enínic. El fet de tenir reductases específiques no és nou, ja que Zhao i col[247] van descriure una reductasa específica en l'espècie *Ostrinia furnicalis*. Per contra, la reductasa present en *T. processionea* exhibiria una activitat més àmplia.

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

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

Es més, la formació de l'àcid (Z)-9-tridecen-11-inoic (**IX**) a partir de l'àcid 11-tridecenoic (**170**) en l'espècie *S. littoralis*, suggereix que, probablement, la formació

d'una determinada estructura química com a feromona sexual depèn de la disponibilitat de substrats determinats, i no de dessaturases altament específiques.

Les acetilenases clonades fins el moment són la  $\Delta 12$  acetilenasa d'una planta anomenada *Crepis alpina*[21], la qual presenta una funció doble d'acetilenasa i epoxidasa, i la  $\Delta 6$  acetilenasa procedent de la molsa *Ceratodon purpureus*[248]. En ambdós casos es tracta d'enzims bifuncionals del tipus acetilenasa-dessaturasa. Per tant, malgrat que el gen que codifica la  $\Delta 11$  acetilenasa en *T. pityocampa* no ha estat clonat fins ara, és enraonat proposar que aquest enzim és també de tipus bifuncional amb funció acetilenasa-dessaturasa. Si aquesta acetilenasa és la mateixa que la  $\Delta 11$  dessaturasa que transforma l'àcid palmític en l'àcid (Z)-11-hexadecenoic (III) no es podrà confirmar fins tenir aquest gen clonat i expressat.

La transformació d'un enzim en un altre podria implicar una mutació amb pèrdua de funció acetilenasa o bé una mutació amb guany de funció de la dessaturasa. Un estudi exhaustiu dels gens que codifiquen ambdós enzims permetrà determinar quina espècie de *Thaumetopoea* és més ancestral i així conèixer quin ha estat el sentit de la mutació.

En qualsevol cas, aquesta mutació va provocar un canvi sobtat[187] en la maquinària biosintètica d'una de les espècies, que es va traduir en la producció de nous compostos actius en la feromona sexual, els quals, captats en un principi per un nombre escadusser de mascles amb l'estranya habilitat de respondre als nous components, van conduir a l'aparició i posterior evolució d'una nova espècie dins la família *Thaumetopoidea*.

Per tant, sembla ser que la variació fenotípica en l'estructura de la feromona entre els dos grups de *Thaumetopoea* es deu a l'absència de la  $\Delta 11$  acetilenasa en les espècies que produeixen l'acetat diènic, i l'existència d'una reductasa altament específica per l'enoat intermedi en aquell grup que produeix l'ení com a feromona sexual. Tanmateix, malgrat la pèrdua d'activitat acetilenasa, els insectes del grup al qual pertany la *T. processionea* encara mantenen la capacitat de transformar un precursor acetilènic[249], capacitat que sembla ser general atès que també altres espècies no relacionades, com és el cas de la *S. littoralis*, o altres organismes com el llevat *S. cerevisiae* (tal com es va veure en el capítol anterior) són capaços de dessaturar un precursor acetilènic per formar l'ení.



Tots aquests resultats exemplifiquen com la natura evoluciona refinant les activitats moleculars per tal de garantir una resposta biològica específica i precisa tot assegurant la contínua evolució de les espècies. A més, ens alerta davant la possibilitat que la utilització massiva de feromona en vigilància medio-ambiental i en control integrat de plagues pugui derivar, a llarg termini, en l'aparició de resistència per canvis en la funció d'alguns enzims que conduirien a l'aparició de noves poblacions d'individus que no serien atretes per la feromona original.



## ***5.- SÍNTESI D'ÈSTERS DEL COENZIM A EN FASE SÒLIDA***

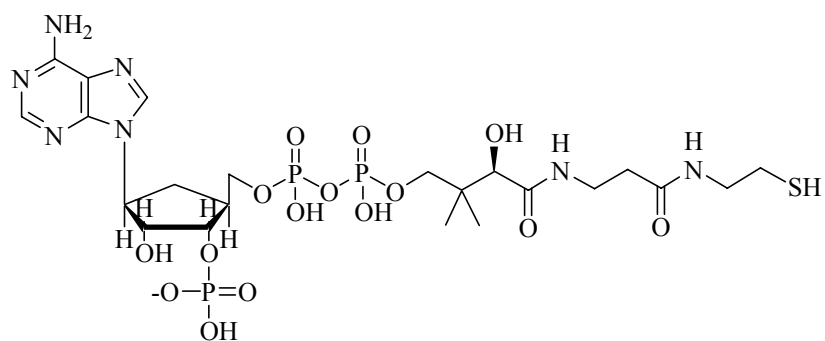


## 5. SÍNTESI D'ÈSTERS DEL COENZIM A EN FASE SÒLIDA

### 5.1. INTRODUCCIÓ

En alguns dels experiments *in vitro* conduïts al nostre laboratori sobre les dessaturases d'àcids grassos es feia necessari la utilització de precursors activats en forma d'èsters de CoA, els quals actuarien de substrat en treballar amb homogenats cel·lulars. Donada la dificultat de formació d'aquests derivats, es va plantejar la possibilitat de posar a punt un mètode sintètic de formació d'èsters de CoA en fase sòlida, d'una forma ràpida i eficient.

El coenzim A (Figura 5.1) és una molècula d'elevada importància biològica. Tant la seva forma lliure (CoASH) com els seus corresponents tioèsters (acil-CoA) estan involucrats en una gran varietat de funcions metabòliques[250]. S'ha estimat que aproximadament un 4% dels enzims coneguts requereixen la participació del CoASH o del seu derivat tioèster com a substrat[251].



**Figura 5.1.** Estructura química del coenzim A.

Aquesta dada inclou enzims de gran importància biològica com són la HMG-CoA reductasa[252], responsable de catalitzar el primer pas en la biosíntesi del colesterol i diana de fàrmacs anticolesterolèmics; l'acil-CoA colesterol aciltransferasa[253]; la miristoïl-CoA proteïna *N*-miristoïl-transferasa[254]; i la ATP citrat liasa[255], entre d'altres.

Altres processos biosintètics on participa aquesta biomolècula elemental inclouen la glicòlisi, la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos, la biosíntesi de lípids (fosfolípids i triglicèrids) i de proteïnes, etc[250]. Els àcids grassos activats com a èsters de CoA juguen un paper rellevant en el metabolisme de carbohidrats, a més de ser substrats per a un determinat número d'enzims que catalitzen la transferència d'àcids grassos a proteïnes[256], sense oblidar que són els àcids grassos activats en forma d'èsters de CoA un dels possibles substrats de les dessaturases, que catalitzen la inserció de dobles enllaços dins la cadena carbonada en éssers vius[6], tal com es va explicar al Capítol 1.

Aquests acil-CoA juguen també un rol decisiu en la regulació metabòlica en actuar com a reguladors al·lostèrics de molts sistemes enzimàtics i translocases, tot incloent la proteïna quinasa C[257], la glucoquinasa[258], l'acetil-CoA carboxilasa[259], la citrat sintetasa[260], la translocasa mitocondrial d'ATP/ADP[261] i la bomba cardíaca de sodi[262], com a sistemes més destacats.

S'ha suggerit també que els acil-CoA de cadena llarga podrien comportar-se com a factors de control en la proliferació de peroxisomes que segueix al tractament amb fàrmacs hipolipidèmics[263]. Alhora, algunes investigacions suggereixen que els èsters d'acil-CoA juguen un paper crucial en el creixement de membranes del complex de Golgi[264].

## **5.2. PROCEDIMENTS DESCRITS A LA LITERATURA PER SINTETITZAR DERIVATS DEL COENZIM A**

L'estudi dels enzims que intervenen en aquestes reaccions metabòliques ha estat facilitat en alguns casos per la disponibilitat de CoASH o dels seus èsters. Tanmateix, molts dels èsters d'acil-CoA més rellevants no són comercialment assequibles o són relativament cars. Això ha derivat en la necessitat de desenvolupar mètodes de síntesi d'aquests tipus de compostos que siguin senzills, reproduïbles i econòmicament viables.

Els mètodes descrits a la literatura es poden dividir en dos grups, segons es tracti d'un procediment químic o enzimàtic.

### **5.2.1. Procediments enzimàtics d'obtenció d'acils-CoA**

Els mètodes enzimàtics descrits a la literatura utilitzen, bàsicament, l'acil-CoA sintetasa (ACS)[265-267], tot i que altres enzims com la desfosfo-CoA quinasa[268] o inclús cèl·lules senceres[269] també han estat emprats.

Els mètodes enzimàtics presenten l'avantatge sobre els químics que permeten treballar en medis aquosos. Tanmateix els desavantatges són bastant clars:

- L'ús de l'enzim està limitat per l'especificitat sobre el substrat. Generalment l'aplicabilitat a la síntesi de derivats d'acil-CoA de cadena llarga és molt baixa. Com a exemple, s'ha examinat la capacitat de l'ACS d'acceptar diferents àcids grassos a més de l'àcid acètic tot mostrant una especificitat de substrat molt limitada[265].
- Els rendiments són generalment baixos ( $\approx 50\%$ ) i els productes es troben contaminats amb els lípids presents en la preparació enzimàtica, a menys que es purifiqui prèviament l'enzim, fet que suposa una enorme despesa de temps[270].

### **5.2.2. Procediments químics d'obtenció d'acils-CoA**

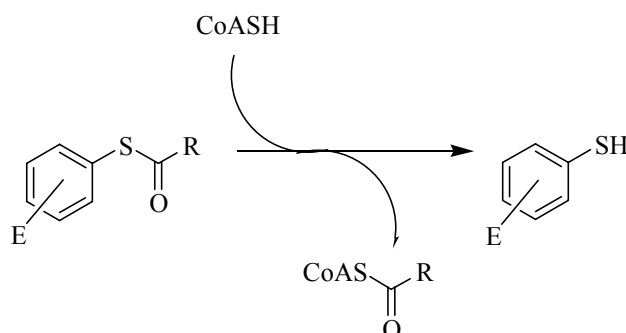
Els mètodes químics es basen principalment en la capacitat de l'àtom de sofre del CoASH d'atacar de forma nucleòfila una molècula activada, generalment un derivat d'àcid.

Així, entre els agents acilants emprats s'inclouen els anhídrids d'àcid[271, 272]; l'anhídrid mixt derivat de l'hidrogen carbonat d'etil[273]; els èsters de *N*-hidroxisuccinimida[274-276]; els derivats del carbonil imidazole[277]; i els clorurs d'àcid[278-280].

Tanmateix, tots aquests reactius són relativament inespecífics; poden reaccionar no només amb el grup tiol, sinó també amb els altres grups funcionals presents al CoASH, com són els grups amina, hidroxil i èsters de l'àcid fosfòric (Figura 5.1, pàgina 199). Per altra banda, és necessari l'ús de barreges de dissolvents orgànics (generalment THF o acetona) i aquosos, fet que complica la reacció quan es fan servir substrats molt lipofílics. A més, altres problemes associats són la necessitat d'ajustar el pH

constantment a 7,5-8 mitjançant l'addició de base (el grup tiol, en condicions àcides o neutres és un nucleòfil massa feble per atacar un grup carbonil[281]) i l'existència de reaccions d'hidròlisi dels reactius acilants que competeixen amb la formació del derivat de CoA.

L'altre mètode químic és l'intercanvi de tiol o transtioesterificació[281-286]. Aquesta reacció es basa en l'atac nucleòfil del tiolat del CoASH sobre un *S*-aciltioèster d'un àcid qualsevol (Figura 5.2). Per tal d'afavorir l'atac, aquest tioèster pot presentar un grup electroatraient en la part del tiol amb el que s'augmenta el caràcter electròfil del grup carbonil. Per altra banda, un cop s'ha produït la transtioesterificació, el tiolat alliberat, degut a aquest grup atraient, no és prou nucleòfil per tal de tornar a atacar el tioèster acabat de formar, fet que condueix a que la reacció sigui essencialment irreversible. Tot i que es poden utilitzar molts tioèsters com a agents donadors de grups acil, Wieland i col[282] van determinar que els *S*-aciltiofenols són particularment adequats per aquest propòsit.



**Figura 5.2.** Formació de derivats d'acil-CoA per transtioesterificació (E representa un grup electroatraient).

### 5.3. INTRODUCCIÓ A LA QUÍMICA EN FASE SÒLIDA

Com s'ha pogut veure, els mètodes clàssics descrits a la literatura per sintetitzar derivats del CoA, mètodes tots en solució, presenten diversos inconvenients. D'uns anys ençà, la síntesi orgànica en solució està essent complementada per un altre tipus d'aproximació basada en l'ancoratge dels reactius i/o productes a un suport de tipus polimèric; és l'anomenada síntesi orgànica en fase sòlida (SPOS).

Quan la síntesi de pèptids en fase sòlida va ser introduïda per Merrifield[287] per primer cop l'any 1963, fou conduïda sobre un suport format per una matriu de poliestirè



entrecreuat amb un 2% de divinil benzè. La idea de Merrifield va ser utilitzar un polímer insoluble, com ara el poliestirè, amb possibilitat de ser filtrat, i que funcionés alhora com a grup protector de l'extrem carboxil terminal de l'aminoàcid[288]. D'aquesta forma, mitjançant successives etapes d'acoblament-desprotecció de l'extrem amino terminal-nou acoblament, s'aconseguiria la formació del polipèptid desitjat, el qual es podia alliberar de la resina i purificar. L'estalvi de temps, comparat amb el mètode clàssic en solució, és bastant gran, ja que els reactius químics emprats en les diferents etapes de formació, es poden eliminar simplement per filtració.

Amb la síntesi de pèptids més llargs, ràpidament es va veure que l'entrecreuament de la resina havia de ser optimitzat. Els millors resultats es van aconseguir tot utilitzant una resina amb un entrecreuament de l'1%, valor encara vigent en els nostres dies. Durant gairebé quatre dècades, aquest mètode ha estat investigat i optimitzat d'una forma exhaustiva degut al seu ús en el camp de la química de pèptids.

Alguns dels avantatges de la fase sòlida envers de la química en solució es resumeixen a continuació[289]:

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

es poden suprimir les reaccions laterals indesitjables, com ara la formació d'entrecreuaments, els acoblaments múltiples, etc.

- Possibilitat d'automatització.

Evidentment, la tècnica no és perfecta i també presenta una sèrie de desavantatges respecte de la química en solució:

Un paràmetre molt important en la química en fase sòlida és l'inflament del suport, equivalent a la solvatació en solució. L'inflament d'una resina polimèrica és un requisit essencial per tal que una reacció pugui donar-se en el si del suport<sup>[290]</sup>. Si hom considera que la major part dels punts de reacció (>99%) es troben a l'interior de la resina, un bon inflament proporciona lliure accés dels reactius als grups funcionals del polímer, de forma especial als microporus. Quant menys restringit estigui l'espai per la matriu polimèrica, més favorable esdevindrà la reacció. És a dir, un polímer que no s'infla quan es posa en contacte amb un dissolvent proporciona poques oportunitats als reactius per què interaccionin. S'ha de fer notar, però, que l'inflament no és en sí mateix la panacea. Un polímer inflat assumeix en química en fase sòlida el rol del solvent en química en solució. Tanmateix, tot i que el polímer actua com a solvent, s'ha de prendre en consideració la diferència de viscositat. En aquest sentit, s'ha investigat la cinètica de reaccions en suports polimèrics i s'ha demostrat que, tot i que un polímer s'infla més que un altre, les constants de reacció no reflecteixen necessàriament el grau d'inflament<sup>[291]</sup>.

Per altra banda, existeix un balanç entre el grau d'entrecreuament i l'inflament. Una reducció d'aquell augmenta la capacitat d'inflament, tot i que perdent estabilitat mecànica; una resina trencada comporta pèrdues importants a l'hora de filtrar.

En canvi, en incrementar la densitat d'entrecreuament, augmenta la resistència mecànica però es perd capacitat d'inflament. Arribar a un equilibri entre aquests dos factors és objecte d'intens estudi en el disseny de nous suports.

Però l'inconvenient més seriós que presenta la química en fase sòlida és la caracterització de cada intermedi de reacció. Cada etapa en una síntesi sobre un suport sòlid forneix un intermedi unit a la resina, la caracterització del qual suposa actualment un gran problema. Quantificar la càrrega de la resina (rendiment) i determinar l'estructura del producte unit al suport, així com dels possibles subproductes, etapa que

és bastant directa en solució, esdevé un problema de difícil solució. Els paràmetres típics que determinen la qualitat d'una síntesi com són la puresa, el rendiment, l'estructura, estereoespecificitat, etc, no poden ser determinats d'una forma trivial. Malgrat tot, durant els darrers anys s'han desenvolupat diversos mètodes analítics per a la caracterització dels compostos units a un suport polimèric, capaços de donar informació sobre l'extensió de la reacció. En destaquen:

- Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FT-IR) i FT-Raman: degut a la interferència de l'esquelet del polímer, i de les baixes càrregues que són comunament emprades, els espectres d'IR convencionals són difícils d'interpretar i són sovint bastant ambigus. L'espectre de FT-IR, mesurat sota condicions definides i la possibilitat d'enregistrament d'espectres a partir d'una única bola (*single bead FT-IR*), proporciona informació tant a nivell qualitatiu com quantitatiu, i resulta especialment útil quan s'observa l'aparició o desaparició d'una banda no interferida per l'esquelet polimèric[292].
- Espectroscòpia de  $^{13}\text{C}$  i de  $^1\text{H}$  en estat sòlid i en fase gel[293], així com l'espectroscòpia de correlació de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ .
- Espectroscòpia d'alta resolució MAS (*magic angle spinning*) de  $^1\text{H}$  i de  $^{13}\text{C}$ [294, 295].
- Espectrometria MALDI-TOF[296].
- Anàlisi elemental: aplicable quan un element (N, P, S, halogen, etc) es perd o es guanya durant la reacció química. És una tècnica destructiva que consumeix grans quantitats de resina (5-50 mg), alhora que resulta molt difícil alliberar completament el suport de reactius o dissolvents, els quals interfereixen en la quantificació.
- Valoració colorimètrica de grups reactius ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{ArOH}$ ,  $-\text{SH}$ ). El test de Kaiser[297] per a la determinació tant qualitativa com quantitativa de grups  $-\text{NH}_2$  lliures i el test d'Ellman[298] per a la determinació de grups  $-\text{SH}$  en són bons exemples.
- Gravimetria (poc fiable).

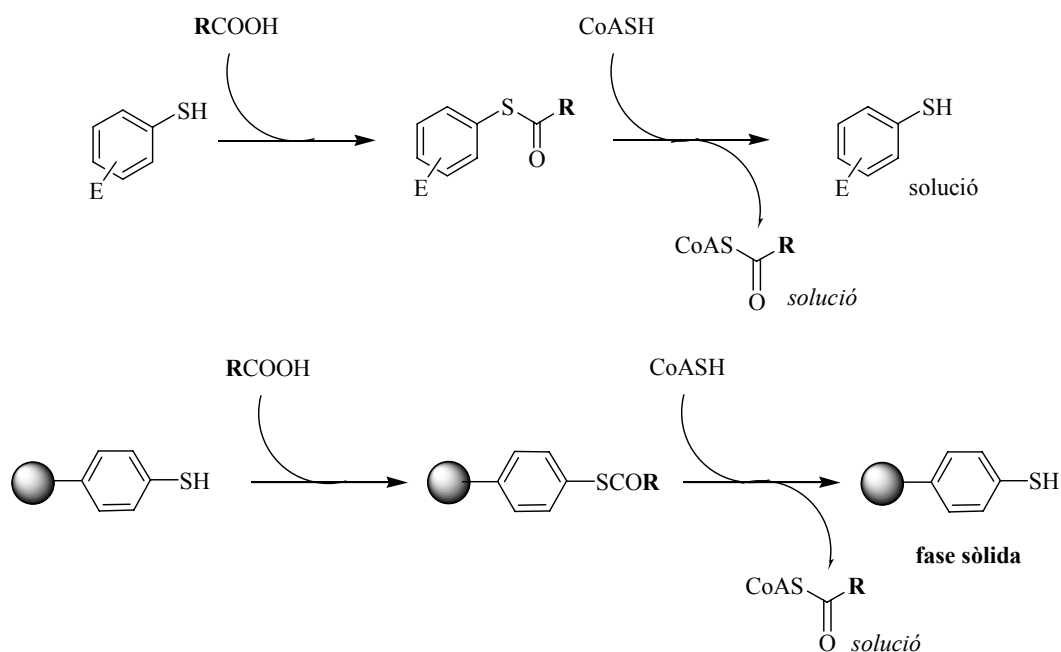
#### 5.4. SÍNTESI DE DERIVATS DEL COENZIM A EN FASE SÒLIDA

Com ja s'ha fet esment en l'apartat 5.2, els mètodes existents per a sintetitzar derivats del coenzim A presenten algunes dificultats, com la falta de reproductibilitat, baixos rendiments, etc.

Es considerarà que una aproximació vàlida per a la síntesi d'aquests tipus de derivats, molt importants des d'un punt de vista biològic, podria basar-se en la utilització de la química en fase sòlida. La idea es basa en la reacció de transtioesterificació<sup>[281, 282]</sup> mostrada anteriorment en la Figura 5.2 (pàgina 202) on un tiol, en aquest cas el CoASH, atacaria en medi bàsic a un tioèster on la part acílica provindria d'un àcid amb el qual es vol formar el derivat d'acil-CoA, i la part del tiol estaria formada per un grup electroattractiu, com un anell aromàtic, ancorat a una resina.

Així, segons es mostra en la Figura 5.3, quan té lloc la reacció de formació de l'acil-CoA en solució, s'allibera el tiol corresponent, tot fent necessària una etapa de separació d'aquest del producte desitjat. Però si aquest tiol estigués unit a un suport polimèric, en aquest cas els beneficis serien clars; el derivat del CoASH romandria en solució, mentre que el tiol es mantindria ancorat a la resina. És a dir, es podria pensar en un procés automatitzat i, *a priori*, bastant senzill de formació de derivats d'aquesta biomolècula.

A l'hora de posar en marxa el procediment cal avaluar quin suport polimèric és el més adient per tal que la reacció final presenti una efectivitat elevada. Es necessita una resina que contingui com a grup funcional un tiol, ja sigui en estat lliure o protegit. Per altra banda, el CoASH tan sols és soluble en medis aquosos, per tant, és imprescindible l'ús d'un suport amb una elevada capacitat d'inflament tant en dissolvents orgànics (ja siguin polars o no polars) com en aigua. Els suports disponibles funcionalitzats com a tiol són aquells basats en poliestirè-divinilbenzè (de fet, el tipus de suport més emprat en fase sòlida). Malauradament, aquests polímers presenten un inflament nul o molt petit en solucions aquoses, tot essent inadequats pels nostres propòsits.



**Figura 5.3.** Comparació de la formació de derivats de CoA tant en solució com en fase sòlida.

D'entre les resines comercials que satisfien els requisits anteriors, es van escollir dos tipus de matrius, les característiques de les quals eren molt adients pel tipus de reacció escollida:

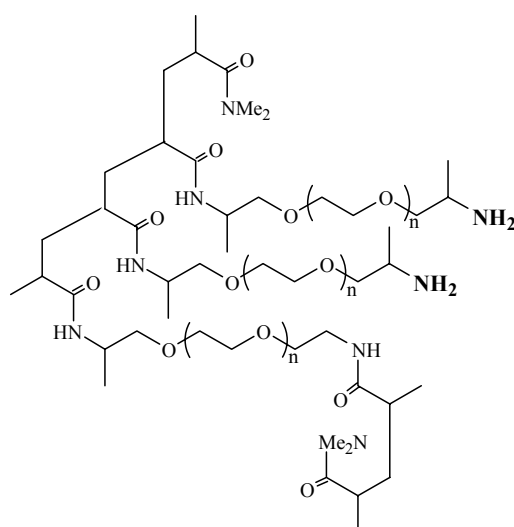
- PEGA (*polyethylene glycol dimethyl acrylamide*).
- ArgoPore<sup>®</sup> (*highly-crosslinked macroporous polystyrene*).

#### 5.4.1. Descripció de les resines escollides

##### 5.4.1.1. Resines tipus PEGA

Les resines tipus PEGA són polímers hidrofílics desenvolupats per Morten Meldal[299] construïts sobre una base de 2-acrilamidopropil-1-il-(2-aminoprop-1-il) polietilenglicol<sub>800</sub> i dimetilacrilamida entrecreuada amb bis-2-acrilamidoprop-1-il polietilenglicol<sub>800</sub> (Figura 5.4). Es tracta d'un suport estable, molt polar, que no presenta absorbància a la regió aromàtica i d'aquesta manera permet el seguiment de la reacció espectrofotomètricament. A més, forma una xarxa altament ramificada amb excel·lent inflament en solvents polars: és capaç d'inflar-se fins a 6 mL/g en DMF, tot presentant

un grau similar en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , en TFA, en alcohols i en  $\text{H}_2\text{O}$ , motiu pel qual exhibeix un ampli ventall d'aplicacions. La seva estructura interna permet la penetració de components polars a l'interior de la mateixa, tot essent permeable a macromolècules de fins a 60 kDa, fet que la fa l'elecció ideal per a la preparació de biblioteques de pèptids, purificació per afinitat i assaigs enzimàtics sobre resina, fins i tot amb proteases inestables que poden desnaturalitzar i perdre activitat en contacte amb, per exemple, poliestirè o sílica. Els altres tipus de suports basats en polietilenglicol (PEG) com són el TentaGel o l'ArgoGel mostren limitacions en la seva utilització en solució aquosa i en química enzimàtica<sup>[300]</sup> quan se'ls compara amb la resina PEGA.



**Figura 5.4.** Estructura de la resina de tipus PEGA-NH<sub>2</sub>.

Aquestes propietats han estat aprofitades per a la síntesi enzimàtica de glicopèptids<sup>[301]</sup>, determinació d'inhibidors de la subtilisina *Carlsberg*<sup>[302, 303]</sup>, i per a la preparació de tioèsters peptídics<sup>[304]</sup>, entre altres.

Com es pot observar, aquesta resina presenta, *a priori*, unes propietats molt adients, donat que permet un inflament elevat tant en  $\text{H}_2\text{O}$  com en dissolvents orgànics, a més de ser permeable a estructures de pes molecular elevat; amb tot, la seva manipulació no és gens fàcil<sup>[305, 306]</sup>.

#### 5.4.1.2. Resines tipus ArgoPore®

A més d'emprar la resina de tipus PEGA, també es va provar un altre suport polimèric basat en un esquelet de poliestirè macroporós amb un entrecreuament elevat (aminometil poliestirè-*co*-divinilbenzè).

Malgrat presentar un esquelet basat en poliestirè (el qual presenta un grau d'inflament nul en H<sub>2</sub>O), aquesta resina és apta pels propòsits sintètics donat que presenta una característica que la distingeix de la majoria de suports de poliestirè descrits a la literatura: no requereix un inflament previ per tal que els reactius puguin accedir als llocs de reacció. Aquest tipus de resina permet:

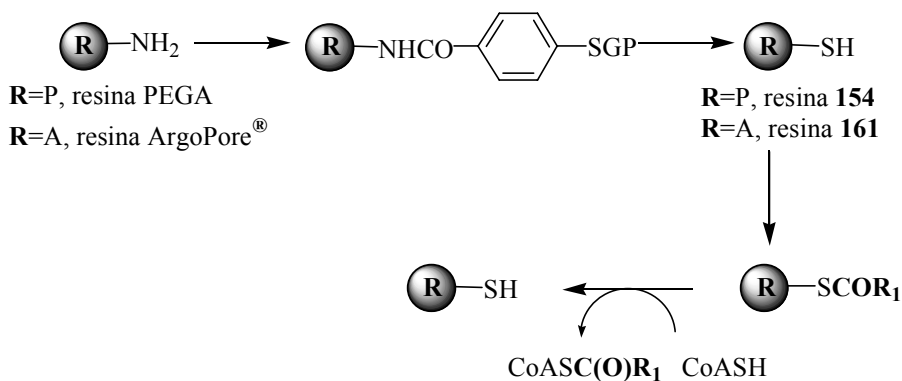
- Un ràpid accés i difusió dels reactius als llocs on es troben els grups funcionals a la resina.
- L'eliminació dels subproductes i dels excessos de reactiu d'una manera senzilla tot emprant, en principi, qualsevol solvent.
- Reaccions amb intermedis de baixa solubilitat i a baixes temperatures.
- Automatització mercès a la facilitat i rapidesa dels rentats i assecats, i a la nul·la adherència al vidre.
- L'ús d'un ampli ventall de solvents, incloent l'aigua. L'inflament teòric d'aquest suport en diferents solvents és de 5,6 mL/g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5,4 mL/g en THF, 5,6 mL/g en DMF, 5,2 mL/g en MeOH i 4,9 mL/g en H<sub>2</sub>O.

#### 5.4.2. Transformació de les resines amb funcionalitat -NH<sub>2</sub> en resines -SH

Ambdós suports es podien aconseguir amb la funcionalitat amina (PEGA-NH<sub>2</sub> i ArgoPore®-NH<sub>2</sub>) i per tant, per tal d'efectuar la transtioesterificació, s'havien de preparar les corresponents resines amb el grup tiol. Aquesta molècula de connexió que conté el grup tiol s'havia d'unir a la resina per l'enllaç amino i havia de presentar un grup electroattractiu per tal d'afavorir el desplaçament del grup acil per part del CoASH.

Considerant aquests requeriments es va escollir com a *linker* l'àcid *p*-mercaptobenzoic, el qual presenta un grup àcid susceptible de formar un enllaç de tipus amida amb el grup amino de la resina, a més de presentar el grup SH unit directament a un anell aromàtic desactivat per la presència del grup àcid (posteriorment amida), el qual faria que el grup carbonil del tioèster fos més electròfil. Per altra banda, en

presentar els dos grups en posició relativa *para*, la congestió estèrica seria menor. La ruta proposada per a la formació de derivats del CoASH emprant aquests dos suports es mostra a la Figura 5.5.



**Figura 5.5.** Formació de derivats del coenzim A tot emprant suports polimèrics on GP representa un grup protector i R<sub>1</sub>, la part carbonada que forma el derivat de l'acil-CoA.

Com es pot apreciar, el grup tiol està protegit (GP). Abans de dur a terme la incorporació d'aquest connector a la resina, s'havia d'emascarar aquest grup per tal d'evitar autocondensacions amb l'àcid en posició *para* a l'hora de formar l'amida amb el suport.

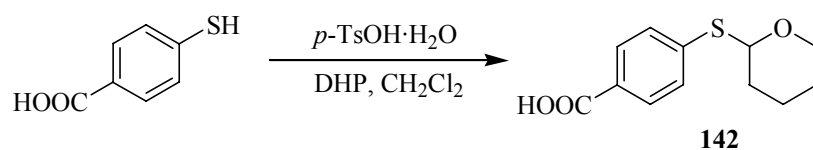
Existeixen diversos grups protectors per a tiols<sup>[49]</sup>, però se'n cercava un que no requerís l'ús de metalls pesats (Hg, Ag, etc) per a la posterior desprotecció; finalment, els grups escollits van ser el tetrahidropirani (THP), el *tert*-butoxicarbonil (Boc) i el grup trifenilmetà o tritil (Tr). A continuació es detallaran les diverses proves efectuades amb aquests grups per tal de determinar la viabilitat en la síntesi proposada.

### 5.4.3. Proves de protecció del grup tiol de l'àcid *p*-mercaptobenzoic

#### 5.4.3.1. Formació de l'àcid 4-(tetrahidropirani)benzoic (142)

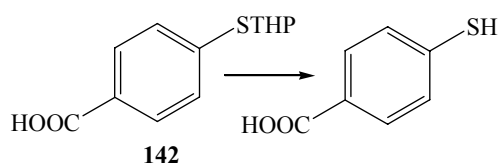
El primer grup amb el que es va experimentar va ser el tetrahidropirani (THP). Es va seguir el mètode de protecció de tiofenols descrit per Block i col<sup>[307]</sup>, tot obtenint el tiol protegit **142** amb molt bon rendiment (98%), tal com es mostra a la Figura 5.6.





**Figura 5.6.** Formació del derivat tetrahidropiranílic de l'àcid *p*-mercaptobenzoic (**142**).

Abans de formar l'enllaç amida amb la resina, es va creure pertinent provar condicions de desprotecció del grup tetrahidropiranil. Aquest grup, a diferència dels *O*-acetals, és resistent a condicions àcides<sup>[49, 308]</sup>, mentre que és molt làbil a l'acció de sals de plata i mercuri<sup>[307, 308]</sup> seguit d'un tractament amb HCl o H<sub>2</sub>S. En el nostre cas no interessava obtenir un precipitat insoluble de difícil eliminació sobre el suport sòlid, de manera que es van examinar diferents condicions àcides (Taula 5.1).



**Taula 5.1.** Intents de desprotecció del derivat tetrahidropiranílic **142** en medi àcid.

Condicions	t(h)	Conversió (%) <sup>a</sup>
HCl 2M/ MeOH	4	60
<i>p</i> -TsOH·H <sub>2</sub> O/ MeOH	4	0
HCl 50%/ MeOH	4	dec. <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Conversió calculada per RMN de <sup>1</sup>H; <sup>b</sup>El producte de partida descompon.

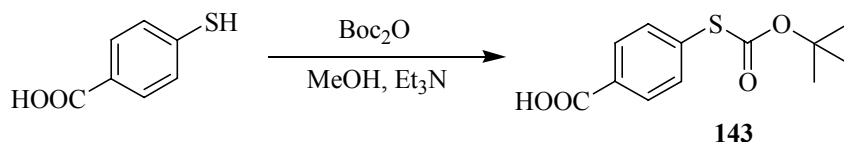
Aquest grup va resultar extremadament estable a diversos àcids. Així, en les condicions estàndard de desprotecció d'alcohols tetrahidropiranílics<sup>[49]</sup>, utilitzant àcid *p*-toluensulfònic, la reacció no va evolucionar. En el cas d'utilitzar HCl 2 M en MeOH, la conversió no va resultar satisfactòria (60%, per RMN de <sup>1</sup>H), restant producte de partida sense reaccionar, mentre que emprant condicions més dràstiques, com el HCl al 50% en MeOH, el producte va descompondre.

Donada l'estabilitat d'aquest grup protector es va decidir intentar la protecció amb un altre grup més làbil, com el *tert*-butoxicarbonil (Boc), molt emprat en la síntesi de pèptids.

#### 5.4.3.2. Formació de l'àcid 4-(*tert*-butoxicarboniltio)benzoic (**143**)

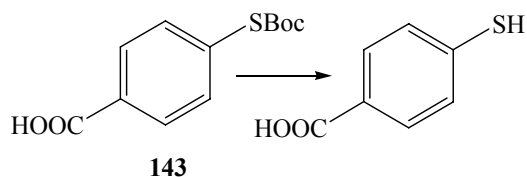
El grup *tert*-butoxicarbonil (Boc) ha estat àmpliament utilitzat en la protecció d'amines<sup>[49]</sup>, tot i que també s'han protegit alcohols<sup>[309]</sup> i tiols<sup>[310]</sup>. Ara bé, en el cas del grup tiol, el número de treballs no és tan extens. D'entre els mètodes descrits per a la introducció d'aquest grup en destaquen els que fan ús de l'anhidrid de Boc (Boc<sub>2</sub>O) en diferents condicions bàsiques com la Et<sub>3</sub>N en DMF, MeOH o THF<sup>[311, 312]</sup>, el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en THF<sup>[310]</sup> i el NaOH en dioxà<sup>[313]</sup>.

En un principi es va experimentar amb les condicions descrites per Houlihan i col<sup>[310]</sup> ja que en elles es protegia, precisament, el tiofenol en forma de *S*-Boc tiofenol. En realitzar la reacció sobre aquest compost, els resultats van ser molt bons (>90% de rendiment), però en fer la reacció sobre l'àcid *p*-mercaptobenzoic, la presència del carboxilat va fer que la protecció no fos tan eficient. Aquest problema va ser resolt realitzant la reacció amb Et<sub>3</sub>N tot utilitzant MeOH com a dissolvent (Figura 5.7).



**Figura 5.7.** Protecció de l'àcid 4-mercaptobenzoic en forma de *S*-Boc (**143**).

De la mateixa forma que amb el derivat tetrahidropiranílic **142**, també es van provar condicions de desprotecció d'aquest grup. Segons la literatura, les amines protegides en forma de *N*-Boc es desprotegeixen generalment en medi àcid<sup>[49]</sup>. De nou es van provar diferents condicions àcides com el HCl 2M en MeOH<sup>[314]</sup>, el HCl saturat en MeOH<sup>[315]</sup> i l'àcid trifluoroacètic (TFA) en clorur de metilè<sup>[316, 317]</sup> (Taula 5.2). De les condicions provades només el TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v) va donar una conversió total.

**Taula 5.2.** Desprotecció del derivat **143** en diferents condicions àcides.

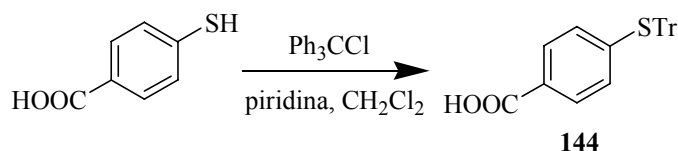
Condicions	t (h)	Conversió (%) <sup>a</sup>
HCl 2M/ MeOH	4	20
HCl sat/ MeOH	16	77
TFA/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	100

<sup>a</sup>Conversió calculada per RMN de <sup>1</sup>H.

Malgrat tot, donada la falta de reproductibilitat en la reacció de protecció on, en ocasions, s'obtenien subproductes de difícil eliminació (probablement productes de sobreprotecció) i els baixos rendiments obtinguts en l'etapa de desprotecció (<50%) es va provar un altre grup que minimitzés aquests problemes. Aquest nou grup escollit era el trifenilmetà o tritil.

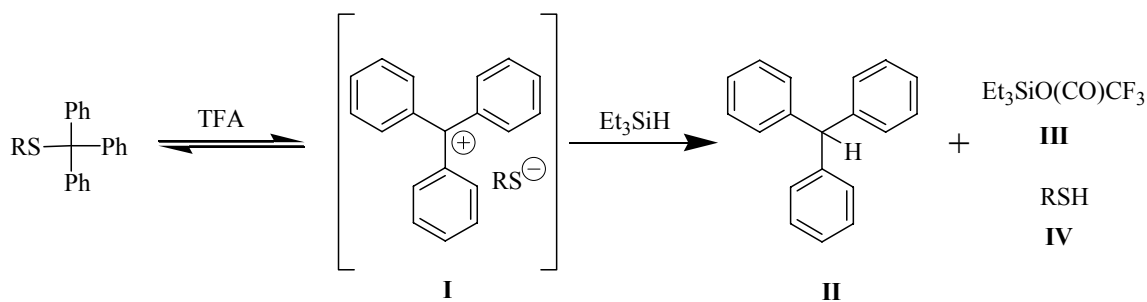
#### 5.4.3.3. Formació de l'àcid 4-(tritiltio)benzoic (**144**)

El grup tritil ha estat utilitzat en la protecció de tiols tant en solució<sup>[318-320]</sup> com en fase sòlida<sup>[321]</sup>. Aquest grup s'introdueix tot emprant el trifenilmetanol en medi àcid<sup>[320]</sup>, en el qual es forma el catió trifenilmetà, extraordinàriament estable, o bé el clorur de trifenilmetà en medi bàsic<sup>[321]</sup> amb un camí de reacció similar. En el nostre cas, es va seguir aquesta darrera metòdica, tot obtenint el derivat **144** amb excel·lents rendiments (Figura 5.8).

**Figura 5.8.** Protecció de l'àcid *p*-mercaptobenzoic en forma de *S*-Tritil (**144**).

Aquest grup protector és làbil als àcids. En el decurs de la seva desprotecció es genera el carbocatió trifenilmetà el qual, degut a la seva condició d'aromàtic, és molt

estable, fet que possibilita que torni a ser atacat de forma nucleòfila pel tiol acabat de formar. Per evitar que aquesta reacció esdevingui reversible, es realitza en presència d'un agent que sigui capaç de captar aquest catió, agent conegut amb el nom de *scavenger*. Els més comuns són els silans<sup>[319]</sup> els quals cedeixen un hidrur generant l'espècie neutre trifenilmetà (**II**). El mecanisme d'aquesta desprotecció en presència de TFA i Et<sub>3</sub>SiH és el que es presenta a la Figura 5.9.



**Figura 5.9.** Desprotecció del grup tritil amb TFA i Et<sub>3</sub>SiH.

En addicionar la solució de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v), la mescla de reacció esdevé d'un color groc-taronja intens degut a la presència del catió trifenilmetà (**I**). Un cop afegit el silà, la mescla es descoloreix, fet que indica la desaparició d'aquest catió i la formació de l'espècie neutra (**II**) juntament amb l'èster trifluorometil silílic (**III**) i el tiol lliure (**IV**).

Per tant, és un grup que, a diferència del THP, és fàcil d'eliminar, no en resulten subproductes com en la formació del derivat amb Boc i els rendiments són força elevats tant en l'etapa de protecció com en la de desprotecció. Degut a això, va ser el grup d'elecció per a realitzar la síntesi.

Amb tot, abans de començar la síntesi en fase sòlida, es va decidir assajar les reaccions que es conduïrien sobre la resina, primer sobre un model en solució, per tal d'estudiar la viabilitat de totes elles, especialment la de transtioesterificació.

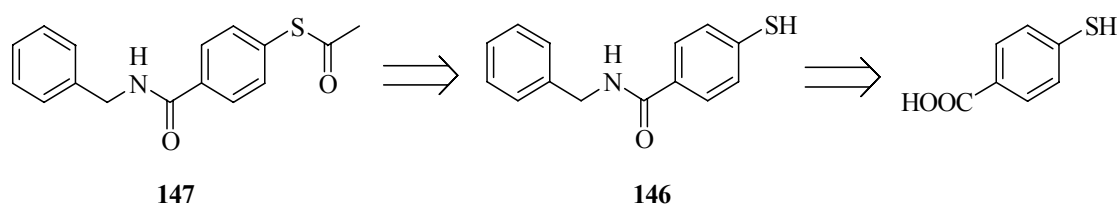
#### 5.4.4. Proves de viabilitat de les reaccions en fase sòlida sobre un model en solució: síntesi del tioacetat de *S*-octil (**141**) per transtioesterificació sobre el tioacetat de *S*-4-(benzilcarbamoil)fenil (**147**)

El model proposat per l'estudi va ser la formació del tioacetat de *S*-octil (**141**) mitjançant una reacció de transtioesterificació amb un tiol acetilat, el qual presentés

unes característiques que el fessin molt semblant al tiol que després es pretén formar a l'interior de la matriu polimèrica. Es va emprar la benzilamina com a mimètic de l'ancoratge a la resina de l'àcid *p*-mercaptobenzoic protegit en forma de tritil (condicions molt semblants al cas del suport macroporós ArgoPore<sup>®</sup>) i es va escollir l'àcid acètic com a agent acilant. En els següents apartats es tractarà la síntesi del tioacetat **147** i el posterior desplaçament del grup acetil per part de l'1-octantiol.

#### 5.4.4.1. Formació del tioacetat de *S*-4-(benzilcarbamoil)fenil (**147**)

L'anàlisi retrosintètica és la que es mostra a la Figura 5.10.



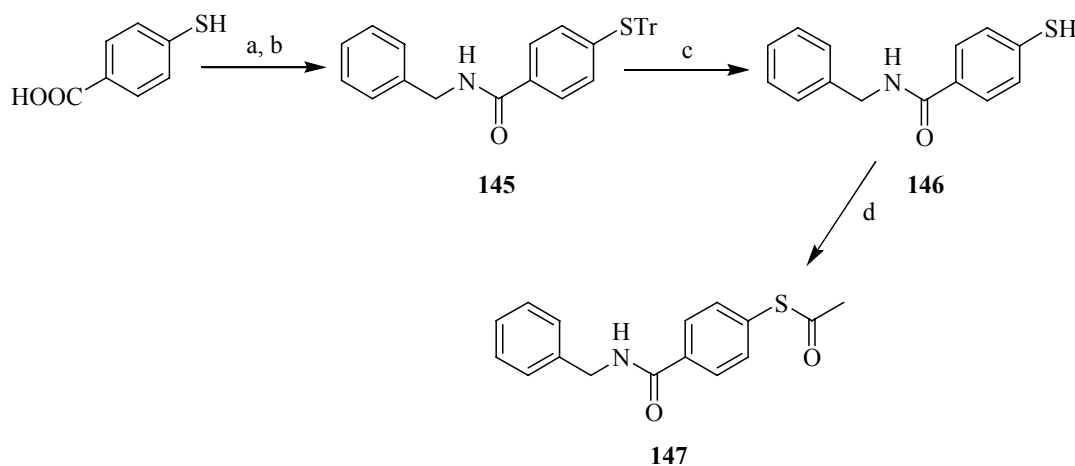
**Figura 5.10.** Formació del derivat **147** a partir de l'àcid *p*-mercaptobenzoic.

Així, tot partint del tiol protegit en forma de tritil (**144**), transformació explicada en l'apartat anterior, es procediria a la formació de l'amida **145** per reacció d'aquell amb la benzilamina; la posterior desprotecció del grup tritil en les condicions esmentades abans forniria el tiol **146**. Finalment, la reacció d'aquest tiol aromàtic amb un agent acilant com és l'àcid acètic, acaba per donar el tioacetat desitjat **147**.

Existeix a la bibliografia química una quantitat ingent d'informació sobre la formació d'enllaços amida, fet degut, especialment, a la necessitat que té la química de pèptids de trobar reactius cada cop més suaus i específics per activar carboxilats. En el nostre cas es va decidir emprar el mètode clàssic de l'activació del carboxilat amb una carbodiimida, reacció catalitzada per DMAP. Es van provar tant la diisopropilcarbodiimida[290, 304, 322, 323] (DIPC), com l'hidroclorur de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), el qual presenta grups bàsics. Aquesta darrera carbodiimida va donar millors resultats, especialment a l'hora de realitzar la purificació del cru, en ser soluble en H<sub>2</sub>O[324], mentre que la DIPC interferia de forma considerable en la separació dels productes. En aquest tipus d'aproximació poden

utilitzar-se tant un excés d'amina (per assegurar-se que tot l'àcid es consumeix) com un excés d'àcid (en el cas que sigui l'amina el reactiu important).

La reacció es va realitzar en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en comptes de DMF ja que aquell solvent accelera aquest tipus d'acoblements[290, 324], els tractaments de reacció són més senzills i no es presentaven problemes de solubilitat. La ruta sintètica completa es mostra a la Figura 5.11.



*Reactius i condicions:* (a)  $\text{TrCl}$ , piridina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 16 h, ta, (**144**, 91%); (b) benzilamina, EDC, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 16 h, ta, (**145**, 91%); (c)  $\text{TFA}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, v/v),  $\text{Et}_3\text{SiH}$ , 45 min, ta, (**146**, 95%); (d)  $\text{AcOH}$ , EDC, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 16 h, ta, (**147**, 84%).

**Figura 5.11.** Síntesi del tioacetat **147**.

El sòlid aconseguït no es purificà i es va desprotegir tot fent-lo reaccionar amb una mescla  $\text{TFA}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, v/v) en presència de  $\text{Et}_3\text{SiH}$  com a *scavenger*. Transcorreguts 45 min, s'afegí  $\text{H}_2\text{O}$  i es va extreure amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna de gel de sílice tot obtenint un sòlid groc que corresponia al tiol desitjat **146** amb un rendiment excel·lent (95%). Per finalitzar, es formà el corresponent tioèster, concretament el tioacetat, tot emprant les mateixes condicions d'acoblament que en la formació de l'amida.

#### 5.4.4.2. *Transioesterificació tot emprant l'1-octantiol com a model*

Per tal de portar a terme la reacció de transioesterificació, es va escollir com a tiol model l'1-octantiol, bàsicament per raons de caràcter pràctic. Malgrat la seva mala olor, l'excés era fàcilment separable per cromatografia en columna, es podia seguir l'avanç de la reacció d'una forma senzilla per cromatografia de gasos (CG) o per cromatografia

en capa fina (CCF) i el tioèster resultant era força estable a les condicions de tractament de reacció i purificació.

Com ja s'ha explicat a l'apartat 5.2.2, la reacció de transtioesterificació consisteix en l'atac nucleòfil d'un tiol sobre un tioèster activat ja sigui en solució[281, 282], emprant enzims[325] o en fase sòlida[326, 327]. En el nostre cas, es tractava de formar el tioèster de l'1-octantiol (**141**) per intercanvi amb el tioèster **147**. Es va escollir la DMF com a dissolvent polar apròtic per realitzar la reacció i es van experimentar diferents condicions de pH.

A la Taula 5.3 es mostren els diferents assaigs realitzats. Tal com era de preveure, en condicions de pH àcid o neutre, el tiol no és suficientment nucleòfil com per atacar un carbonil[281]. El K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dóna lloc a la hidròlisi total del grup tioèster, tal com succeeix amb els acetats d'alcohols secundaris vist al Capítol 1. Cal recordar que aquest grup tioèster és molt làbil a condicions bàsiques. Amb bases molt més febles, ja siguin orgàniques, com la diisopropiletilamina (DIEA) o inorgàniques, com el bicarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), té lloc l'atac del tiolat preferentment sobre la hidròlisi. Per tant, s'observa que en condicions lleugerament bàsiques i utilitzant DMF com a solvent, és possible realitzar aquesta transformació.



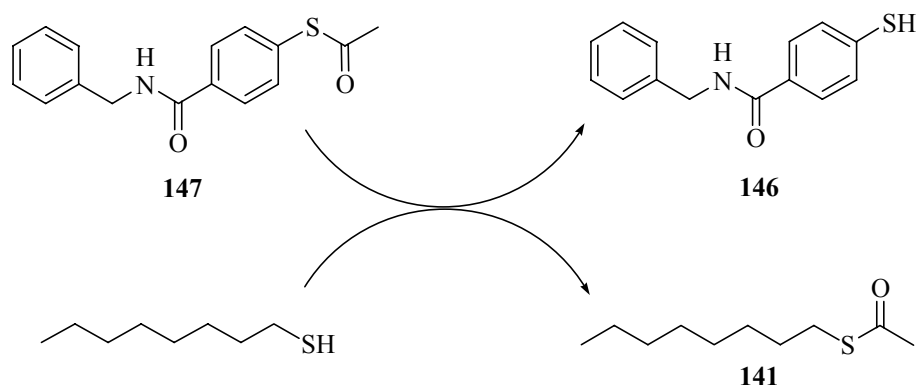
**Taula 5.3.** Reacció de transtioesterificació de **147** amb l'1-octantiol a diferents pH.

Condicions	t(h)	Rdt(%)
pH neutre	16	(n.r.) <sup>a</sup>
<i>p</i> -TsOH·H <sub>2</sub> O	16	(n.r.) <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	16	0 <sup>b</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	16	65
DIEA	16	65

<sup>a</sup>No s'observa reacció; <sup>b</sup>S'obté únicament el derivat **146** resultat de la hidròlisi de **147**.

Així, 0,35 mmol del tioacetat **147** en DMF es van fer reaccionar, sota atmosfera d'argó, amb l'1-octantiol i 0,87 mmol de NaHCO<sub>3</sub> o 0,87 mmol de DIEA durant 16 h a ta. Un cop realitzat el tractament de la mescla de reacció i separats els productes, es

recuperaren 0,23 mmol del tioacetat de *S*-octil **141** (tant en la reacció amb NaHCO<sub>3</sub> com emprant DIEA), que suposava un rendiment del 65%. També es recuperaren 0,28 mmol del tiol **146** com a sòlid groc (recuperació del 80%), tal com es mostra a la Figura 5.12.



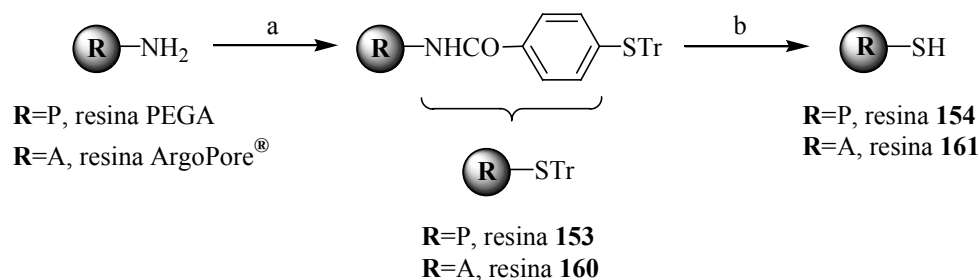
**Figura 5.12.** Reacció de transtioesterificació entre el tioacetat **147** i l'octantiol per fornir el tiol **146** i el tioacetat de *S*-octil **141**. Les condicions de reacció utilitzen DMF i una base (NaHCO<sub>3</sub> o DIEA).

#### 5.4.5. Preparació de les resines PEGA-SH (**154**) i ArgoPore<sup>®</sup>-SH (**161**)

Un cop es va haver escollit el trifenilmetil (tritol, Tr) com a grup protector adient del tiol, es van optimitzar les reaccions de protecció i de desprotecció i posat a punt les reaccions que es durien a terme en fase sòlida sobre un model en solució, el pròxim pas consistia en la implementació d'aquesta metodologia a la síntesi en fase sòlida.

En primer lloc es va abordar la transformació de les dues resines amb funcionalitat amina en unes amb un grup tiol com a funció principal, tot aplicant les condicions estudiades en solució. Els únics canvis van concernir a l'ús d'un excés de reactius, tot seguint les pautes establertes per a la química en fase sòlida explicades al principi d'aquest capítol. Així, la seqüència de reaccions per a la transformació de les resines amino a les resines tiol es mostra a la Figura 5.13.





*Reactius i condicions:* (a) 1, EDC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3 h i 16 h, ta; (b) TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v), Et<sub>3</sub>SiH, 2x45 min, ta.

**Figura 5.13.** Formació de les resines amb la funcionalitat tiol **154** i **161**, a partir de les corresponents resines de partida PEGA-NH<sub>2</sub> i ArgoPore®-NH<sub>2</sub>.

Les reaccions es van dur a terme en xeringues de tefló proveïdes d'un filtre de 20 µm i de dos taps per cadascuna de les obertures; la xeringa s'acoblà a una clau rodona connectada a un matràs de Kitasato des d'on es podia filtrar al buit (aproximadament 20 mmHg), tot restant la resina a l'interior de la xeringa. El mètode d'agitació és el de la rotació contínua de 360° a 30 rpm.

Els rentats es van fer de manera seqüencial i per triplicat tot utilitzant 3 o 4 mL segons el cas i triant una combinació de solvents que inflessin i desinflessin la resina (pel cas del suport PEGA). En inflar-la amb un dissolvent en concret es permet l'entrada d'altres solvents al cor del polímer millorant l'eficàcia del rentat. Els dissolvents emprats foren de qualitat HPLC, per evitar l'acumulació d'impureses en les successives etapes de rentat.

Finalment, cal destacar que la resina PEGA, donada la baixa resistència mecànica, s'ha de conservar humitejada en MeOH tal com descriuen Ashish i col[306] i no en la seva forma seca. A més, donat que aquesta resina es ven precisament en MeOH, per tal de pesar-la s'ha de rentar prèviament amb un dissolvent força volàtil com és l'Et<sub>2</sub>O el qual, a més, la desinfla, assecar-la al buit (20 mmHg) i finalment pesar-la. En el cas de la resina macroporosa, no existeix cap problema a l'hora de pesar-la i l'assecat final es realitza a alt buit (1 mmHg) tot mantenint-la en un dessecador amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fins que s'utilitza.

L'acoblament es realitzà per duplicat i la reacció es donà per acabada quan s'obtingué un test de Kaiser negatiu[297]. Aquest test es basa en l'atac del grup amino sobre la ninhidrina per donar una coloració porpra si existeixen amines primàries lliures

en solució o ancorades a un suport, mentre que si el test és negatiu, el color és lleugerament groc.

Les resines es filtraren i es rentaren successivament amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i DMF i es van suspendre en 4 mL d'una solució de  $\text{Ac}_2\text{O}:\text{DIEA}:\text{DMF}$  (15:15:70, v/v) per tal de realitzar el *capping* dels grups amino que hi poguessin romandre encara lliures. Després de 10 min en agitació, es filtraren i es rentaren amb DMF, MeOH i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tot obtenint les resines protegides **153** i **160**.

El grup tritil es desprotegí anàlogament a com es realitzà en solució, en aquest cas realitzant dos tractaments consecutius. En aquests moments es disposava dels dos suports amb la funcionalitat tiol lliure, **154** i **161**. Ara bé, abans de prosseguir es feia necessari:

- Assegurar que es disposava realment d'un suport amb residus de tiol lliure.
- Quantificar aquest tiol lliure existent; és a dir, calcular la càrrega de la nova resina.

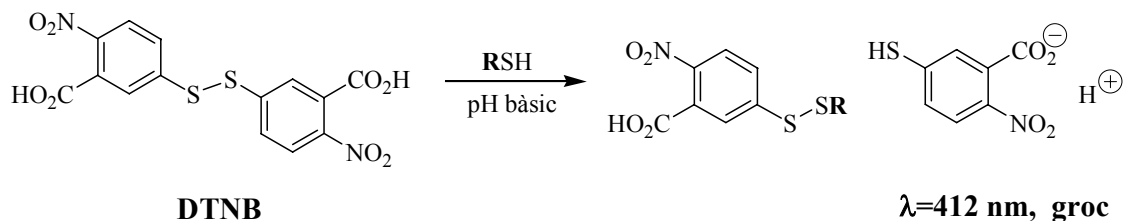
#### **5.4.5.1. Anàlisi qualitativa i quantitativa de la càrrega de tiols: reactiu d'Ellman**

Com ja s'ha explicat al principi d'aquest capítol, una de les parts més complicades en el treball en fase sòlida és l'anàlisi i control de les reaccions, la determinació amb precisió de l'estructura del producte unit al polímer i de possibles subproductes, la quantificació del rendiment, etc.

En el nostre cas, l'existència de grups tiols lliures a la molècula va permetre l'ús d'una tècnica colorimètrica de determinació d'aquest grup funcional. Aquest test es basa en la utilització de l'àcid 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), conegut com a reactiu d'Ellman i desenvolupat originalment per Ellman l'any 1959 tant per a l'anàlisi qualitativa com quantitativa de tiols lliures en condicions fisiològiques[298, 328, 329].

El mecanisme de la reacció es mostra a la Figura 5.14. En un procediment estàndard d'anàlisi, una solució diluïda de reactiu d'Ellman en un medi aquós tamponat ( $\text{pH}\approx 8$ ) s'afegeix sobre una alíquota de la mostra que conté grups tiols. En solució aquosa, a  $\text{pH}$  entre 6,8-8,2 el grup tiol, des de tiols en molècules de baix pes molecular fins a pèptids i proteïnes, reacciona d'una forma ràpida i neta amb un excés de DTNB. La reacció entre el disulfur i el tiol genera un anió que presenta una forta absorbància en l'espectre visible amb un màxim a 412 nm ( $\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ). L'intens color

groc del producte alliberat és la base del test qualitatiu, mentre que la mesura dels valors d'absorbància permet la quantificació dels tiols lliures mitjançant la llei de Beer-Lambert.



**Figura 5.14.** Reactiu d'Ellman (DTNB). Formació del nou tiol d'un color groc i d'una absorbància mesurable a una  $\lambda = 412$  nm.

En el nostre cas, l'assaig es podia realitzar sense problemes derivats de l'ús de medis aquosos, ja que tant la resina PEGA com la resina basada en poliestirè macroporós són compatibles amb aquest tipus de medis i també amb altres solvents polars pròtics (MeOH, per exemple).

Així, es va seguir el procediment descrit per Badyal i col[330], els quals determinen la quantitat de tiol present en diferents suports sòlids (poliestirè macroporós, TentaGel i poliestirè-divinil-benzè) mitjançant una solució metanòlica del reactiu d'Ellman (1 mM), tot emprant DIEA per aconseguir el medi bàsic.

L'assaig es portà a terme en plaques de poliestirè de 96 pous de fons pla tot elaborant prèviament una recta de calibratge per dilucions seriades 1:2 d'una solució metanòlica 2 mM de *N*-acetilcisteïna (NAC). Tant la recta de calibratge com les mesures en les resines es van fer per duplicat.

Sobre cada pou s'afegiren 5  $\mu\text{L}$  de DIEA i tot seguit, 100  $\mu\text{L}$  de DTNB (1 mM en MeOH). L'aparició de color va ser immediata, i es mesurà l'absorbància espectrofotomètricament a una  $\lambda = 412$  nm.

Pel que fa a la quantificació dels tiols en la resina el procediment és el que segueix:

- Es pesaren, en un *ependorf* de 500  $\mu\text{L}$ , entre 0,5 i 1,5 mg de resina seca **154** o **161** (la resina PEGA cal rentar-la prèviament amb  $\text{Et}_2\text{O}$  i deixar-la assecar al buit,

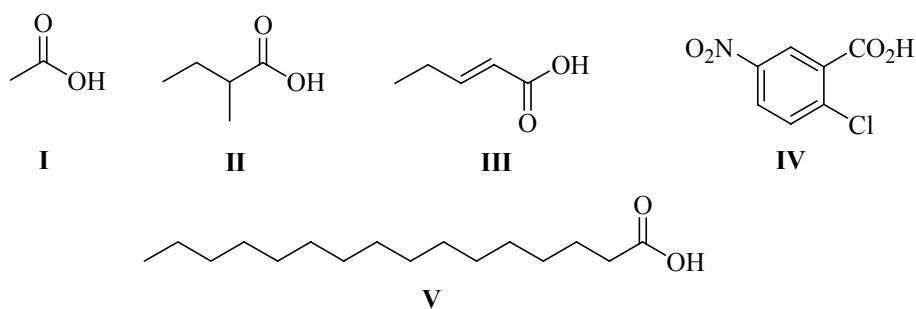
aproximadament a 20 mmHg), s'addicionaren 200  $\mu$ L de MeOH i s'inflà durant 15 min.

- S'addicionaren 10  $\mu$ L de DIEA seguit de 200  $\mu$ L de solució metanòlica 1 mM de reactiu d'Ellman. S'agità al vòrtex de forma suau i es deixà en agitació (rotació de 360°) durant 1 h, per tal que s'alliberés tot el tiol aromàtic a la solució, amb el desenvolupament del color groc característic.
- Es centrifugà a 13200 rpm durant 12 s i 200  $\mu$ L del sobrenedant, es transferiren a un dels pous; es mesurà l'absorbància a una longitud d'ona de 412 nm, tot diluint la mostra si el valor de l'absorbància no estava dins de la recta de calibratge.

Un cop determinada la càrrega de grups tiol presents a cada resina es va procedir a l'ancoratge dels diferents àcids amb els que es pretenia sintetitzar els derivats de CoASH.

#### 5.4.6. Formació dels diferents acil-CoA

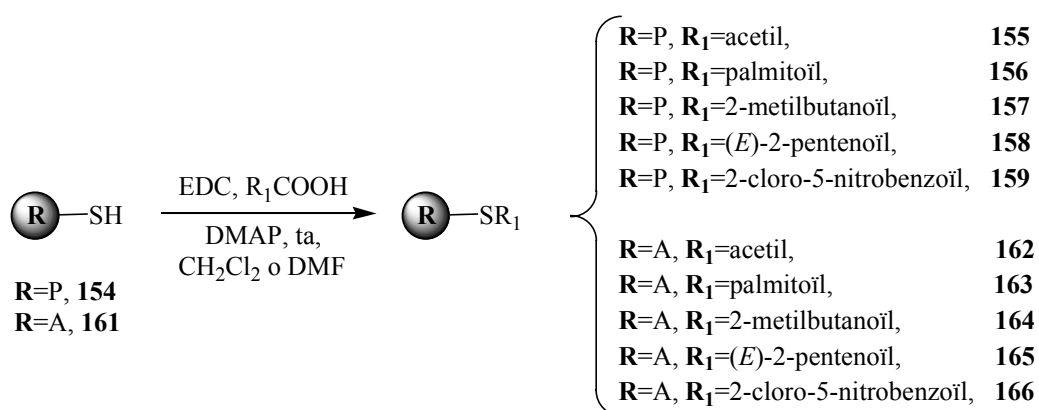
Amb la finalitat d'explorar la versatilitat del procediment sintètic, s'escolliren diferents àcids, com ara alifàtics de cadena curta, ramificats i de cadena llarga (l'àcid acètic **I**, l'àcid 2-metilbutanoic **II** i l'àcid hexadecanoic **V**),  $\alpha,\beta$ -insaturats (l'àcid *trans*-2-pentenoic **III**) i aromàtics (l'àcid 2-cloro-5-nitrobenzoic **IV**), (Figura 5.15).



**Figura 5.15.** Àcids escollits per a l'obtenció dels diferents èsters de CoA.

#### 5.4.6.1. Formació de les resines esterificades 155-159 i 162-166

L'acoblament d'aquests àcids amb el grup tiol de les resines, tant l'aminometilada **154** per fornir els corresponents tioèsters **155**, **156**, **157**, **158** i **159**, com la macroporosa **161**, per tal d'obtenir els suports **162**, **163**, **164**, **165** i **166**, es va dur a terme de la mateixa manera que en el cas de la formació dels enllaços amida, tot seguint el procediment descrit en la síntesi de **147** en solució. Això és amb l'estratègia de l'activació de l'àcid amb una carbodiimida com és ara la EDC, procés catalitzat per DMAP, en el si de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> com a dissolvent<sup>[304, 326]</sup>, llevat del cas d'utilitzar l'àcid aromàtic **IV**, en què s'utilitzà DMF degut a la insolubilitat d'aquest àcid en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El procés es mostra a la Figura 5.16.



**Figura 5.16** Síntesi de les diferents resines esterificades amb els àcids escollits.

Donat que es pretenia realitzar la reacció de transtioesterificació amb petites quantitats de CoASH (al voltant de 6,6 µmol), hom va creure convenient disposar d'un altre tipus de reactor de volum més reduït. Per aquest motiu, es van utilitzar xeringues de tefló d'1 mL de volum proveïdes amb un filtre, també de tefló, de 20 µm, acoblades al sistema Versaplate<sup>®</sup> (Varian) en l'etapa de filtrat de les mostres.

Així doncs, es va al·liquotar cada resina (**154** i **161**) en 5 fraccions que contenien el mateix pes de sòlid (un total de 10 reaccions diferents, 5 pel cas dels derivats de la resina PEGA i 5 pel cas de la resina ArgoPore<sup>®</sup>) i es van realitzar les reaccions pertinents. Així, 50 mg (13 µmol) de la resina PEGA **154** (0,26 mmol/g) i 41 mg (13 µmol) de la resina ArgoPore<sup>®</sup> **161** (0,32 mmol/g) es disposaren en 10 xeringues diferents. S'inflaren amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o DMF segons el cas, durant 15 min, es filtraren i

s'addicionà  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o DMF. S'afegiren 130  $\mu\text{mol}$  de cada àcid, DMAP i 39  $\mu\text{mol}$  d'EDC. La mescla s'agità durant 16 h, tot obtenint un test d'Ellman qualitatiu negatiu.

En aquest moment, la resina es filtrà i es rentà successivament amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , MeOH i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , de manera que s'obtingueren les resines esterificades **155-159** pel cas del suport PEGA i les resines **162-166** pel cas de les resines ArgoPore<sup>®</sup>.

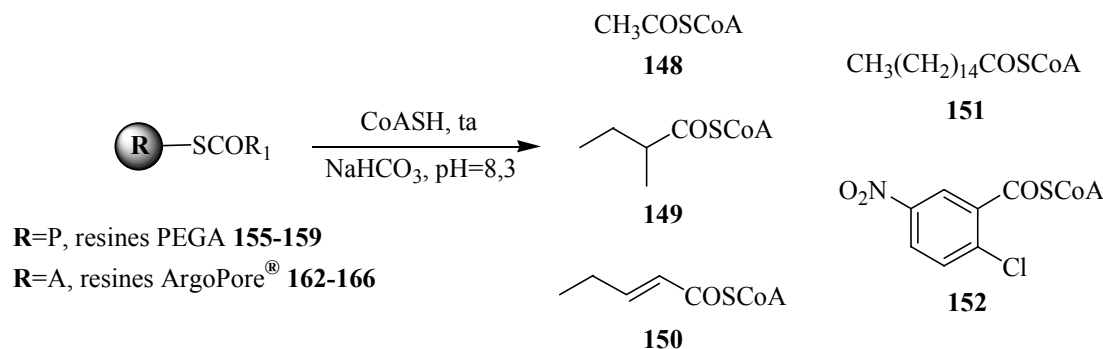
#### **5.4.6.2. Formació dels derivats d'acil-CoA 148, 149, 150, 151 i 152**

Un cop es disposava dels diferents tioèsters, precursors dels derivats del CoASH, solament mancava el darrer pas, que consistia en la reacció de transtioesterificació amb el tiol del coenzim A.

La reacció es realitzà en medi aquós, tot utilitzant un tampó 0,1 M de  $\text{NaHCO}_3$  a un pH de 8,3, mercès a la compatibilitat de les resines emprades amb els medis aquosos. En aquestes condicions lleugerament bàsiques la selectivitat del grup tiol enfront d'amines o d'alcohols és major, donada la bona capacitat nucleòfila que exhibeix el tiolat<sup>[331]</sup> i per tant no caldria esperar altres subproductes derivats d'atacs d'altres funcionalitats presents a la molècula de CoASH.

Una altra de les característiques d'aquesta reacció és que s'utilitzava un excés de resina en relació amb la quantitat de coenzim A present al medi, concretament 2 equiv de resina per cada equivalent de CoASH. Amb aquesta opció es pretenia que la reacció esdevingués completa (és a dir, que reaccionés tot el CoASH inicial) i que mitjançant una simple operació de filtració, s'obtingués el derivat de CoA en la solució aquosa, de manera que la resina amb el tiol lliure o esterificat romangués al filtre de la xeringa. El fet de treballar amb un excés de resina, tot i que no gens habitual, és aquí recomanable ja que el producte final posseeix un valor afegit més elevat que la pròpia resina. Una estratègia similar va ser seguida per Gayo i Suto<sup>[332]</sup> en l'obtenció d'una família de diferents trifluorometil pirimidines.

Per tant, la reacció es realitza tal com es mostra a la Figura 5.17.



**Figura 5.17** Formació dels derivats del coenzim A (**148-152**) mitjançant l'atac del tiolat del CoASH sobre cadascun dels tioèsters **155-159** i **162-166**.  $\text{R}_1$  correspon als fragments tant alifàtics com aromàtic de cadascun dels àcids emprats, mostrats a la Figura 5.15.

D'aquesta forma, les resines obtingudes en l'apartat anterior es traspasaren a un vial de vidre de 2 mL proveït de sèptum, ja que el tefló de les xeringues impedeix una bona agitació quan es realitzen reaccions en medis aquosos. S'addicionà, sota atmosfera d'argó, 6,5  $\mu\text{mol}$  de CoASH dissolts en una solució esmorteïdora de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M (prèviament desgasada amb argó), a un pH de 8,3. Les resines s'agitaren durant 16 h a temperatura ambient, es filtraren i es rentaren amb  $\text{H}_2\text{O}$  (4 x 0,5 mL), tot recollint la dissolució, la qual conté els derivats del CoASH.

En assaigs preliminars, tant la resina filtrada com la dissolució recollida, donaven un test d'Ellman qualitatiu positiu, tot indicant que, si bé hi havia hagut transtioesterificació, la reacció no havia evolucionat completament.

Les dissolucions es liofilitzaren per tal d'evitar la hidròlisi dels possibles tioèsters formats en presència de  $\text{NaHCO}_3$ , tot aconseguint productes sòlids blancs i esponjosos, els quals haurien de correspondre a cada derivat acilat del coenzim A (**148-152**), probablement contaminats amb CoASH de partida.

Un primer estudi per HPLC no va conduir a resultats concluent, ja que, tot i detectar-se la presència de CoASH de partida, també apareixien dos nous productes. Un d'ells, més polar podria correspondre al disulfur resultant de l'oxidació en solució bàsica del CoASH de partida. L'altre producte no es va poder determinar la seva estructura.

Es va intentar realitzar els espectres d'IR, ja que a la reacció es formava un enllaç de tipus *S*-tioèster, no present en la molècula de partida. Tanmateix, el carbonil del grup amida i els grups fosfats de la molècula (Figura 5.1, pàgina 199), els quals apareixien al

voltant de 1650-1700  $\text{cm}^{-1}$ , van dificultar l'assignació sense ambigüitats de la banda corresponent a l'*stretching* C=O, també al voltant de 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Tot i així, a 1360  $\text{cm}^{-1}$  sortia una banda absent al tiol de partida, i present al tioacetat de *S*-octil (**141**) format en solució. Per tant, tot semblava indicar que, encara que la conversió no va ser total, sí que es va formar acil-CoA final.

Per tal de confirmar d'una forma definitiva la presència de derivat tioèster, també es van realitzar els espectres de RMN de  $^1\text{H}$  de dos dels acil-CoA sintetitzats: l'acetil-CoA (**148**) i el palmitoil-CoA (**151**) obtinguts amb la resina PEGA, tot utilitzant un camp magnètic de 500 MHz, en  $\text{D}_2\text{O}$  com a dissolvent. A l'espectre corresponent al compost **148**, a banda de l'esquelet de la molècula de coenzim A, existeix un senyal en forma de singlet a 2,23 ppm, el qual s'assignà de forma inequívoca al grup acetat ( $\text{CH}_3\text{COS}$ ). Per integració d'aquest senyal, sembla ser que la conversió del CoASH en el derivat **148** va ser al voltant del 45%. En el cas de l'anàlisi del compost **151**, l'espectre va mostrar dos nous senyals, un triplet a 0,91 ppm ( $J=7,0$  Hz) que es va assignar al metil terminal de la cadena alifàtica ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}$ ) i un senyal ampli a 0,74 ppm que corresponia al metilens de la cadena hidrocarbonada ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}$ ). En aquest cas no es va poder calcular la conversió. Els altres derivats obtinguts, tant amb la resina PEGA com amb la resina ArgoPore<sup>®</sup>, encara estan pendents de l'anàlisi per ressonància magnètica nuclear d'hidrogen.

A més, encara es continua aquest treball tot intentant optimitzar aquesta darrera reacció de manera que s'obtinguin els productes desitjats amb una conversió total del coenzim A, facilitant així el procés de purificació dels tioèsters obtinguts.



## ***6.- PART EXPERIMENTAL***



## 6. PART EXPERIMENTAL

### 6.1. QUÍMICA

#### 6.1.1. Dades generals

Els espectres d'infraroig s'han registrat en un espectròmetre Bomem MB-120 amb transformada de Fourier en film de cloroform o en pastilla de KBr. Els espectres de ressonància magnètica nuclear s'han realitzat en un espectròmetre Varian Unity 300 tot treballant a 300 MHz, 75 MHz i 282 MHz per a  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{19}\text{F}$  respectivament, o en un espectròmetre Varian Gemini 200 treballant a 200 MHz pel  $^1\text{H}$  i a 50 MHz pel  $^{13}\text{C}$ . En tots els casos s'ha fet servir cloroform deuterat ( $\text{CDCl}_3$ ) com a dissolvent i s'han referit els desplaçaments químics pel  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  al cloroform present en el solvent com a referència interna ( $\delta=7,24$  ppm, i 77,0 ppm, respectivament), excepte en els casos requerits (indicats en aquesta part experimental), on es fa servir una dissolució de tetrametilsilà (TMS) al 3% en  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta=0,00$  ppm), aigua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta=4,60$  ppm),  $d_6$ -DMSO ( $\delta=2,49$  ppm pel cas del  $^1\text{H}$ , i 39,5 ppm pel  $^{13}\text{C}$ ) o  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta=3,31$  ppm pel cas del  $^1\text{H}$ , i 49,0 ppm pel  $^{13}\text{C}$ ). En els espectres de RMN de  $^{19}\text{F}$  s'ha emprat una dissolució de triclorofluorometà ( $\text{CFCl}_3$ ) al 5% en  $\text{CDCl}_3$  com a referència interna ( $\delta=0,00$  ppm). Els desplaçaments químics es donen en parts per milió (ppm) i les multiplicitats observades en l'assignació de senyals apareixen en el text de la següent manera: s, singlet; d, doblet; t, triplet; q, quadruplet; quin, quintet; hept, heptuplet; m, multiplet; dd, doble doblet; dt, doble triplet; tt, triplet de triplets; tq, triplet de quadruplets; sa, senyal ample; sc, senyal complex. Les constants d'acoblament ( $J$ ) estan donades en Hertz (Hz).

La determinació de la puresa per anàlisi elemental, s'ha determinat en un analitzador Carlo Erba-1106, Carlo Erba EA-1108 o Perkin Elmer CHN 2400. Els punts de fusió es determinaren en un aparell Koffler i estan descrits sense corregir.

Les anàlisis per CG s'han dut a terme en un cromatògraf Fisons MFC 800, sèrie 8000, acoblat a un detector d'ionització de flama, amb una columna EC-1 Alltech (30 m x 0,25 mm de d.i., 0,25 µm de fase) i heli com a gas portador, o bé en un cromatògraf Trace GC ThermoQuest sèrie 2000, acoblat també a un detector d'ionització de flama, amb una columna HP-1 de 30 m x 0,25 µm x 0,20 mm d.i amb heli com a gas portador.

Les anàlisis per CG-EM s'han dut a terme en un cromatògraf de gasos Fisons MD 8000 acoblat a un detector selectiu de masses Fisons MD-800 amb analitzador quadrupolar, tot utilitzant una columna HP-1 de 30 m x 0,25 µm x 0,20 mm d.i. heli com a gas portador, o bé en un espectròmetre de masses Trace MS ThermoQuest sèrie 2000 amb analitzador de tipus quadrupol acoblat a un cromatògraf de gasos amb una columna HP-5M (30 m x 0,25 mm de d.i., 0,25 µm de fase). El mode d'ionització és per impacte electrònic. S'utilitza heli com a gas portador.

Les anàlisis per HPLC es van realitzar en un equip Waters 2695 (Alliance) tot emprant una columna Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters) de 3,9 x 150 mm. El detector és de fotodiode, de la casa Waters (model 996).

Les lectures d'absorbància en les quantificacions de les resines amb el reactiu d'Ellman s'han realitzat en un espectròmetre Spectramax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a una longitud d'ona de 412 nm, a 25°C i amb les mostres disposades en una placa de 96 pous de fons pla Daslab.

Els filtres emprats en les reaccions en fase sòlida són de 20 µm (Lida Manufacturing Corp).

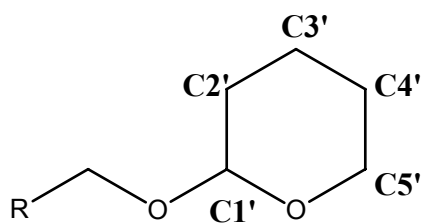
La cromatografia en capa fina analítica s'ha efectuat sobre plaques de sílice Merck 60F<sub>254</sub> de 0,1 mm de gruix, emprant com a revelador llum ultraviolada ( $\lambda=254$  nm), una dissolució d'àcid fosfomolibdic en etanol (6%, p/v) o una solució de *p*-anisaldehyd en EtOH i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 % v/v).

En la purificació de productes mitjançant cromatografia en columna s'ha fet servir gel de sílice de 35-70 µm de partícula. Les purificacions per cromatografia en capa fina preparativa s'han realitzat sobre plaques de sílice Merck 60F<sub>254</sub> de 20 x 20 cm i gruix variable.

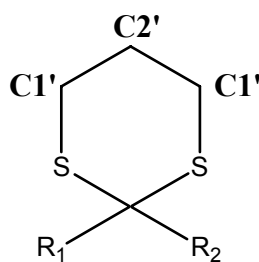
Els dissolvents anhidres es van preparar de la següent forma: THF, Et<sub>2</sub>O i pentà per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre sodi i benzofenona; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, hexà i CH<sub>3</sub>CN per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre CaH<sub>2</sub>; acetona, per destil·lació a pressió atmosfèrica sobre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; etilenglicol, destil·lat sobre MgSO<sub>4</sub> i recollit sobre tamisos moleculars de 4Å; Et<sub>3</sub>N i piridina per destil·lació sobre KOH; i DMSO, HMPA i DMF, per destil·lació sobre CaH<sub>2</sub> a pressió reduïda, guardats sobre tamisos moleculars de 4Å sota atmosfera d'argó.

La valoració del CH<sub>3</sub>Li i del *n*-BuLi s'ha realitzat amb àcid difenilacètic, a temperatura ambient, tot emprant THF com a dissolvent. En el cas de valorar *tert*-BuLi s'emprà 2,5-dimetoxifenil alcohol, també en THF.

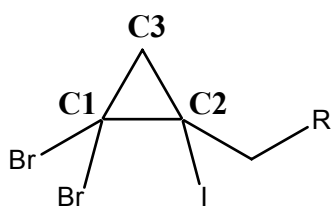
Assignació numèrica escollida en aquesta part experimental a l'hora de descriure per ressonància magnètica nuclear els diferents cicles apareguts a la memòria.



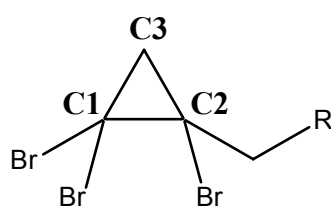
Derivats tetrahidropiranílics



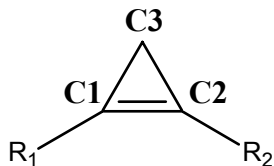
Derivats del 1,3-ditià



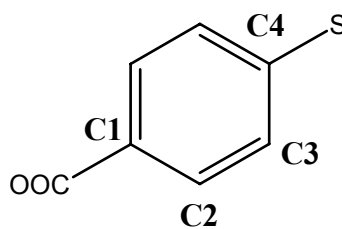
Derivat dibromiodociclopropànic



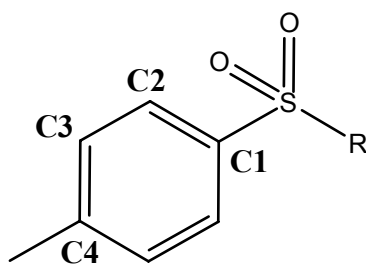
Derivats tribromociclopropànics



Derivats ciclopropènics



Derivats del *p*-mercaptobenzoic



Derivats del *p*-toluensulfònic

### 6.1.2. Síntesi dels àcids [2,2,3,3,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>], -[2,2,3,3,13,13-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>] i [2,2,3,3,-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tetradecanoics (24, 25 i 28)

#### 6.1.2.1. Síntesi del 8-bromooctan-1-ol (1) i del 6-bromo-1-hexan-1-ol (2)

En un matràs de 3 boques de 100 mL, proveït de refrigerant de tipus Dimroth, i embut d'addició de pressió compensada, es disposen 2,5 g (17,1 mmol) d'1,8-octandiòl dissolts en 40 mL de toluè. Es refreda el matràs a 0°C i s'afegeixen 18 mL de HBr aq. del 47% (137,0 mmol). Un cop finalitzada l'addició s'escalfa el sistema a 125-130°C durant 2 h 30 min. Passat aquest temps, es refreda i s'addicionen 10 mL d'una solució de NaOH 10 M. S'extreu la fase aquosa amb hexà, i les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seguit de solució saturada de NaCl fins a pH neutre. S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> anh i després d'evaporar el dissolvent a pressió reduïda, el cru que en resulta es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb una mescla hexà:Et<sub>2</sub>O (75:25). En aquestes condicions s'obtenen 3,1 g (14,8 mmol) de 8-bromooctan-1-ol (1) amb un rendiment del 86%.

Per tal d'obtenir 2, es fan reaccionar 3 g d'1,6-hexandiòl (25,4 mmol), 48 mL de toluè i 23 mL (203,4 mmol) de HBr al 47% aq. S'obtenen finalment 3 g (16,6 mmol) de 6-bromohexan-1-ol (2) amb un 65% de rendiment.

##### *8-bromooctan-1-ol (1)*

**IR (film)/v:** 3340, 2931, 2856, 1463, 1245, 1056, 723 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 3,60 (t, *J*=6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3,37 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 1,31 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ:** 62,9 (CH<sub>2</sub>OH); 33,9 (CH<sub>2</sub>Br); 32,7; 32,6; 29,1; 28,6; 28,0; 25,5 (CH<sub>2</sub>) ppm.

##### *6-bromohexan-1-ol (2)*

**IR (film)/v:** 3360, 2935, 2860, 1461, 1431, 1259, 1053 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 3,59 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3,37 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 1,5-1,8 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br); 1,38 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ:** 62,6 (CH<sub>2</sub>OH); 33,7 (CH<sub>2</sub>Br); 32,6; 32,4; 27,8; 24,8 (CH<sub>2</sub>) ppm.

#### 6.1.2.2. Síntesi del 9,11-dioxa-1-bromododecà (3) i del 7,9-dioxa-1-bromodecà (4)

En un matràs d'una boca de 250 mL, es disposen 11 g (52,6 mmol) de 8-bromooctan-1-ol (1) dissolts en 88 mL de dimetoximetà. S'afegeixen 900 mg (10,5 mmol) de LiBr, 1,0 g (5,2 mmol) de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O i es deixa la mescla en agitació a ta durant 16 h. S'afegeixen 50 mL de solució saturada de NaCl, s'extreu amb hexà i les

fases orgàniques reunides es renten amb H<sub>2</sub>O. S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> anh. i després d'evaporar el dissolvent, s'obtenen 12,9 g (51,0 mmol, 97%) de l'alcohol protegit **3**.

Tot fent reaccionar 3,63 g (20,1 mmol) de 6-bromohexan-1-ol (**2**), 350 mg (4,0 mmol) de LiBr, 380 mg (2,0 mmol) de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, en 30 mL de dimetoximetà, s'obtenen 4,32 g (19,2 mmol) de l'alcohol protegit **4** amb un rendiment del 96%.

*9,11-dioxa-1-bromododecà (3)*

**IR (film)/v:** 2931, 2856, 1465, 1440, 1386, 1215, 1147, 1110, 1047, 723 cm<sup>-1</sup>.

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 4,59 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,49 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,38 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,5-1,8 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br); 1,31 (sa, 8H, 4CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ:** 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 67,7 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 33,9 (CH<sub>2</sub>Br); 32,7; 29,6; 29,2; 28,6; 28,0; 26,0 (CH<sub>2</sub>) ppm.

*7,9-dioxa-1-bromodecà (4)*

**IR (film)/v:** 2935, 2862, 1461, 1242, 1143, 1110, 1045 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 4,59 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,49 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,38 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,5-1,8 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br); 1,40 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ:** 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 67,5 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 33,7 (CH<sub>2</sub>Br); 32,7; 29,5; 27,9; 25,3 (CH<sub>2</sub>) ppm.

### 6.1.2.3. Síntesi de les cetones **8** i **9**

#### 6.1.2.3.1. Síntesi de la 12,14-dioxa-2-pentadecanona (**9**)

##### 6.1.2.3.1.1. Síntesi del 2-(9,11-dioxadodecil)-3-oxo-butanoat d'etil (**6**)

En un matràs de 3 boques, prèviament flamejat, proveït de refrigerant de tipus Dimroth, es disposen, sota atmosfera d'argó, 1,3 mL d'EtOH absolut. S'addicionen en petites porcions 46 mg (2,0 mmol) de sodi; un cop dissolt, s'afegeixen 252 μL (2,0 mmol) d'acetoacetat d'etil portant la reacció a reflux (90-95°C). A aquesta temperatura, s'addicionen 500 mg (2,0 mmol) de 9,11-dioxa-1-bromododecà (**3**) i es deixa en agitació durant 26 h. Es refreda i s'afegeixen 5 mL de solució saturada de NH<sub>4</sub>Cl, extraient la fase aquosa amb hexà. Les fases orgàniques reunides es renten amb H<sub>2</sub>O, i s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> anh. Un cop evaporat el dissolvent, el cru es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (82:18). En aquestes condicions s'obtenen 360 mg (1,2 mmol) del β-cetoèster **6** desitjat amb un 60% de rendiment, juntament amb 86 mg (0,34 mmol) de bromur **3** de partida (17%).



**IR (film)/v:** 2931, 2856, 1741, 1716, 1465, 1147, 1112, 1043  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 4,57 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 4,15 (q,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 3,46 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,34 (t,  $J=6,0$  Hz, 1H,  $\text{COCHCO}_2\text{Et}$ ); 3,31 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1,5-1,8 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{CH}_2\text{CHCO}$ ); 1,24 (sa, 12H,  $6\text{CH}_2$ ); 1,22 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 200,3 (CO); 169,8 ( $\text{CO}_2$ ); 96,3 ( $\text{OCH}_2$ ); 67,7 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 61,2 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 55,0 ( $\text{OCH}_3$ ); 28,6 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 29,6; 29,2; 29,1; 28,1; 27,3; 26,0 ( $\text{CH}_2$ ); 14,0 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

#### 6.1.2.3.1.2. Síntesi de la 12,14-dioxa-2-pentadecanona (9)

##### 6.1.2.3.1.2.1. Mitjançant Na/etilenglicol

En un matràs de 3 boques, flamejat, i proveït de refrigerant tipus Dimroth, s'afegeixen, sota atmosfera d'argó, 1,8 mL d'EtOH absolut i 56 mg (2,4 mmol) de Na. Un cop s'ha dissolt el Na, s'addicionen 4 mL de etilenglicol sec i s'escalfa el sistema a 85-90°C. Es deixa en agitació a aquesta temperatura durant 15 min i seguidament s'addicionen 200 mg (0,66 mmol) del 2-(9,11-dioxadodecil)-3-oxo-butanoat d'etil (6). Transcorreguts 30 min es refreda el matràs a ta, s'afegeix 1 mL de solució saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , s'extreu amb hexà, i les fases orgàniques reunides es renten amb  $\text{H}_2\text{O}$ , s'assequen sobre  $\text{MgSO}_4$ , i després d'evaporar el dissolvent, el cru es purifica mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà:AcOEt (90:10). Un cop evaporat el dissolvent s'obtenen 90 mg (0,39 mmol, 60%) d'un oli que s'assigna a la cetona desitjada 9.

**IR (film)/v:** 2929, 2856, 1716, 1465, 1359, 1147, 1110, 1045, 918  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 4,58 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 3,47 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,32 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 2,37 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{COCH}_2$ ); 2,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1,5-1,8 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 1,25 (sa, 10H,  $5\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 209,3 (CO); 96,3 ( $\text{OCH}_2$ ); 67,8 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 55,0 ( $\text{OCH}_3$ ); 43,7 ( $\text{CH}_3\text{COCH}_2$ ); 29,8; 29,6; 29,35; 29,33; 29,2; 29,1; 26,1 ( $\text{CH}_2$ ); 23,7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ppm.

##### 6.1.2.3.1.2.2. Mitjançant DMSO-LiCl

En un matràs d'una boca proveït de refrigerant de tipus Dimroth, s'introdueixen 207 mg (0,68 mmol) del  $\beta$ -cetoèster 6 dissolt en 2 mL de DMSO humit. S'addicionen 56 mg (1,3 mmol) de LiCl i es porta el sistema a reflux durant 4 h. Passat aquest temps es refreda la reacció, s'afegeix  $\text{H}_2\text{O}$ , s'extreu amb hexà, es renta la fase orgànica amb  $\text{H}_2\text{O}$ , s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$ , es filtra i s'evapora el solvent al buit. Després de purificar

el cru per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (75:25), s'obtenen 34 mg (0,18 mmol, 26%) d'un oli que s'assigna de forma unívoca a l'11-hidroxi-2-undecanona (**167**).

**IR (film)/v:** 3400, 2929, 2856, 1714, 1359, 1166, 1056 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 3,58 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,37 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>); 2,09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1,5-1,8 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 1,24 (sa, 10H, 5CH<sub>2</sub>-) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 209,3 (CO); 63,0 (CH<sub>2</sub>O); 43,7 (CH<sub>3</sub>COCH<sub>2</sub>); 33,1; 30,3; 30,1; 30,0; 29,8; 26,3; 23,6 (CH<sub>2</sub>); 24,0 (CH<sub>3</sub>CO) ppm.

#### 6.1.2.3.1.2.3. Mitjançant DABCO/xilè

En un matràs d'una boca proveït de refrigerant de tipus Dimroth, es disposen 100 mg (0,33 mmol) del β-cetoèster **6** en 1,2 mL de xilè (mescla d'isòmers). S'addicionen 556 mg (4,9 mmol) de DABCO i es porta el sistema a 140-150°C durant 24 h. Transcorregut aquest temps, es deixa refredar, s'acidifica amb 10 mL de HCl 1 M, i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O, tot rentant les fases orgàniques amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seguit de H<sub>2</sub>O; un cop assecat el solvent amb MgSO<sub>4</sub> i evaporat al buit, s'obtenen 35 mg (0,15 mmol) de la cetona **9** amb un rendiment del 45%, la qual exhibeix un espectre d'hidrogen idèntic al mostrat en l'apartat 6.1.2.3.1.2.1.

#### 6.1.2.3.2. Síntesi de la 12,14-dioxa-5-pentadecanona (**8**)

##### 6.1.2.3.2.1. Síntesi del 2-butil-1,3-ditià (**5**)

En un baló de tres boques de 250 mL proveït de refrigerant de tipus Dimroth i embut d'addició de pressió compensada, s'introdueixen 2 mL (15,9 mmol) de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, 4,1 mL d'AcOH glacial i 8,2 mL de CHCl<sub>3</sub> tot escalfant la mescla a 80°C. Un cop assolida aquesta temperatura, s'addicionen a través de l'embut 2,5 mL (23,5 mmol) de pentanal i 2,6 mL (25,8 mmol) d'1,3-propanditiol dissolts en 61 mL de CHCl<sub>3</sub> i es deixa el sistema en agitació a 100°C durant 16 h. Passat aquest temps, es refreda a ta, i es renta la fase orgànica amb KOH al 10%, seguit de solució saturada de NaCl. La fase aquosa es reextreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, i les fases orgàniques reunides s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub>, tot filtrant i eliminant el dissolvent. El cru així obtingut es purifica mitjançant destil·lació a pressió reduïda (P=7,5 mmHg, T<sub>d</sub>=122-123°C), per tal d'obtenir 3,7 g (21,0 mmol) de 2-butil-1,3-ditià (**5**) amb un rendiment del 93%.

**IR (film)/v:** 2954, 2931, 2898, 2858, 1465, 1421, 1274, 1242, 1182, 908 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 4,0 (t, *J*=7,0 Hz, 1H, CH); 2,8 (sc, 4H, 2C<sub>2</sub>H); 2,1 (sc, 2H,

C3H); 1,2-1,8 (sc, 6H, 3CH<sub>2</sub>); 0,8 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz),  $\delta$ : 47,6 (C1); 35,1 (C3); 30,4; 26,0; 28,7 (CH<sub>2</sub>); 22,2 (2C2); 13,7 (CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 6.1.2.3.2.2. Síntesi del 2-butil-2-(7,9-dioxadecil)-1,3-ditià (7)

En un matràs de dues boques, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, s'introdueixen 370 mg (2,2 mmol) de 2-butil-1,3-ditià (5) en 4 mL de THF anh. Es refreda a  $-30^{\circ}\text{C}$  i s'addicionen 2,5 mL (3,5 mmol) de *n*-BuLi (1,34 M en hexà) i es deixa a aquesta temperatura durant 1 h 30 min. Posteriorment, es torna a refredar a  $-78^{\circ}\text{C}$ , es deixa 10 min a aquesta temperatura, i s'afegeixen 375 mg (1,7 mmol) de 7,9-dioxa-1-bromodecà (4) dissolts en 1 mL de THF anh. Es deixa 1 h a  $-78^{\circ}\text{C}$  i finalment es permet que assoleixi ta. S'evapora el THF, s'afegeix H<sub>2</sub>O al cru i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub>, i el cru obtingut després d'evaporar el dissolvent, es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice, tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (92:8). D'aquesta forma s'aconsegueixen 432 mg (1,3 mmol, 81%) del ditià (7) esperat.

**IR (film)/v**: 2935, 2860, 1463, 1274, 1149, 1110, 1047, 919 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 4,58 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,47 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,76 (sc, 4H, 2C2H); 1,3-1,9 (sc, 18H, 8CH<sub>2</sub> i C3H); 0,88 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 67,6 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 53,2 (C1); 38,0; 37,8 (C3); 29,6 (C2); 26,0; 29,5; 26,1; 25,9; 25,5; 23,9; 22,8 (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 6.1.2.3.2.3. Síntesi de la 12,14-dioxa-5-pentadecanona (8)

En un matràs d'una boca de 100 mL proveït d'embut d'addició de pressió compensada, es dissolen 780 mg (4,5 mmol) de NBS en 13 mL d'acetona amb un 5% d'aigua. Es refreda el sistema a  $-20^{\circ}\text{C}$  i s'addicionen 180,2 mg (0,56 mmol) de 2-butil-2-(7,9-dioxadecil)-1,3-ditià (7) dissolts en 17 mL d'acetona amb un 5% d'aigua. Es deixa a aquesta temperatura 5 min i un cop acabada la reacció s'escalfa a ta, s'afegeix una solució de NaHSO<sub>3</sub> (40% p/v) fins descoloració del color taronja. S'elimina l'acetona a pressió reduïda, i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O, tot rentant la fase orgànica diversos cops amb solució saturada de NaCl. Un cop assecat amb MgSO<sub>4</sub>, filtrat i eliminat el solvent, s'obtenen 110,6 mg (0,48 mmol) d'un oli que s'assignà a la cetona 8 (85%).

**IR (film)/v**: 2923, 2864, 1714, 1465, 1379, 1147, 1110, 1045, 919 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 4,57 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,47 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,359 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>); 2,352 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>); 1,2-1,5 (sc,

12H, 6CH<sub>2</sub>); 0,86 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 211,5 (CO); 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 67,6 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 42,6; 42,5 (2COCH<sub>2</sub>-); 29,5; 28,9; 25,99; 25,92; 23,7; 22,3 (CH<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 6.1.2.4. Síntesi del [2-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecanol (11) i del [5-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-5-pentadecanol (10)

En un matràs d'una boca de 10 mL es disposen 278 mg (1,2 mmol) de 12,14-dioxa-2-pentadecanona (9) dissolta en 1,2 mL de MeOH; es refreda el sistema a 0°C i s'addicionen 101 mg (2,4 mmol) de NaBD<sub>4</sub> (98% de D). Transcorreguda 1 h d'agitació a ta, es refreda el sistema a 0°C i s'addiciona H<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; s'extreu la fase aquosa amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, es renta la fase orgànica amb solució saturada de NaCl, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i després de filtrar i destil·lar el dissolvent a pressió reduïda, s'obtenen 269 mg (1,1 mmol) de l'alcohol deuterat esperat 11 amb un rendiment del 95%.

Pel cas de l'obtenció de l'alcohol 10, 255 mg (1,1 mmol) de 12,14-dioxa-5-pentadecanona (8) en 1,2 mL de MeOH, es fan reaccionar amb 90 mg (2,1 mmol) de NaBD<sub>4</sub> (98% de D), tot aconseguint 238 mg (1,0 mmol) de l'alcohol 10 desitjat amb un rendiment del 92%.

##### [2-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecanol (11)

**IR (film)/v**: 3440, 2927, 2856, 1465, 1373, 1149, 1112, 1045, 919 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz),  $\delta$ : 4,58 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,47 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,5-1,7 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 1,13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 67,8 (CH<sub>2</sub>O); 67,6 (t,  $J=21,5$  Hz, C(OH)D); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 39,2 (CH<sub>2</sub>C(OH)D); 29,6; 29,3; 26,1; 25,6 (CH<sub>2</sub>); 23,3 (CH<sub>3</sub>) ppm.

##### [5-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecanol (10)

**IR (film)/v**: 3438, 2931, 2858, 1465, 1380, 1217, 1151, 1112, 1045, 919 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 4,57 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,47 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,3-1,5 (sc, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,86 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 71,3 (t,  $J=21,0$  Hz, C(OH)D); 67,7 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 37,2; 37,0; 29,6; 29,4; 27,7; 26,1; 25,5; 22,7 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>) ppm.

**6.1.2.5. Síntesi del *p*-toluensulfonat de [2-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecil (13) i del *p*-toluensulfonat de [5-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-5-pentadecil (12)**

En un baló de dues boques de 25 mL, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, es disposen 269 mg (1,1 mmol) de [2-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecanol (**11**) dissolts en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anh. S'addicionen 110 mg (1,1 mmol) de Me<sub>3</sub>N·HCl (assecat durant 2 h a 1mmHg), 400 µL (2,9 mmol) de Et<sub>3</sub>N anh., es refreda a 0°C i s'afegeixen 330 mg (1,7 mmol) de TsCl dissolt en 1,5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anh tot deixant en agitació a 0°C durant 1 h 30 min. Passat aquest temps es realitza el tractament de la reacció, s'afegeix H<sub>2</sub>O a 0°C, s'extreu amb AcOEt, i es renten les fases orgàniques reunides amb HCl 1 M, seguit de solució saturada de NaCl; després d'assecar sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrar i evaporar el solvent, el cru que en resulta es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice, tot emprant com a eluents hexà:AcOEt (86:14). Un cop evaporat el solvent, s'assoleixen 325 mg (0,84 mmol, 73%) d'un oli que s'assignà al tosilat **13** esperat.

En el supòsit d'utilitzar 238 mg (1,0 mmol) de [5-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-5-pentadecanol (**10**) en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anh, 97 mg (1,0 mmol) de Me<sub>3</sub>N·HCl, 355 µL (2,5 mmol) de Et<sub>3</sub>N anh i 292 mg (1,5 mmol) de TsCl en 1,5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anh., s'aconsegueixen 286 mg (0,74 mmol, 73%) del tosilat (**12**) esperat.

*p*-Toluensulfonat de [2-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecil (**13**)

**IR (film)/v:** 3031, 2929, 2856, 1598, 1463, 1359, 1178, 1110, 1045, 908 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, TMS), **δ:** 7,76 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C2H); 7,29 (d, *J*=8,0 Hz, 2H, C3H); 4,58 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,48 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ph); 1,21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,2-1,4 (sc, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 144,3 (C4); 134,5 (C1); 129,6 (C3); 127,6 (C2); 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 80,2 (t, *J*=22,0 Hz, CDOTs); 67,8 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 36,3; 29,7; 29,3; 29,2; 29,0; 26,1; 24,7 (CH<sub>2</sub>); 21,5 (CH<sub>3</sub> Ph); 20,6 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*p*-Toluensulfonat de [5-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-5-pentadecil (**12**)

**IR (film)/v:** 2935, 2864, 1598, 1465, 1359, 1178, 1110, 1045, 900 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, TMS), **δ:** 7,76 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C2H); 7,29 (d, *J*=8,0 Hz, 2H, C3H); 4,58 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3,45 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3,33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ph); 1,2-1,5 (sc, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,78 (t, *J*=6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 144,3 (C4); 134,7 (C1); 129,6 (C3); 127,6 (C2); 96,3 (OCH<sub>2</sub>); 84,0 (t, *J*=21,5 Hz, CDOTs); 67,7 (CH<sub>2</sub>O); 55,0 (OCH<sub>3</sub>); 33,8; 33,6; 29,5; 29,0; 26,7; 25,9; 24,5; 22,3 (CH<sub>2</sub>); 21,5 (CH<sub>3</sub> Ph); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 6.1.2.6. Síntesi del [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecan-1-ol (15) i del [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecan-1-ol (14)

En un matràs de dues boques, es disposen 105 mg (2,5 mmol) de LiAlD<sub>4</sub> (99% de D) dissolts en 2 mL d'Et<sub>2</sub>O anh. Es refreda el sistema a 0°C i s'afegeixen 325 mg (0,84 mmol) de *p*-toluensulfonat de [2-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-2-pentadecil (**13**) en 1,5 mL d'Et<sub>2</sub>O anh. Es deixa la suspensió resultant en agitació a ta durant 3 h. La reacció es torna a refredar a 0°C i s'afegeix lentament H<sub>2</sub>O, hexà i HCl 1 M per tal d'eliminar les sals d'alumini. S'extreu amb hexà, es renten les fases orgàniques reunides amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seguit de solució saturada de NaCl. Després d'assecar sobre MgSO<sub>4</sub> i evaporar el dissolvent, el cru es dissol en 9 mL de HCl al 10% en MeOH. Transcorregudes 16 h en agitació a ta, es realitza el tractament de la reacció. S'evapora el MeOH a pressió reduïda, s'afegeix H<sub>2</sub>O, i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seguit de H<sub>2</sub>O. Un cop assecat amb MgSO<sub>4</sub> i evaporat el dissolvent, el cru resultant es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice, tot eluint amb hexà:AcOEt (88:12). S'obtenen, d'aquesta manera, 108 mg (0,62 mmol) d'alcohol **15** desitjat amb un rendiment del 78%.

En el cas d'utilitzar 286 mg (0,74 mmol) de *p*-toluensulfonat de [5-<sup>2</sup>H]-12,14-dioxa-5-pentadecil (**12**), 93 mg (2,2 mmol) de LiAlD<sub>4</sub> (99% de D) en 3 mL d'Et<sub>2</sub>O anh i dissoldre el cru obtingut en 8 mL de HCl al 10% en MeOH, s'aconsegueixen 100 mg (0,57 mmol) de l'alcohol esperat (**14**) amb un rendiment global del 80%.

##### [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecan-1-ol (**15**)

**IR (film)/v:** 3344, 2925, 2854, 1461, 1377, 1348, 1163, 1056, 721 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,61 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 1,54 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 62,7 (CH<sub>2</sub>OH); 32,6; 31,6; 29,58; 29,56; 29,4; 29,2 (CH<sub>2</sub>); 21,8 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 13,7 (CH<sub>3</sub>) ppm.

##### [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecan-1-ol (**14**)

**IR (film)/v:** 3360, 2956, 2923, 2854, 1460, 1178, 1110, 1056 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 3,61 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 1,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 62,8 (CH<sub>2</sub>OH); 32,6; 31,8; 29,35; 29,36; 29,0; 28,7 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 25,7; 22,6 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>) ppm.

### 6.1.2.7. Síntesi del [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-bromoundecà (17) i del [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-bromoundecà (16)

En un matràs de 3 boques, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, es disposen 133 mg (0,76 mmol) de [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecan-1-ol (**15**) i 400 mg (1,5 mmol) de PPh<sub>3</sub> (recristal·litzada d'EtOH) dissolts en 1,3 mL de DMF anh. S'addicionen lentament 273 mg (1,5 mmol) de NBS tot obtenint una solució de color vermell intens. Es porta el matràs a un bany preescalfat a 50°C i es deixa a aquesta temperatura durant 15 min. Passat aquest temps, es refreda a ta, s'addicionen 0,5 mL de MeOH per tal d'eliminar l'excés de reactiu, i es deixa en agitació 5 min més. El cru que en resulta s'extreu amb Et<sub>2</sub>O, es renten les fases orgàniques reunides diversos cops amb HCl 1 M, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, i després de filtrar i eliminar el solvent al buit, el sòlid que s'obté es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice, tot eluint amb hexà. D'aquesta forma s'obtenen 127 mg (0,54 mmol) del bromur **17** amb un rendiment del 70%.

Si es fan reaccionar 163 mg (0,94 mmol) de [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecan-1-ol (**14**), 490 mg (1,9 mmol) de PPh<sub>3</sub> i 333 mg (1,9 mmol) de NBS, en 1,6 mL de DMF anh, s'aconsegueixen 163 mg (0,69 mmol) del bromur desitjat (**16**) amb un 74% de rendiment.

#### [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-bromoundecà (17)

**IR (film)/v**: 2958, 2923, 2854, 1461, 1163, 721 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 3,38 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 34,0 (CH<sub>2</sub>Br); 32,8; 31,6; 29,57; 29,54; 29,4; 29,2; 28,1 (CH<sub>2</sub>); 21,9 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm.

#### [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-bromoundecà (16)

**IR (film)/v**: 2958, 2923, 2854, 1463, 1178, 1110, 1056 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 3,38 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,86 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 34,0 (CH<sub>2</sub>Br); 32,8; 31,8; 29,38; 29,33; 29,1; 28,7; 28,1; 29,2 (quin, *J*=18,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 22,6 (CH<sub>2</sub>); 14,1 (CH<sub>3</sub>) ppm.

### 6.1.2.8. Síntesi del [12,12-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-tridecí (19), del [9,9-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-tridecí (18) i del 1-tridecí (27)

En un matràs de tres boques de 25 mL, proveït de condensador de NH<sub>3</sub>, refredat a -78°C, es condensen 20 mL de NH<sub>3</sub> gas. Tot mantenint aquesta temperatura es fa

bombollejar acetilè durant 1 h. Passat aquest temps s'afegeixen 10 mg (0,92 mmol) de liti metàl·lic. Un cop dissolt, s'addiciona 1 mL de DMSO anh, es canvia el condensador de NH<sub>3</sub> per un refrigerant de tipus Dimroth, i es porta el sistema a ta per tal d'evaporar tot l'amoníac. Un cop evaporat, sobre la suspensió d'acetilur de liti s'addicionen 121 mg (0,51 mmol) de [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-bromoundecà (**17**) dissolts en 0,2 mL de DMSO anh. i es deixa en agitació a ta durant 90 min. Es refreda a 0°C i s'addiciona solució saturada de NH<sub>4</sub>Cl. S'extreu amb hexà i les fases orgàniques reunides es renten amb NaCl, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i un cop evaporat el solvent, el cru resultant es purifica mitjançant cromatografia en columna sobre gel de sílice tot eluint amb hexà. D'aquesta manera s'obtenen 56 mg (0,31 mmol, 60%) de l'alquí **19** esperat.

Per tal de fornir l'alquí **18**, s'utilitzen 10 mg (1,2 mmol) de liti metàl·lic en 20 mL de NH<sub>3</sub> líquid saturat d'acetilè. Un cop dissolt el liti, s'afegeix 1 mL de DMSO anh, s'evapora l'amoníac, i s'addicionen 163 mg (0,69 mmol) de [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-bromoundecà (**16**) en 0,2 mL de DMSO anh, per acabar obtenint 72 mg (0,39 mmol, 58%) de l'alquí **18** desitjat.

Si es dissolen 27 mg (3,8 mmol) de Li metàl·lic en 25 mL de NH<sub>3</sub> líquid saturat d'acetilè, i s'afegeix 1 mL de DMSO anh un cop s'ha dissolt, seguit de 500 mg (2,1 mmol) d'11-bromoundecà en 0,2 mL de DMSO anh s'aconsegueixen 312 mg (1,7 mmol) d'1-tridecí (**27**) amb un rendiment del 82%.

*[12,12-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-tridecí (**19**)*

**IR (film)/v:** 3315, 2925, 2854, 1465, 1163, 721 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,16 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,91 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 84,6 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 67,9 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 31,7; 29,6; 29,5; 29,3; 29,1; 28,7; 28,5; 21,8 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 18,3 (CH<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*[9,9-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-tridecí (**18**)*

**IR (film)/v:** 3315, 2954, 2923, 2854, 1465, 721 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,15 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,90 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 67,9 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 31,8; 29,46; 29,41; 29,1; 28,7 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 28,4; 22,6; 18,3 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>) ppm.



*1-tridecí (27)*

**IR (film)/ $\nu$ :** 3315, 2956, 2925, 2854, 1465, 721  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,84 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,24 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ -); 0,85 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 84,8 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 67,9 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 31,9; 29,6; 29,4; 29,3; 29,1; 28,7; 28,5; 22,6; 18,3 ( $\text{CH}_2$ ); 14,1 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

**6.1.2.9. Síntesi del  $[13,13\text{-}^2\text{H}_2]$ -2-tetradecinoat de metil (21),  $[10,10\text{-}^2\text{H}_2]$ -2-tetradecinoat de metil (20) i del 2-tetradecinoat de metil (26)**

En un matràs de 10 mL d'una boca, prèviament flamejat, sota atmosfera d'argó, s'introdueixen 34 mg (0,19 mmol) de  $[12,12\text{-}^2\text{H}_2]$ -1-tridecí (19) dissolt en 300  $\mu\text{L}$  de THF anh. Es refreda el sistema a  $-78^\circ\text{C}$  i s'addicionen 175  $\mu\text{L}$  (0,22 mmol) de *n*-BuLi (1,3 M en hexà). Es manté el sistema a aquesta temperatura durant 30 min, passat els quals s'afegeixen 19  $\mu\text{L}$  (0,24 mmol) de cloroformiat de metil. Es deixa que la reacció assoleixi ta i es fa el tractament de la mateixa que consisteix en l'addició d'aigua i en l'extracció del cru amb  $\text{Et}_2\text{O}$ . Després d'assecar sobre  $\text{MgSO}_4$ , i d'eliminar el solvent, es purifica mitjançant cromatografia en columna sobre gel de sílice, tot eluint amb hexà: $\text{Et}_2\text{O}$  (97:3). D'aquesta forma, s'obtenen 35 mg (0,14 mmol) d'èster 21 amb un rendiment del 77%.

Si es fan reaccionar 71 mg (0,39 mmol) de  $[9,9\text{-}^2\text{H}_2]$ -1-tridecí 18, en 500  $\mu\text{L}$  de THF anh amb 360  $\mu\text{L}$  (0,45 mmol) de *n*-BuLi (1,3M en hexà) i 50  $\mu\text{L}$  (0,51 mmol) de  $\text{ClCO}_2\text{CH}_3$ , s'assoleixen 74 mg (0,31 mmol) d'èster acetilènic 20, amb un rendiment del 78%.

En el cas d'emprar 100 mg (0,55 mmol) d'1-tridecí (27) en 0,7 mL de THF anh, 510  $\mu\text{L}$  (0,67 mmol) de *n*-BuLi (1,3 M en hexà) i 60  $\mu\text{L}$  (0,72 mmol) de  $\text{ClCO}_2\text{CH}_3$  s'aconsegueixen 115 mg (0,48 mmol) de l'èster desitjat 26 amb un 87% de rendiment.

 *$[13,13\text{-}^2\text{H}_2]$ -2-tetradecinoat de metil (21)*

**IR (film)/ $\nu$ :** 2952, 2927, 2854, 2237; 1722; 1434, 1253, 1076  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,73 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 2,30 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ ); 1,54 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ ); 1,23 (sa, 14H,  $7\text{CH}_2$ ); 0,83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 154,1 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 89,8 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ ); 72,7 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ ); 52,4 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 31,6; 29,5; 29,3; 29,2; 28,9; 21,7 (quin,  $J=19,0$  Hz,  $\text{CD}_2$ ); 18,5 ( $\text{CH}_2$ ); 13,8 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

*[10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-tetradecinoat de metil (20)*

**IR (film)/v:** 2954, 2925, 2856, 2237; 1718; 1434, 1253, 1076, 752 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,30 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 154,2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 90,0 (CH<sub>2</sub>C≡C); 72,7 (CH<sub>2</sub>C≡C); 52,5 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 31,8; 29,3; 29,1; 29,0; 28,6 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 27,4; 22,6; 18,6 (CH<sub>2</sub>); 14,1 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*2-tetradecinoat de metil (26)*

**IR (film)/v:** 2952, 2925, 2854, 2237; 1720; 1434, 1253, 1076, 752 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,30 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C); 1,23 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 154,2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 90,0 (CH<sub>2</sub>C≡C); 72,7 (CH<sub>2</sub>C≡C); 52,5 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 31,8; 29,5; 29,39; 29,30; 28,9; 28,8; 27,4; 22,6; 18,6 (CH<sub>2</sub>); 14,1 (CH<sub>3</sub>) ppm.

**6.1.2.10. Síntesi del [2,2,3,3,13,13-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (23), [2,2,3,3,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (22) i del [2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (29)**

En un matràs d'una boca, s'introdueixen 34 mg (0,14 mmol) de [13,13-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-tetradecinoat de metil (**21**) dissolts en 1 mL de CD<sub>3</sub>OD. A continuació, s'addicionen 17 mg (0,71 mmol) de Mg i es permet la reacció a ta durant 24 h, acabant-se per dissoldre tot el metall. El tractament de reacció es porta a terme afegint HCl 37% fins a obtenir una solució transparent. S'addiciona H<sub>2</sub>O i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'asseca amb MgSO<sub>4</sub>, i un cop filtrat i evaporat el solvent, el cru obtingut es purifica mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (96:4). S'obtenen 24 mg (0,096 mmol, 70%) de l'èster **23** esperat.

En el cas d'utilitzar 73 mg (0,31 mmol) de [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-tetradecinoat de metil (**20**) dissolts en 2,5 mL de CD<sub>3</sub>OD 37 mg (16,1 mmol) de Mg, la reacció forneix 54 mg (0,21 mmol) de l'èster **22** amb un rendiment del 72%.

Si, anàlogament, es fan reaccionar 114 mg (0,48 mmol) de 2-tetradecinoat de metil (**26**) dissolts en 3,6 mL de CD<sub>3</sub>OD i 58 mg (2,4 mmol) de Mg, s'assoleixen 79 mg (0,32 mmol) d'èster (**29**) amb un rendiment del 68%.

*[2,2,3,3,13,13-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (23)*

**IR (film)/v:** 2923, 2854, 1739; 1458, 1282, 1091 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 1,22 (sa, 18H, 9CH<sub>2</sub>); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

*[2,2,3,3,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (22)*

**IR (film)/v:** 2923, 2854, 1739; 1465, 1282, 1091, cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 1,23 (sa, 18H, 9CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

*[2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (29)*

**IR (film)/v:** 2925, 2854, 1739; 1463, 1282, cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 1,23 (sa, 20H, 10CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

**6.1.2.11. Síntesi de l'àcid [2,2,3,3,13,13-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoic (25), l'àcid [2,2,3,3,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoic (24) i l'àcid [2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tetradecanoic (28)**

En un vial de 3 mL s'introdueixen 15 mg (0,060 mmol) de l'èster (**23**) dissolts en 120 μL de KOH en MeOH (2,5 M) humitejat amb D<sub>2</sub>O. Es deixa en agitació a ta durant 16 h. Passat aquest temps, s'evapora el MeOH, s'acidifica amb HCl 1 M i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Un cop assecada la fase orgànica amb MgSO<sub>4</sub>, filtrada i evaporat el solvent, el cru resultant es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice desactivat amb un 10% de H<sub>2</sub>O, tot eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (98:2). S'obtenen, d'aquesta forma, 9 mg (0,038 mmol) de l'àcid esperat **25** amb un rendiment del 70%.

Anàlogament, 30 mg (0,12 mmol) de [2,2,3,3,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**22**), es fan reaccionar amb 250 μL d'una dissolució 2,5 M de KOH en MeOH humitejat amb D<sub>2</sub>O, tot aconseguint 20 mg (0,085 mmol) de l'àcid deuterat final **24** amb un rendiment del 72%.

Per tal d'obtenir **28**, es fan reaccionar 30 mg (0,12 mmol) de [2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**29**) amb 250 μL de solució 2,5 M de KOH en CD<sub>3</sub>OD humitejat amb D<sub>2</sub>O. Finalment, s'assoleixen 20 mg (0,086 mmol) de l'àcid esperat **28**, amb un rendiment del 74%.

*Àcid [2,2,3,3,13,13-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoic (25)*

**IR (film)/v:** 2923, 2854, 1739; 1458, 1282, 1091 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 9,01 (sa, 1H, COOH); 1,23 (sa, 18H, 9CH<sub>2</sub>); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180,2 (COOH); 33,3 (quin, *J*=18 Hz, CD<sub>2</sub>COOH); 31,7; 29,66; 29,64; 29,4; 29,1; 28,7 (CH<sub>2</sub>); 23,8 (quin, *J*=20 Hz, CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>COOH); 21,8 (quin, *J*=19 Hz, CH<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm. **P.f.**=50-52°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, C: 71,76%; H+D: 12,04%. Trobat, C: 71,60%; H+D: 11,71%.

*Àcid [2,2,3,3,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-tetradecanoic (24)*

**IR (film)/v:** 2954, 2916, 2850, 1699; 1463, 1393, 1215, 908, 757 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 11,02 (sa, 1H, COOH); 1,23 (sa, 18H, 9CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180,6 (COOH); 33,38 (quin, *J*=20 Hz, CD<sub>2</sub>COOH); 31,8; 29,5; 29,4; 29,19; 29,15; 28,8; 24,1 (quin, *J*=20 Hz, CH<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>); 23,8 (quin, *J*=20 Hz, CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>COOH); 22,6 (CH<sub>2</sub>); 14,1 (CH<sub>3</sub>) ppm. **P.f.**=50-52°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, C: 71,76%; H+D: 12,04%. Trobat, C: 72,36%; H+D: 12,25%.

*Àcid [2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tetradecanoic (28)*

**IR (film)/v:** 2953, 2918, 2850, 1696; 1466, 1305, 950 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 10,99 (sa, 1H, COOH); 1,23 (sa, 20H, 10CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180,5 (COOH); 33,36 (quin, *J*=20 Hz, CD<sub>2</sub>COOH); 31,9; 29,66; 29,64; 29,5; 29,4; 29,3; 29,1; 28,8; 23,82 (quin, *J*=20 Hz, CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>COOH); 22,6 (CH<sub>2</sub>); 14,1 (CH<sub>3</sub>) ppm. **P.f.**=51-53°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>D<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, C: 72,37%; H+D: 12,14%. Trobat, C: 72,42%; H+D: 12,05%.

**6.1.3. Síntesi dels àcids [13,13-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-tiatetradecanoic (34), [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-tiatetradecanoic (35) i 3-tiatetradecanoic (38) i de l'àcid 3-oxatetradecanoic (39)**

**6.1.3.1. Síntesi dels àcids 3-tiatetradecanoics 34, 35 i 38**

**6.1.3.1.1. Síntesi del [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-iodoundecà (30) i del [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-iodoundecà (31)**

En un matràs de 3 boques es disposen 49 mg (0,28 mmol) de [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecanol (**15**), 220 mg (0,84 mmol) de PPh<sub>3</sub> (recristal·litzada d'EtOH) i 57 mg (0,84 mmol) d'imidazole en 0,8 mL de CH<sub>3</sub>CN i 1,3 mL de Et<sub>2</sub>O anh. Es refreda el sistema a 0°C s'addicionen 213 mg (0,84 mmol) de I<sub>2</sub> i es deixa en agitació durant 1 h a 0°C tot protegint el sistema de la llum. Transcorregut aquest temps, es para la reacció mitjançant l'addició d'Et<sub>2</sub>O i de solució saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> fins aconseguir descoloració. S'extreu amb Et<sub>2</sub>O, i les fases orgàniques reunides es renten amb H<sub>2</sub>O i solució saturada de NaCl. Un cop assecat el solvent i evaporat, el sòlid que en resulta es purifica mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà. Eliminat el solvent al buit, s'obtenen 76 mg (0,27 mmol) del iodur **30** que correspon al 96% de rendiment.

Per tal de sintetitzar **31**, es fan reaccionar 100 mg (0,57 mmol) de [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-undecanol (**14**), 452 mg (1,7 mmol) de PPh<sub>3</sub>, 117 mg (1,7 mmol) d'imidazole, en 2,6 mL d'Et<sub>2</sub>O anh i 1,6 mL de CH<sub>3</sub>CN amb 437 mg (1,7 mmol) de I<sub>2</sub>. S'obtenen 137 mg (0,48 mmol, 84%) del iodoalcà **31** esperat.

*[10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-iodoundecà (30)*

**IR (film)/v**: 2954, 2923, 2852, 1460, 1377, 1164, 721 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 3,16 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>I); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 33,5; 31,6; 30,4; 29,57; 29,54; 29,4; 29,2; 28,5 (CH<sub>2</sub>); 21,8 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (CH<sub>2</sub>I) ppm.

*[7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-iodoundecà (31)*

**IR (film)/v**: 2956, 2921, 2854, 1458, 1201, 1166, cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 3,16 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>I); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=6,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 33,5; 31,8; 30,5; 29,3; 29,1; 28,5; 28,7 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 22,6 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>); 7,2 (CH<sub>2</sub>I) ppm.

*6.1.3.1.2. Síntesi de l'1-iodoundecà (36)*

En un matràs d'una boca proveït de refrigerant de tipus Dimroth s'introdueixen, sota atmosfera d'argó, 1,8 g (12,0 mmol) de NaI (assecat a 80°C/1 mmHg durant 6 h) i 1 g (4,3 mmol) d'1-bromoundecà en 14 mL d'acetona anh. Es porta el sistema a reflux i es deixa en agitació durant 16 h. Passat aquest temps, es refreda el matràs i s'evapora l'acetona a pressió reduïda, s'addiciona H<sub>2</sub>O i s'extreu amb hexà, tot rentant les fases orgàniques reunides amb solució saturada de NaCl. Un cop assecat sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrat i eliminat el solvent, el cru que en resulta es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà. D'aquesta forma, s'obtenen 1,1 g (3,9 mmol) d'1-iodoundecà (**36**) amb un rendiment del 92%.

**IR (film)/v**: 2956, 2923, 2856, 1460, 1211, 1170, cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 3,16 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>I); 1,23 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,85 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 34,0; 32,5; 31,0; 30,3; 30,0; 29,18; 29,13; 28,85; 28,80; (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>); 7,2 (CH<sub>2</sub>I) ppm.

*6.1.3.1.3. Síntesi del [13,13-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-tiatetradecanoat de metil (32), [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-tiatetradecanoat de metil (33) i 3-tiatetradecanoat de metil (37)*

En un matràs de tres boques prèviament flamejat es disposen, sota atmosfera d'argó, 101 mg (0,35 mmol) de [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-iodoundecà (**30**), 74 mg (0,53 mmol) de

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anh en 1,8 mL de DMF seca. Seguidament s'addicionen 32 µL (0,35 mmol) de tioglicolat de metil i es deixa en agitació a ta durant 1 h. Passat aquest temps s'addiciona H<sub>2</sub>O, s'extreu amb Et<sub>2</sub>O, i es renta la fase orgànica de nou amb H<sub>2</sub>O. S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra i un cop evaporat el solvent a pressió reduïda, el cru que en resulta es purifica mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (96:4). D'aquesta forma s'obtenen 77 mg (0,39 mmol) de l'èster **32** amb un rendiment del 88%.

Anàlogament, per l'obtenció de **33**, 100 mg (0,35 mmol) de [7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-iodoundecà (**31**), 73 mg (0,53 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anh en 1,6 mL de DMF seca, es fan reaccionar amb 32 µL (0,35 mmol) de tioglicolat de metil. Un cop purificat, s'aconsegueixen 86 mg (0,33 mmol, 93%) de **33**.

Per tal d'obtenir **37**, es fan reaccionar 276 mg (0,98 mmol) d'1-iodoundecà (**36**) amb 203 mg (1,5 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anh, i 87 µL (0,98 mmol) de tioglicolat de metil en 4,5 mL de DMF seca. En aquestes condicions s'obtenen 216 mg (0,83 mmol) de **37** amb un rendiment del 85%.

*[13,13-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-tiatetradecanoat de metil (32)*

**IR (film)/v:** 2950, 2925, 2854, 1739, 1458, 1434, 1276, 1132, 1012, 721 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,19 (s, 2H, SCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me); 2,59 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>S); 1,56 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 1,23 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 171,0 (CO<sub>2</sub>); 52,3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 33,4; 32,7; 31,6; 29,58; 29,56; 29,4; 29,2; 29,1; 28,9; 28,7 (CH<sub>2</sub>); 21,6 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm. **EM m/z(% abundància):** 262(M<sup>+</sup>,8), 203(5), 189(75), 106(32), 98(32), 74(100), 69(38), 55(52).

*[10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-tiatetradecanoat de metil (33)*

**IR (film)/v:** 2954, 2923, 2854, 1741, 1460, 1436, 1278, 1134, 1012 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 3,71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,19 (s, 2H, SCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me); 2,59 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>S); 1,56 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 1,22 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,83 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 171,0 (CO<sub>2</sub>); 52,3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 33,4; 32,7; 31,8; 29,4; 29,3; 29,1; 28,9; 28,7; 28,5 (quin, *J*=19,0 Hz, CD<sub>2</sub>); 22,6 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>) ppm. **EM m/z (% abundància):** 262(M<sup>+</sup>12), 203(6), 189(100), 106(12), 98(10), 74(15).

*3-tiatetradecanoat de metil (37)*

**IR (film)/v:** 2954, 2927, 2856, 1737, 1465, 1436, 1278, 1134, 1014 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,20 (s, 2H, SCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me); 2,59 (t, *J*=7,5

Hz, 2H,  $CH_2S$ ); 1,56 (sc, 2H,  $CH_2CH_2S$ ); 1,23 (sa, 16H,  $8CH_2$ ); 0,85 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $CH_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}C$**  (75 MHz),  $\delta$ : 171,0 ( $CO_2$ ); 52,3 ( $CO_2CH_3$ ); 33,4; 32,7; 31,8; 29,55; 29,54; 29,4; 29,2; 29,1; 28,9; 28,7; 22,6 ( $CH_2$ ); 14,0 ( $CH_3$ ) ppm. **EM m/z (% abundància)**: 262( $M^+15$ ), 203(8), 189(100), 106(20), 98(10), 74(25).

6.1.3.1.4. *Síntesi dels àcids [13,13- $^2H_2$ ]-3-tiatetradecanoic (34), [10,10- $^2H_2$ ]-3-tiatetradecanoic (35) i 3-tiatetradecanoic (38)*

Seguint el mètode descrit per a l'obtenció de l'àcid **24**, 77 mg (0,39 mmol) de [13,13- $^2H_2$ ]-3-tiatetradecanoat de metil (**32**) es fan reaccionar amb 0,6 mL de solució 2,5 M de KOH en MeOH humit, tot aconseguint 55 mg (0,22 mmol) d'un sòlid blanc que correspon a l'àcid **34** desitjat amb un rendiment del 75%.

Anàlogament, 85 mg (0,32 mmol) de **33** es van saponificar amb 0,8 mL de solució 2,5 M de KOH en MeOH humit, tot obtenint 70 mg (0,28 mmol, 87%) d'un sòlid blanc que s'assignà a l'àcid **35** esperat.

Per tal d'assolir l'àcid **38**, 134 mg (0,51 mmol) de 3-tiatetradecanoat de metil (**37**) es fan reaccionar amb 1,2 mL de solució de KOH 2,5 M en MeOH humit. S'obtenen 112 mg (0,45 mmol, 89%) de l'àcid **38**.

*Àcid [13,13- $^2H_2$ ]-3-tiatetradecanoic (34)*

**IR (film)/v**: 2927, 2854, 1710, 1458, 1434, 1427, 1296, 908  $cm^{-1}$ . **RMN de  $^1H$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,27 (s, 2H,  $SCH_2CO_2H$ ); 2,65 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $CH_2S$ ); 1,61 (sc, 2H,  $CH_2CH_2S$ ); 1,26 (sa, 14H,  $7CH_2$ ); 0,86 (s, 3H,  $CH_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}C$**  (75 MHz),  $\delta$ : 176,8 ( $CO_2H$ ); 33,4; 32,7; 31,6; 29,58; 29,55; 29,4; 29,2; 29,1; 28,8; 28,7 ( $CH_2$ ); 21,8 (quin,  $J=19$  Hz,  $CD_2$ ); 13,8 ( $CH_3$ ) ppm. **P.f.**=61-63°C. **Anàlisi elemental**: Calculat per  $C_{13}H_{24}D_2O_2S$ , C: 62,86%; H+D: 10,54%; S: 12,90%. Trobat, C: 62,97%; H+D: 10,54%; S: 12,65%.

*Àcid [10,10- $^2H_2$ ]-3-tiatetradecanoic (35)*

**IR (film)/v**: 2954, 2923, 2850, 1708, 1683, 1458, 1425, 1271, 1145, 908  $cm^{-1}$ . **RMN de  $^1H$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,24 (s, 2H,  $SCH_2CO_2H$ ); 2,63 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $CH_2S$ ); 1,58 (sc, 2H,  $CH_2CH_2S$ ); 1,23 (sa, 14H,  $7CH_2$ ); 0,85 (t,  $J=6,5$  Hz, 3H,  $CH_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}C$**  (75 MHz),  $\delta$ : 176,9 ( $CO_2H$ ); 33,4; 32,7; 31,8; 29,39; 29,33; 29,1; 29,0; 28,8; 28,7; 28,6 (quin,  $J=19$  Hz,  $CD_2$ ); 22,6 ( $CH_2$ ); 21,8; 14,0 ( $CH_3$ ) ppm. **P.f.**=61-63°C. **Anàlisi elemental**: Calculat per  $C_{13}H_{24}D_2O_2S$ , C: 62,86%; H+D: 10,54%; S: 12,90%. Trobat, C: 63,36%; H+D: 10,93%; S: 12,55%.

### *Àcid 3-tiatetradecanoic (38)*

**IR (film)/v:** 2954, 2921, 2850, 1708, 1685, 1460, 1425, 1269, 1145, 908, 732  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 3,24 (s, 2H,  $\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ); 2,63 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 1,58 (sc, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ); 1,23 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ ); 0,85 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 174,3 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ); 33,4; 32,7; 31,8; 29,58; 29,57; 29,4; 29,3; 29,1; 28,8; 28,7; 22,6 ( $\text{CH}_2$ ); 14,1 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. **P.f.**=60-63°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{S}$ , C: 63,36%; H: 10,63%; S: 13,01%. Trobat, C: 63,45%; H: 10,44%; S: 12,87%.

#### **6.1.3.2. Síntesi de l'àcid 3-oxatetradecanoic (39)**

En un matràs d'una boca es disposen, sota atmosfera d'argó, 100 mg (0,58 mmol) d'1-undecanol i 1 mg (0,5% mol) de  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$  en 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . S'addicionen 150  $\mu\text{L}$  (1,45 mmol) de  $\text{N}_2\text{CHCO}_2\text{Et}$  dissolts en 0,7 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i es deixa en agitació durant 2 h a ta. Passat aquest temps, s'elimina el solvent i el cru de reacció es dissol en 4 mL d'una solució de KOH en MeOH (2,5 M) i es deixa en agitació a ta durant 16 h. S'elimina el solvent, s'addiciona HCl 1 M fins obtenir un pH àcid i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Un cop assecat amb  $\text{MgSO}_4$  i evaporat el solvent, el cru que en resulta es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice desactivat amb un 10% de  $\text{H}_2\text{O}$ , tot eluint amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (90:10). D'aquesta manera s'obtenen 121 mg (0,52 mmol) d'un sòlid blanc que s'assigna al 3-oxaàcid **39** amb rendiment del 90%.

**IR (film)/v:** 2925, 2854, 1716, 1458, 1138, 669  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 4,07 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ); 3,54 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 1,60 (sc, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 1,24 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ ); 0,85 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 189,6 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ); 72,1 ( $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ); 67,7 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 31,8; 29,58; 29,56; 29,52; 29,37; 29,35; 29,31; 25,8; 22,6 ( $\text{CH}_2$ ); 14,1 ( $\text{CH}_3$ ) ppm. **P.f.**=47-48°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_3$ , C: 67,78%; H: 11,37%. Trobat, C: 67,90%; H: 11,35%.

#### **6.1.4. Síntesi dels àcids (R)-[2,2,3,3,13- $^2\text{H}_5$ ]-tetradecanoic (55) i (S)-[2,2,3,3,13- $^2\text{H}_5$ ]-tetradecanoic (56)**

##### **6.1.4.1. Síntesi del 10-bromodecan-1-ol (40)**

Tot seguint la mateixa metòdica emprada en la síntesi del bromoalcohol **1**, 10 g (57,0 mmol) d'1,10-decandiòl en 140 mL de toluè es fan reaccionar amb 51 mL (456



mmol) de HBr (48% aq) durant 2 h 30 min a 135-140°C, tot obtenint, després de purificar, 12,5 g (52,7 mmol) de 10-bromodecan-1-ol (**40**) amb un rendiment del 93%.

**IR (film)/v:** 3344, 2928, 2853, 1586, 1055  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 3,61 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,38 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 1,27 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 63,0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 34,0; 32,79; 32,74; 29,4; 29,3; 28,7; 28,1; 25,6 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

#### 6.1.4.2. Síntesi del 11-dodecin-1-ol (**41**)

Anàlogament al procediment sintètic descrit per a la formació de l'alquí **18**, es condensen 300 mL d' $\text{NH}_3$  i es satura la solució d'acetilè sec durant 1 h. S'afegeixen 820 mg (118,0 mmol) de liti metàl·lic i un cop s'ha dissolt tot el metall s'addicionen 50 mL de DMSO anh tot permetent l'evaporació de l'amoniac. Finalitzat aquest pas, s'introdueixen 10 g (42,0 mmol) de 10-bromodecan-1-ol (**40**) dissolts en 5 mL de DMSO i es deixa en agitació a ta durant 1 h. S'obtenen, d'aquesta forma, 7,5 g (41,1 mmol, 97%) d'un oli groguenc que s'assignà a l'alcohol **41**.

**IR (film)/v:** 3311, 2927, 2854, 2114, 1461, 1058  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 3,61 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,84 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,27 (sa, 14H,  $7\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 84,7 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 68,0 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 63,0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 32,7; 29,5; 29,3; 29,0; 28,7; 28,4; 25,7; 18,3 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

#### 6.1.4.3. Síntesi del 11-dodecinal (**42**)

En un matràs de 3 boques flamejat al buit i sota atmosfera d'argó, es disposen 3,2 mL (36,7 mmol) de  $(\text{COCl})_2$  en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anh. Es refreda el sistema a  $-60^\circ\text{C}$  i s'addicionen 2,6 mL (36,7 mmol) de DMSO anh dissolts en 33 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec. Després de 10 min a aquesta temperatura, s'addicionen 4,46 g (24,4 mmol) de l'alcohol **41** en 23 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anh tot permetent la reacció a aquesta temperatura durant 45 min. Passat aquest temps, s'afegeixen 10 mL (73,4 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  seca i es deixa en agitació a ta durant 20 min. S'evapora el solvent, es digereix el cru en 50 mL de pentà, es filtra la sal de trietilamoni, i es renta amb pentà. El filtrat s'evapora al buit, i el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà: $\text{Et}_2\text{O}$  (94:6). S'obtenen, d'aquesta forma, 3,1 g (17,2 mmol) de l'aldehid esperat **42** amb un 71% de rendiment.

**IR (film)/v:** 3309, 2930, 2856, 2719, 1725, 1457  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 9,73 (t,  $J=2,0$  Hz, 1H, CHO); 2,39 (dt,  $J_1=2,0$  Hz,  $J_2=7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CHO}$ ); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,59 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ); 1,47 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,27 (sa, 10H, 5 $\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 202,9 (CHO); 84,7 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 68,0 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 43,8 ( $\text{CH}_2\text{CHO}$ ); 29,24; 29,22; 29,0; 28,9; 28,6; 28,4; 22,0; 18,3 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

#### 6.1.4.4. Síntesi del 12-tridecin-2-ol (43)

En un matràs de 3 boques es disposen, sota atmosfera d'argó, 2,54 g (14,0 mmol) d'11-dodecin-1-al (42) en 5,6 mL de THF anh. La solució es refreda a  $-50^\circ\text{C}$  i s'addicionen lentament 5,6 mL (17,0 mmol) de solució de  $\text{CH}_3\text{MgBr}$  (3 M en  $\text{Et}_2\text{O}$ ). Després de 10 min a aquesta temperatura, s'escalfa a  $0^\circ\text{C}$  i s'addiciona lentament HCl 1 M fins a obtenir una solució transparent. S'evapora el THF i s'extreu amb AcOEt. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl. Un cop assecat i evaporat el solvent, el cru que en resulta es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (80:20). En aquestes condicions s'obtenen 2,06 g (10,5 mmol) de l'alcohol 43 amb un 75% de rendiment.

**IR (film)/v:** 3388, 3315, 2929, 2902, 2860, 1466, 1378, 1133  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,75 (sc, 1H, CHO); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,49 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,26 (sa, 14H, 7 $\text{CH}_2$ ); 1,15 (d,  $J=6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 84,7 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 68,1 (CHO); 68,0 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 39,3; 29,5; 29,3; 29,0; 28,7; 28,4; 25,7; 18,3 ( $\text{CH}_2$ ); 23,4 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

#### 6.1.4.5. Resolució enzimàtica del 12-tridecin-2-ol (43)

##### 6.1.4.5.1. Formació dels èsters de Mosher.

En un matràs d'una boca, flamejat al buit i sota atmosfera d'argó, es disposen 8 mg (0,03 mmol) de l'àcid (S)-(-)-metoxitri fluorometilacètic ((S)-(-)-MTPA) en 1 mL d'hexà i 8  $\mu\text{L}$  de DMF secs. S'addicionen 16  $\mu\text{L}$  (0,18 mmol) de  $(\text{COCl})_2$  i es deixa en agitació a ta durant 2 h. Passat aquest temps es filtra el precipitat obtingut a través d'una cànula, i s'evapora el filtrat que conté el clorur d'àcid derivat del (S)-(-)-MTPA. Aquest es dissol en 350  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec i s'addiciona sobre un matràs que conté 5 mg (0,025

mmol) de l'alcohol **43**, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Et}_3\text{N}$  seca i un cristall de DMAP. Després de 2 h de reacció a ta, s'evapora el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , s'afegeix  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CFCl}_3$  (5% en  $\text{CDCl}_3$ ) i es mesura l'espectre de ressonància magnètica nuclear de  $^{19}\text{F}$ .

**RMN de  $^{19}\text{F}$**  (282 MHz),  $\delta$ : -71,945 (enantiòmer *S*); -71,989 (enantiòmer *R*) ppm.

#### 6.1.4.5.2. Adsorció d'enzims sobre suports

##### (1) Immobilització sobre Celite<sup>®</sup>:

Es barregen 100 mg de la preparació de lipasa escollida i 1 g de Celite<sup>®</sup> en 1 mL de solució de tampó fosfat 50 mM (pH=7).

S'agita enèrgicament durant 15 min i es liofilitza, obtenint una pols blanca.

##### (2) Immobilització sobre suports hidrofòbics (EP100 i SDVB):

Es barreja 1 g d'EP100 o SDVB amb 3 mL d'EtOH (97%) i s'agita al vòrtex. A la vegada, es suspèn 1 g de lipasa en 20 mL de solució de tampó fosfat 50 mM (pH=7).

S'afegeix la preparació de lipasa sobre la de suport i s'agita a 140 rpm durant 24 h. Un cop agitat, es filtra i es liofilitza.

#### 6.1.4.5.3. Resolució enzimàtica

En un matràs d'Erlenmeyer de 100 mL es dipositen 990 mg (5,0 mmol) del 12-tridecin-2-ol (**43**) racèmic dissolts en 50 mL de  $^1\text{Pr}_2\text{O}$  (100 mM). S'addicionen 700  $\mu\text{L}$  (7,5 mmol) d'acetat de vinil i 2 g de PPL suportada en EP100. Es deixa en agitació mecànica a 25°C durant 26 h. Es filtra el cru mitjançant una placa del n<sup>o</sup>4 rentant amb  $\text{Et}_2\text{O}$ , s'evapora el solvent i es separa l'acetat format (**46**) de l'alcohol (**45**) per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (94:6 per l'acetat i 80:20 per l'alcohol). S'obtenen 486 mg (2,0 mmol) d'acetat enriquit **46** i 385 mg (1,9 mmol) de l'alcohol enriquit **45**.

##### (*S*)-(+)-12-tridecin-2-ol (**45**):

**RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,76 (sc, 1H,  $\text{CHOH}$ ); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,26 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ ); 1,15 (d,  $J=6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{19}\text{F}$**  (282 MHz),  $\delta$ : -71,945 ppm (>95% d'enantiòmer *S*).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}=+4$  (c=5,  $\text{CHCl}_3$ ); ee>95%.

##### (*R*)-(-)-Acetat de 12-tridecin-2-il (**46**):

**IR (film)/v**: 3301, 2978, 2931, 2857, 1737, 1369, 1244  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 4,85 (tq,  $J_1=6,5$  Hz,  $J_2=6,5$  Hz, 1H,  $\text{CHOAc}$ ); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,99 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,24 (sa, 16H,

8CH<sub>2</sub>); 1,16 (d,  $J=6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 170,7 (COCH<sub>3</sub>); 84,7 (CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH); 71,0 (CHOCO); 68,0 (CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH); 35,8; 29,4; 29,38; 29,36; 29,0; 28,6; 28,4; 25,3; 18,3 (CH<sub>2</sub>); 21,3 (CH<sub>3</sub>); 19,9 (COCH<sub>3</sub>) ppm.  $[\alpha]_D^{20}=-1$  (c=5, CHCl<sub>3</sub>); ee=84%. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>, C: 75,58%; H: 10,99%. Trobat, C: 75,70%; H: 11,06%.

#### 6.1.4.5.4. *Obtenció del (R)-(-)-12-tridecin-2-ol (44)*

En un matràs d'una boca s'introdueixen 486 mg (2,0 mmol) de l'acetat **46** dissolt en 9 mL de MeOH. S'afegeixen 1,1 g (8,1 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i es deixa el sistema en agitació a ta durant 3 h. Passat aquest temps, es refreda a 0°C, i s'addiciona HCl 1 M fins a obtenir una solució transparent. S'evapora el MeOH a pressió reduïda, i la fase aquosa s'extreu amb AcOEt. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i un cop filtrat i evaporat el solvent, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (80:20). S'assoleixen, d'aquesta forma, 377 mg (1,9 mmol) de l'alcohol **44** desitjat amb un rendiment del 95%.

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 3,77 (sc, 1H, CHOH); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H, C $\equiv$ CH); 1,49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH); 1,26 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 1,16 (d,  $J=6,5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>19</sup>F** (282 MHz),  $\delta$ : -71,945 (8% d'enantiòmer S); -71,989 (92% enantiòmer R) ppm.  $[\alpha]_D^{20}=-5$  (c=5, CHCl<sub>3</sub>); ee=84%.

#### 6.1.4.6. *Síntesi del (S)-(+)-metansulfonat de 12-tridecin-2-il (48) i del (R)-(-)-metansulfonat de 12-tridecin-2-il (47)*

En un matràs d'una boca flamejat al buit s'introdueixen, sota atmosfera d'argó, 18 mg (0,2 mmol) de (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N·HCl. S'addicionen 380 mg (2,0 mmol) de (S)-(+)-12-tridecin-2-ol (**45**), 540  $\mu$ L (3,9 mmol) de Et<sub>3</sub>N seca en 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anh. Es refreda el sistema a 0°C i s'addicionen 225  $\mu$ L (2,9 mmol) de MsCl dissolts en 0,7 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Després d'1 h de reacció a 0°C, s'afegeix H<sub>2</sub>O i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les fases orgàniques reunides es renten amb HCl 1 M, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i un cop filtrat i evaporat el solvent, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (80:20). S'obtenen 437 mg (1,6 mmol) del mesilat **48** amb un rendiment del 82%.

Tot seguint la mateixa metòdica, 371 mg (1,9 mmol) de (*R*)-(-)-12-tridecin-2-ol (**44**), 18 mg (0,2 mmol) de Me<sub>3</sub>N·HCl, 525 µL (3,8 mmol) de Et<sub>3</sub>N en 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, es fan reaccionar amb 220 µL (2,8 mmol) de MsCl en 0,7 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'assoleixen, després de purificar, 418 mg (1,5 mmol) del mesilat **47** amb un rendiment del 81%.

*(S)*-(+)-Metansulfonat de 12-tridecin-2-il (**48**)

**IR (film)/v:** 3291, 2931, 2856, 1464, 1352, 1176, 971, 915 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 4,76 (tq, *J*<sub>1</sub>=6,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=6,5 Hz, 1H, CHOMs); 2,96 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,15 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,91 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,38 (d, *J*=6,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 80,4 (CHOMs); 68,0 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 38,6 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 36,6; 29,3; 29,1; 28,9; 28,6; 28,4; 25,1; 18,3 (CH<sub>2</sub>); 21,3 (CH<sub>3</sub>); ppm. [**α**]<sub>D</sub><sup>20</sup>=+6 (c=5, CHCl<sub>3</sub>).

*(R)*-(-)-Metansulfonat de 12-tridecin-2-il (**47**)

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 4,76 (tq, *J*<sub>1</sub>=6,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=6,5 Hz, 1H, CHOMs); 2,96 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,15 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,91 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,38 (d, *J*=6,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. [**α**]<sub>D</sub><sup>20</sup>=-6 (c=5, CHCl<sub>3</sub>).

**6.1.4.7. Síntesi del (*R*)-[12-<sup>2</sup>H]-1-tridecí (**49**) i del (*S*)-[12-<sup>2</sup>H]-1-tridecí (**50**)**

Anàlogament al procediment descrit per a l'obtenció de **14**, 188 mg (4,5 mmol) de LiAlD<sub>4</sub> (98% D) dissolts en 5 mL de Et<sub>2</sub>O anh es fan reaccionar amb 412 mg (1,5 mmol) de (*S*)-(+)-metansulfonat de 12-tridecin-2-il (**48**) dissolts en 1,5 mL d'Et<sub>2</sub>O. S'obtenen, d'aquesta forma, 211 mg (1,2 mmol) d'alquí **49** amb un rendiment del 78%.

De la mateixa forma, 418 mg (1,5 mmol) de (*R*)-(-)-metansulfonat de 12-tridecin-2-il (**47**), es fan reaccionar, en el si de 6,5 mL d' Et<sub>2</sub>O anh amb 191 mg (4,5 mmol) de LiAlD<sub>4</sub>. S'obtenen, després de purificar, 193 mg (1,1 mmol, 70%) de l'alquí **50** esperat.

*(R)*-[12-<sup>2</sup>H]-1-tridecí (**49**)

**IR (film)/v:** 3315, 2926, 2854, 1458, 1238 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,16 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,91 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,23 (sa, 17H, 8CH<sub>2</sub> i CHD); 0,84 (d, *J*=5,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 67,9 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 31,8; 29,6; 29,5; 29,3; 29,1; 28,7; 28,4; 25,1; 22,28 (t, *J*=19,0 Hz, CHD); 18,3 (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>); ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>D, C: 86,11%; H+D: 13,34%. Trobat, C: 85,39%; H+D: 13,54%.

*(S)*-[12-<sup>2</sup>H]-1-tridecí (**50**)

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 2,16 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $CH_2C\equiv CH$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $C\equiv CH$ ); 1,23 (sa, 17H, 8 $CH_2$  i  $CHD$ ); 0,84 (d,  $J=5,5$  Hz, 3H,  $CH_3$ ) ppm.

**6.1.4.8. Síntesi del (*S*)-[13-<sup>2</sup>H]-2-tetradecinoat de metil (**52**) i del (*R*)-[13-<sup>2</sup>H]-2-tetradecinoat de metil (**51**)**

Anàlogament al procediment seguit per sintetitzar els èsters **20**, **21** i **26**, 187 mg (1,0 mmol) de (*S*)-[12-<sup>2</sup>H]-1-tridecí (**50**) dissolts en 1,3 mL de THF anh es fan reaccionar amb 765  $\mu$ L (1,1 mmol) de *n*-BuLi (1,42 M en hexà) i 80  $\mu$ L (1,0 mmol) de  $ClCO_2Me$ , tot fornint 206 mg (0,86 mmol) de l'èster **52** desitjat amb un rendiment del 83%.

De la mateixa forma, 204 mg (1,1 mmol) de (*R*)-[12-<sup>2</sup>H]-1-tridecí (**49**) es fan reaccionar, amb 835  $\mu$ L (1,2 mmol) de *n*-BuLi (1,42 M en hexà) i 87  $\mu$ L (1,1 mmol) de  $ClCO_2Me$  en 1,4 mL de THF anh. Un cop purificat, s'obtenen 188 mg (0,78 mmol, 70%) de l'èster acetilènic esperat **51**.

*(S)*-[13-<sup>2</sup>H]-2-tetradecinoat de metil (**52**)

**IR (film)/v**: 2924, 2855, 2238, 1722, 1254, 1077  $cm^{-1}$ . **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 3,73 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ); 2,29 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $CH_2C\equiv C$ ); 1,54 (m, 2H,  $CH_2CH_2C\equiv C$ ); 1,22 (sa, 15H, 7 $CH_2$  i  $CHD$ ); 0,84 (d,  $J=6,0$  Hz, 3H,  $CH_3$ ) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 154,28 ( $CO_2$ ); 89,9 ( $CH_2C\equiv CCO_2$ ); 72,7 ( $CH_2C\equiv CCO_2$ ); 52,5 ( $CO_2CH_3$ ); 31,7; 29,5; 29,3; 29,2; 28,9; 28,7; 27,4; 22,2 (t,  $J=19,0$  Hz,  $CHD$ ); 18,6 ( $CH_2$ ); 13,9 ( $CH_3$ ) ppm. **Anàlisi elemental**: Calculat per  $C_{15}H_{25}DO_2$ , C: 75,26%; H+D: 10,94%. Trobat, C: 74,80%; H+D: 11,06%.

*(R)*-[13-<sup>2</sup>H]-2-tetradecinoat de metil (**51**)

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 3,73 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ); 2,30 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $CH_2C\equiv C$ ); 1,54 (m, 2H,  $CH_2CH_2C\equiv C$ ); 1,23 (sa, 15H, 7 $CH_2$  i  $CHD$ ); 0,84 (d,  $J=6,0$  Hz, 3H,  $CH_3$ ) ppm.

**6.1.4.9. Síntesi del (*S*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**54**) i del (*R*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**53**)**

De forma similar al procediment seguit per a l'obtenció de **22**, 197 mg (0,82 mmol) de (*S*)-[13-<sup>2</sup>H]-2-tetradecinoat de metil (**52**) dissolts en 6,1 mL de  $CD_3OD$  es fan

reaccionar amb 100 mg (4,1 mmol) de magnesi. Un cop purificat s'aconsegueixen 139 mg (0,55 mmol) de l'èster deuterat **54** amb un rendiment del 67%.

Anàlogament, 185 mg (0,77 mmol) de (*R*)-[13-<sup>2</sup>H]-tetradecinoat de metil (**51**) es fan reaccionar, en el si de 5,8 mL de CD<sub>3</sub>OD, amb 94 mg (3,9 mmol) de Mg tot assolint 109 mg (0,44 mmol) d'èster **53** esperat amb un rendiment del 56%.

*(S)*-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**54**)

**IR (film)/ν**: 2924, 2854, 1739; 1456, 1283, 1089 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 1,23 (sa, 19H, 9CH<sub>2</sub> i CHD); 0,84 (t, *J*=5,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

*(R)*-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**53**)

**RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 1,23 (sa, 19H, 9CH<sub>2</sub> i CHD); 0,84 (t, *J*=5,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

#### 6.1.4.10. Síntesi dels àcids (*S*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoic (**56**) i (*R*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoic (**55**)

Tal com es va explicar per tal d'obtenir l'àcid deuterat **24**, 100 mg (0,40 mmol) de (*S*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**54**) es fan reaccionar amb 0,85 mL d'una solució de KOH 2,5 M en CD<sub>3</sub>OD amb unes gotes de D<sub>2</sub>O durant 16 h. S'obtenen 79,2 mg (0,34 mmol) d'un sòlid blanc que correspon a l'àcid **56** amb un 84% de rendiment.

Igualment, 108 mg (0,43 mmol) de (*R*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoat de [1,1,1-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-metil (**53**) es fan reaccionar amb 0,90 mL d'una solució de KOH 2,5 M en CD<sub>3</sub>OD humit amb D<sub>2</sub>O. Després de la purificació, s'obtenen 88,1 mg (0,38 mmol) de l'àcid **55** amb un 87% de rendiment.

Àcid (*S*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoic (**56**)

**IR (film)/ν**: 2952, 2917, 2850, 1696, 1310, 952 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 1,23 (sa, 19H, 9CH<sub>2</sub> i CHD); 0,85 (d, *J*=5,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 180,5 (COOH); 33,35 (quin, *J*=20,0 Hz, CD<sub>2</sub>COOH); 31,8; 29,66; 29,63; 29,5; 29,4; 29,3; 29,1; 28,7 (CH<sub>2</sub>); 23,8 (quin, *J*=21,0 Hz, CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>COOH); 22,2 (t, *J*=19,0 Hz, CH<sub>3</sub>CDH); 13,9 (CH<sub>3</sub>) ppm. **P.f.**=51-53°C. **Anàlisi elemental**: Calculat per C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>D<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, C: 72,06%; H+D: 12,09%. Trobat, C: 72,40%; H+D: 12,48%.

Àcid (*R*)-[2,2,3,3,13-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-tetradecanoic (**55**)

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 1,23 (sa, 19H, 9CH<sub>2</sub> i CHD); 0,85 (d, *J*=5,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

## 6.1.5. Síntesi dels àcids ciclopropènics 76, 77 i 78

### 6.1.5.1. Síntesi del 9-bromononan-1-ol (58)

Es segueix el mateix procediment emprat en la síntesi del 8-bromooctan-1-ol (**1**); així, 9,7 g (60,6 mmol) d'1,9-nonandiol en 145 mL de toluè, es fan reaccionar a temperatura de reflux amb 56 mL (485 mmol) de HBr (48% aq) durant 2 h 30 min. Passat aquest temps, es duu a terme el tractament de la reacció i la purificació del cru obtingut, tot rendint 12 g (53,8 mmol) de 9-bromo-1-nonanol (**58**) que suposa un 89% de rendiment.

**IR (film)/v:** 3327, 2929, 2853, 1465, 1055  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 3,61 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,38 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 1,28 (sa, 14H,  $7\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 62,9 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 34,0 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 32,77; 32,72; 29,3; 29,2; 28,6; 28,1; 25,6 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

### 6.1.5.2. Síntesi dels derivats 2-(9-bromononiloxi)tetrahidropirà (64), 2-(10-bromodeciloxi-tetrahidropirà (65) i 2-(11-bromoundeciloxi)tetrahidropirà (66)

En un matràs d'una boca de 50 mL, s'introdueixen 5 g (22,4 mmol) de 9-bromononan-1-ol (**58**), i 30 mg de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, dissolts en 22 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Es refreda a 0°C i s'addicionen 3 mL (33,6 mmol) de DHP. Es deixa a aquesta temperatura durant 2 h 30 min i s'afegeixen 10 mL de solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl fins pH neutre. S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> anh i un cop filtrat i evaporat el solvent, s'obté un cru que es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (96:4). Finalment s'aconsegueixen 6,6 g (21,5 mmol) del derivat tetrahidropiranílic (**64**) amb un rendiment del 95%.

Paral·lelament, 2,9 g (12,2 mmol) de 10-bromodecan-1-ol **40**, 20 mg de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, en 3 mL (30,6 mmol) de DHP, es deixen reaccionar durant 16 h, tot obtenint, després de purificar el cru per destil·lació en un forn de boles rotatòries ( $T_d=200^\circ\text{C}/0,05$  mmHg) 3,7g (11,5 mmol, 95%) de l'alcohol protegit **65**.

Per tal d'obtenir el derivat **66**, 5 g (19,9 mmol) d'11-bromoundecan-1-ol dissolts en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, es fan reaccionar, a 0°C, amb 2,7 mL (29,9 mmol) de DHP, tot afegint 30 mg de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O. S'obtenen 6,3 g (18,8 mmol) d'alcohol protegit **66** amb un rendiment del 95%.



*2-(9-bromononiloxi)tetrahidropirà (64)*

**IR (film)/v:** 2931, 2857, 1459, 1127, 1074, 1030  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 4,54 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H,  $\text{C1}'\text{H}$ ); 3,5-3,8 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{C5}'\text{H}$ ); 3,38 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 1,5-1,8 (sc, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{C2}'\text{H}$ ,  $\text{C3}'\text{H}$  i  $\text{C4}'\text{H}$ ); 1,28 (sa, 12H,  $6\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 98,8 ( $\text{C1}'$ ); 67,6 ( $\text{C5}'$ ); 62,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 34,0; 32,7; 30,7; 29,7; 29,3; 28,6; 28,1; 26,1; 25,4; 19,6 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C2}'$ ,  $\text{C3}'$  i  $\text{C4}'$ ) ppm.

*2-(10-bromodeciloxi)tetrahidropirà (65)*

**IR (film)/v:** 2932, 2854, 1459, 1112, 1074, 1030  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 4,54 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H,  $\text{C1}'\text{H}$ ); 3,3-3,7 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{C5}'\text{H}$ ); 3,38 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 1,5-1,8 (sc, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{C2}'\text{H}$ ,  $\text{C3}'\text{H}$  i  $\text{C4}'\text{H}$ ); 1,26 (sa, 14H,  $7\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 98,8 ( $\text{C1}'$ ); 67,6 ( $\text{C5}'$ ); 62,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 34,0; 33,5; 30,7; 30,4; 29,7; 29,4; 29,39; 29,33; 28,4; 26,1; 25,4; 19,6 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C2}'$ ,  $\text{C3}'$  i  $\text{C4}'$ ) ppm.

*2-(11-bromoundeciloxi)tetrahidropirà (66)*

**IR (film)/v:** 2929, 2855, 1460, 1356, 1126, 1074, 1030, 869  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H,  $\text{C1}'\text{H}$ ); 3,3-3,8 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{C5}'\text{H}$ ); 3,38 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 1,5-1,8 (sc, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{C2}'\text{H}$ ,  $\text{C3}'\text{H}$  i  $\text{C4}'\text{H}$ ); 1,25 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 98,8 ( $\text{C1}'$ ); 67,6 ( $\text{C5}'$ ); 62,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 34,0; 32,8; 30,7; 29,7; 29,5; 29,4; 29,3; 28,7; 28,1; 26,2; 25,4; 19,6 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C2}'$ ,  $\text{C3}'$  i  $\text{C4}'$ ) ppm.

**6.1.5.3. Intent de formació dels àcids 76, 77 i 78 a través de trihalociclopropans de cadena llarga****6.1.5.3.1. A partir de derivats tetrahidropiranílics****6.1.5.3.1.1. Síntesi del 2-(10-undeciniloxi)tetrahidropirà (84), 2-(11-dodeciniloxi)tetrahidropirà (85) i 12-(trideciniloxi)tetrahidropirà (86)**

Tot seguint el procediment sintètic descrit per a la formació de l'alquí **18**, es condensen 200 mL d' $\text{NH}_3$  i es satura la solució d'acetilè sec durant 1 h. S'afegeixen 203 mg (29,3 mmol) de liti metàl·lic i un cop s'ha dissolt tot el metall s'addicionen 20 mL de DMSO anh tot permetent l'evaporació de l'amoniac. Finalitzat aquest pas, s'introdueixen 5 g (16,3 mmol) del derivat **64** dissolts en 2,1 mL de DMSO i es deixa en agitació a ta durant 1 h. S'obtenen, d'aquesta forma, 3,8 g (15 mmol) de l'alquí **84** amb un rendiment del 92%.

Pel que fa a l'obtenció de **85**, 195 mg (28,0 mmol) de liti i 20 mL de DMSO anh s'afegeixen sobre 200 mL d'amoniac saturat d'acetilè. Un cop eliminat el NH<sub>3</sub>, s'addicionen 5 g (15,6 mmol) del derivat **65** en 2,0 mL de DMSO sec. Un cop tractada la reacció i purificat el cru, s'aconsegueixen 3,93 g (14,8 mmol) del derivat **85** amb un rendiment del 95%.

Anàlogament, 187 mg (26,9 mmol) de liti i 20 mL de DMSO anh en 200 mL de NH<sub>3</sub> líquid saturat d'acetilè, es fan reaccionar amb 5 g (14,9 mmol) de **66** dissolts en 2,0 mL de DMSO, tot fornint 3,8 g (13,5 mmol) de **86**, amb un rendiment del 91%.

*2-(10-undeciniloxi)tetrahidropirà (84)*

**IR (film)/v**: 3315, 2929, 2855, 1460, 1356, 1074, 1030, 869 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,15 (dt,  $J_1=7,0$  Hz,  $J_2=2,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H, C≡CH); 1,5-1,8 (sc, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,25 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ**: 98,8 (C1'); 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 68,0 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 29,7; 29,53; 29,50; 29,4; 29,0; 28,7; 28,4; 26,2; 25,4; 19,6; 18,3 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4') ppm.

*2-(11-dodeciniloxi)tetrahidropirà (85)*

**IR (film)/v**: 3316, 2931, 2855, 1457, 1356, 1074, 1035, 870 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,15 (dt,  $J_1=7,0$  Hz,  $J_2=2,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H, C≡CH); 1,5-1,8 (sc, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,25 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ**: 98,8 (C1'); 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 68,0 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 30,4; 29,7; 29,53; 29,50; 29,4; 29,0; 28,7; 28,4; 26,2; 25,4; 19,6; 18,3 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4') ppm.

*2-(12-trideciniloxi)tetrahidropirà (86)*

**IR (film)/v**: 3320, 2931, 2860, 1459, 1356, 1074, 1035, 870 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,15 (dt,  $J_1=7,0$  Hz,  $J_2=2,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H, C≡CH); 1,5-1,8 (sc, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ**: 98,9 (C1'); 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 68,0 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 30,4; 29,7; 29,53; 29,50; 29,4; 29,0; 28,7; 28,4; 26,2; 25,4; 19,6; 18,3 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4') ppm.

#### 6.1.5.3.1.2. Intent de iodació del triple enllaç

En un matràs de 10 mL es disposen 357 mg (2,38 mmol) de NaI en 4 mL de CH<sub>3</sub>CN. Tot seguit s'addicionen 300 µL de (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl i 21 µL de H<sub>2</sub>O. Es deixa en agitació a ta protegit de la llum durant 10 min. S'afegeixen 500 mg (1,98 mmol) de derivat **84** i es deixa en agitació a ta durant 1 h. Es para la reacció afegint aigua i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució de NaHSO<sub>3</sub> (50% p/v), NaCl i el cru, un cop evaporat el solvent, es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt. S'obtenen 163 mg (0,97 mmol, 50%) del corresponent alquí desprotegit **100** acompanyat de 207 mg (0,82 mmol, 41% de producte de partida).

**RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 3,61 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,15 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,91 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,27 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm.

#### 6.1.5.3.2. Intent de formació a partir de derivats silílics

##### 6.1.5.3.2.1. Síntesi del tert-butildifenil-10-undeciniloxisilà (**87**)

Es prenen 500 mg (1,98 mmol) del derivat **84** i es dissolen en 10 mL de MeOH, tot afegint 10 mg d'àcid *p*-toluensulfònic. Després de 16 h en agitació a ta i tractament de la reacció, l'alcohol obtingut es fa reaccionar amb 670 µL de clorur de tert-butildifenilsilil (2,6 mmol), 350 mg (5,1 mmol) d'imidazole en 10 mL de DMF seca. Després de 16 h a ta, s'afegeix força aigua i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl i el cru que s'obté després d'eliminar el solvent es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (97:3); s'obtenen 691 mg (1,7 mmol) de derivat sililat **87**, amb un rendiment del 85%.

##### 6.1.5.3.2.2. Intent de iodació del triple enllaç

Aquest alquí protegit en forma d'èter silílic (**87**) és sotmès a les mateixes condicions de formació del iodur vinílic descrites a l'apartat 6.1.5.3.1.2. Així, 177 mg (0,43 mmol) d'alquí sililat **87** es fan reaccionar amb 78 mg (0,52 mmol) de NaI, 66 µL de TMSCl en el si d'1 mL d'acetonitril i 5 µL de H<sub>2</sub>O. Després d'1 h a ta, tractament de la reacció i purificació per columna de gel de sílice, s'obtenen 24 mg (0,12 mmol, 28%) de l'alquí desprotegit **100**, acompanyat de traces no separables de iodur vinílic.

### 6.1.5.3.3. *Intent de formació a partir de derivats amb un grup nitril*

#### 6.1.5.3.3.1. *Intent de formació del 10-iodo-10-undecenitril (91)*

##### 6.1.5.3.3.1.1. Síntesi de l'11-hidroxiundecanitril (88)

En un matràs de 50 mL, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, es disposen 480 mg (9,7 mmol) de NaCN (assecat a 100°C/1 mmHg durant 8 h) dissolts en 13 mL de HMPA seca. S'addicionen 1,5 g (6,5 mmol) de 10-bromodecanol (40) i es deixa en agitació a ta durant 1 h. Passat aquest temps s'afegeix H<sub>2</sub>O i s'extreu amb AcOEt. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl i un cop assecat i eliminat el solvent, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (70:30) i fornint 1,00 g (5,4 mmol, 84%) de l'hidroxinitril 88 esperat.

**IR (film)/v:** 3402, 2929, 2858, 2245, 1465, 1427, 1056 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,61 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,31 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 1,31 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 119,8 (CN); 62,9 (CH<sub>2</sub>OH); 32,6; 29,3; 29,2; 28,6; 28,5; 25,6; 25,3; 17,0 (CH<sub>2</sub>) ppm.

##### 6.1.5.3.3.1.2. Síntesi de l'11-iodoundecanitril (89)

Anàlogament a la síntesi del compost iodat 30, 1 g (5,4 mmol) d'11-hidroxidecanitril (88) en 30 mL d'Et<sub>2</sub>O i 18 mL de CH<sub>3</sub>CN es fan reaccionar, a 0°C amb 4,3 g (16,4 mmol) de PPh<sub>3</sub>, 1,1 g (16,4 mmol) d'imidazole i 4,1 g (16,4 mmol) de I<sub>2</sub>. Després d'1 h en agitació a 0°C, es realitza el tractament de la reacció obtenint un cru que es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (96:4). S'obtenen 1,37 g (4,67 mmol) del iodur 89 esperat amb un 85% de rendiment.

**IR (film)/v:** 2929, 2858, 2245, 1463, 1425, 1184, 719 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,16 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 2,32 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 1,32 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 119,7 (CN); 33,3; 30,2; 29,2; 29,1; 28,6; 28,5; 28,4; 25,2; 17,1 (CH<sub>2</sub>); 7,1 (CH<sub>2</sub>I) ppm.

##### 6.1.5.3.3.1.3. Intent de formació del 12-tridecinitril (90)

El producte amb el grup alquí terminal present no es va poder obtenir per cap dels dos mètodes emprats. Ni realitzant la reacció amb el complex acetilur-etilendiamina, ni emprant acetilè gas en presència de Li metàl·lic en NH<sub>3</sub> líquid. En tots dos casos, el

grup iode desapareix, però no s'observa la presència dels protons alquínic per RMN d'hidrogen.

#### 6.1.5.3.3.1.4. Síntesi del 12-tridecinitril (**90**) a partir de l'11-dodecin-1-ol (**41**)

En un matràs de 50 mL, es disposen 2,88 g (15,8 mmol) d'11-dodecin-1-ol (**41**) en 16 mL de THF sec i s'afegeixen, a 0°C i sota atmosfera d'argó, 3 mL (22,1 mmol) d'anhídrid trifluoroacètic (acabat de destil·lar sobre NaHCO<sub>3</sub>). Es deixa en agitació a temperatura ambient durant 20 min, s'evapora el THF i l'excés de reactiu, es torna a dissoldre el cru en 15 mL de THF anh i 15 mL de HMPA anh, s'addicionen 3,8 g (78,9 mmol) de NaCN sec, es connecta un refrigerant de tipus Dimroth i s'escalfa la reacció a reflux de THF durant 16 h. Passat aquest temps, es refreda, s'elimina el THF, s'addiciona H<sub>2</sub>O, i s'extreu amb hexà. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, i un cop assecat i evaporat el solvent, el cru resultant és purificat per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (85:15) per acabar tenint 2,27 g (11,8 mmol, 75%) del nitril **90** desitjat.

**IR (film)/v:** 3305, 2931, 2856, 2246, 2117, 1465, 1427 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,31 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 2,15 (dt, *J*<sub>1</sub>=2,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH); 1,91 (t, *J*=2,5 Hz, 1H, C≡CH); 1,26 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 119,8 (CN); 84,7 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 68,0 (CH<sub>2</sub>C≡CH); 29,2; 29,1; 28,9; 28,69; 28,64; 28,60; 28,4; 25,3; 18,3; 17,0 (CH<sub>2</sub>) ppm.

#### 6.1.5.3.3.1.5. Formació del 12-iodo-12-tridecinitril (**91**)

Tal com s'ha exposat a la part teòrica i seguint la metodologia explicada a l'apartat 6.1.5.3.1.2, es fan reaccionar 200 mg (1,04 mmol) de 12-tridecinitril (**90**) amb 317 μL (2,5 mmol) de TMSCl, 375 mg (2,5 mmol) de NaI i 22 μL de H<sub>2</sub>O en el si de 2 mL de CH<sub>3</sub>CN tot obtenint, com a màxim, un 62% del producte final impur (atac Markovnikov, *anti*-Markovnikov).

**IR (film)/v:** 2931, 2856, 2246, 2117, 1465, 1427 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 5,98 (dt, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=1,5 Hz, 1H, HCH=CI); 5,65 (dt, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=1,5 Hz, 1H, HCH=CI); 2,31 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 1,96 (m, 2H, H<sub>2</sub>C=CICH<sub>2</sub>); 1,26 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 125,1 (CH<sub>2</sub>=CI); 119,8 (CN); 112,8 (CH<sub>2</sub>C=CI); 45,2 (CH<sub>2</sub>=CICH<sub>2</sub>); 29,31; 29,2; 28,9; 28,69; 28,61; 28,05; 25,32; 17,1 (CH<sub>2</sub>) ppm.

#### 6.1.5.3.4. Síntesi de l'11-(2,2-dibromo-1-iodociclopropil)undecanitril (**92**)

En un vial de 3 mL es disposen 206 mg (0,64 mmol) de l'alquè **91**, 21 mg (0,05 mmol) de bromur d'hexadecil trimetilamoni (cetrimida) i 112  $\mu$ L (1,28 mmol) de  $\text{CHBr}_3$ . Seguidament es refreda a  $0^\circ\text{C}$  i s'afegeixen 500  $\mu$ L d'una solució aquosa de NaOH al 50% (p/v). S'escalfa a ta i es deixa en agitació durant 60 h. Transcorregut aquest temps, s'afegeix  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i solució saturada de NaCl i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tot rentant amb  $\text{H}_2\text{O}$ . Les fases orgàniques reunides s'assequen amb  $\text{MgSO}_4$ , i un cop filtrat i evaporat, el cru es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (80:20). En aquestes condicions s'aconsegueixen 182 mg (0,37 mmol) del trihalociclopropà **92** amb un rendiment del 57%.

**IR (film)/v**: 2961, 2931, 2873, 2246, 2117, 1470, 1435  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 2,32 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ); 1,78 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ cicle); 1,66 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ); 1,63 (sc, 2H, C3H); 1,26 (sa, 14H, 7 $\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 117,2 (CN); 47,1 (C1); 43,9 (C2); 33,7 (C3); 39,2; 30,3; 29,3; 29,2; 28,9; 28,7; 28,6; 28,0; 25,3; 18,3 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.

#### 6.1.5.3.5. Intent de formació del derivat ciclopropènic amb un grup nitril

En un matràs de 5 mL, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, es disposen 182 mg (0,37 mmol) de trihalociclopropà **92** en 2 mL d' $\text{Et}_2\text{O}$  anh. Es refreda a  $-78^\circ\text{C}$  i s'addicionen 576  $\mu$ L (0,77 mmol) de *n*-BuLi (1,35 M en hexà). Es retira el bany i s'escalfa a ta durant 30 min. Passat aquest temps, es torna a refredar a  $0^\circ\text{C}$ , s'afegeixen 65  $\mu$ L de HMPA seca seguit de 25  $\mu$ L (0,40 mmol) de  $\text{CH}_3\text{I}$ . Després de 16 h de reacció a ta, s'addiciona  $\text{H}_2\text{O}$ , s'extreu amb  $\text{Et}_2\text{O}$  i les fases orgàniques reunides es renten amb  $\text{H}_2\text{O}$ , s'assequen sobre  $\text{MgSO}_4$ , es filtra i s'elimina el solvent. El cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà: $\text{Et}_2\text{O}$  (96:4); s'aconsegueixen 57 mg d'un oli que, d'acord amb la RMN de  $^1\text{H}$  i l'espectre d'IR, s'assignà a la cetona butílica **93**.

En el cas d'utilitzar 2,1 equiv de *tert*-BuLi (1,7 M en pentà), s'acaba per obtenir la cetona *tert*-butílica **94** juntament amb producte de partida no reaccionat.

#### 6.1.5.4. Intent de formació dels àcids 76, 77 i 78 a través de trihalociclopropans de cadena curta

##### 6.1.5.4.1. Síntesi del 2-(9-iodononiloxi)tetrahidropirà (67), 2-(10-iododeciloxi)tetrahidropirà (68) i 2-(11-iodoundeciloxi)tetrahidropirà (69)

Tot seguint el procediment descrit per sintetitzar el iodur d'alquil **36**, 3,0 g (20,1 mmol) de NaI (prèviament assecat a 110°C /1 mmHg), i 2,2 g (7,2 mmol) de derivat **64** dissolts en 22 mL d'acetona anh es fan reaccionar a 65-70°C durant 16 h. Un cop realitzat el tractament de la reacció i purificat el cru, s'obtenen 2,5 g (7,1 mmol, 95%) del iodur **67** desitjat.

Anàlogament a la síntesi de **67**, 1 g (3,11 mmol) de **65** es fan reaccionar amb 1,3 g (8,7 mmol) de NaI en 10 mL d'acetona anh. tot fornint 977 mg (2,6 mmol, 86%) del producte desitjat **68**.

Finalment, si es fan reaccionar 6,3 g (18,8 mmol) del derivat **66** i 7,9 g (52,7 mmol) de NaI, en 65 mL d'acetona anh s'aconsegueixen 6 g (15,7 mmol, 83%) del iodur **69** esperat.

##### 2-(9-iodononiloxi)tetrahidropirà (67)

**IR (film)/v:** 2929, 2853, 1457, 1346, 1118, 1077, 1033 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz),  $\delta$ : 4,54 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 3,16 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,5-1,8 (sc, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'H, C3'H i C4'H); 1,28 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz),  $\delta$ : 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 33,5; 30,7; 30,4; 29,7; 29,3; 29,3; 28,4; 26,1; 25,4; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 7,2 (CH<sub>2</sub>I) ppm.

##### 2-(10-iododeciloxi)tetrahidropirà (68)

**IR (film)/v:** 2927, 2854, 1463, 1440, 1352, 1120, 1078, 1033 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz),  $\delta$ : 4,53 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 3,15 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,5-1,8 (sc, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'H, C3'H i C4'H); 1,25 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz),  $\delta$ : 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 33,5; 30,7; 30,4; 29,7; 29,4; 29,39; 29,33; 28,4; 26,1; 25,4; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 7,3 (CH<sub>2</sub>I) ppm.

##### 2-(11-iodoundeciloxi)tetrahidropirà (69)

**IR (film)/v:** 2927, 2853, 1463, 1195, 1033 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 3,16 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,5-1,8 (sc, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'H, C3'H i C4'H); 1,24 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>)

ppm. RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz),  $\delta$ : 98,8 ( $\text{C}1'$ ); 67,6 ( $\text{C}5'$ ); 62,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 33,5; 30,7; 30,4; 29,7; 29,43; 29,4; 29,3; 28,5; 26,2; 25,4; 19,6 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}2'$ ,  $\text{C}3'$ ,  $\text{C}4'$ ); 7,3 ( $\text{CH}_2\text{I}$ ) ppm.

6.1.5.4.2. *Síntesi de l'1,1,2-tribromo-2-metilciclopropà (61), 1,1,2-tribromo-2-etilciclopropà (62) i 1,1,2-tribromo-2-propilciclopropà (63)*

En un matràs de 3 boques de 100 mL, proveït de refrigerant tipus Dimroth, embut d'addició de pressió compensada, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, s'introdueixen 5 g (25,0 mmol) d'1,2-dibromopropè en 10 mL d' $\text{Et}_2\text{O}$  anh. Es refreda el sistema a  $0^\circ\text{C}$  i s'addicionen 16,6 mL (50,0 mmol) de  $\text{EtMgBr}$  (3 M en  $\text{Et}_2\text{O}$ ). S'escalfa el matràs a  $50\text{-}55^\circ\text{C}$  i es deixa en agitació a aquesta temperatura durant 2 h 30 min tot controlant l'avanç de la reacció per RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Es torna a refredar a  $0^\circ\text{C}$  i s'afegeix lentament  $\text{HCl}$  1 M fins a pH lleugerament àcid. S'extreu amb  $\text{Et}_2\text{O}$  i les fases orgàniques reunides es renten amb  $\text{NaCl}$ . Un cop assecat amb  $\text{MgSO}_4$  i filtrat, s'elimina l' $\text{Et}_2\text{O}$  mitjançant destil·lació a pressió atmosfèrica emprant una columna farcida d'anells Raschig per acabar obtenint el derivat **60**. Aquest s'introdueix en un matràs de 10 mL, es refreda a  $0^\circ\text{C}$  i s'addicionen 800 mg de cetrimida, 4,3 mL (50 mmol) de  $\text{CHBr}_3$ , i finalment, 9,6 mL d'una solució de  $\text{NaOH}$  al 50%. Es deixa amb agitació molt vigorosa, a ta durant 48 h. El tractament de la reacció es realitza tot afegint  $\text{H}_2\text{O}$  i extraient amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les fases orgàniques reunides es renten amb  $\text{HCl}$  1 M i solució saturada de  $\text{NaCl}$ , s'asseca i un cop eliminat el solvent a pressió reduïda, el cru viscos obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb pentà. Es destil·la l'excés de  $\text{CHBr}_3$  ( $T_d=89^\circ\text{C}/12$  mmHg), tot fornint 6,1 g (19,0 mmol) del derivat **63** (58% dos etapes).

Per tal d'obtenir **62**, 5 g (25,0 mmol) d'1,2-dibromopropè es fan reaccionar amb 16,6 mL (50,0 mmol) de  $\text{MeMgBr}$  (3M en  $\text{Et}_2\text{O}$ ) en 10 mL d' $\text{Et}_2\text{O}$  anh; s'aconsegueixen, després d'eliminar l' $\text{Et}_2\text{O}$  del tractament de la reacció, el derivat **59**, el qual es fa reaccionar, a  $0^\circ\text{C}$ , amb 4,3 mL (50,0 mmol) de  $\text{CHBr}_3$ , 800 mg de cetrimida i 9,6 mL de solució de  $\text{NaOH}$  al 50% en aigua. Després de realitzar la purificació, s'aconsegueixen 4,26 g (13,9 mmol, 45% dos etapes) del tribromociclopropà **62** desitjat.

Per tal de preparar el derivat **61**, es fa reaccionar 6 g (49,6 mmol) de 2-bromopropè, 1,6 g de cetrimida, 8,6 mL (99,2 mmol) de  $\text{CHBr}_3$  i 19,2 mL de solució  $\text{NaOH}$  al 50% en aigua, tot aconseguint 10,2 g (34,8 mmol) de ciclopropà **61** pur amb un rendiment del 70%.



*1,1,2-tribromo-2-metilciclopropà (61)*

**IR (film)/v:** 2981, 1440, 1148, 1056, 1010  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,95 (d,  $J=9,0$  Hz, 1H, C3H); 1,82 (d,  $J=9,0$  Hz, 1H, C3H) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 39,5 (C1); 38,4 (C3), 33,1 (C2); 29,8 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

*1,1,2-tribromo-2-etilciclopropà (62)*

**IR (film)/v:** 2975, 2934, 2877, 1450, 1415, 1383, 1019, 818  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 2,08 (sc, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,93 (d,  $J=9,0$  Hz, 1H, C3H); 1,80 (d,  $J=9,0$  Hz, 1H, C3H); 1,22 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 47,0 (C1); 37,8 (C3), 35,4 ( $\text{CH}_2$ ); 32,9 (C2); 12,0 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

*1,1,2-tribromo-2-propilciclopropà (63)*

**IR (film)/v:** 2961, 2931, 2873, 1463, 1417, 1147, 1053, 1013  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 1,7-2,0 (sc, 4H,  $2\text{CH}_2$ ); 1,93 (d,  $J=9,5$  Hz, 1H, C3H); 1,80 (d,  $J=9,5$  Hz, 1H, C3H); 0,97 (t,  $J=7,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 45,6 (C1); 43,5 (C3), 38,0 ( $\text{CH}_2$ ); 33,1 (C2); 21,1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 13,4 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

6.1.5.4.3. *Síntesi del 2-[9-(2-propilcicloprop-1-enil)noniloxi]tetrahidropirà (70), 2-[10-(2-etilcicloprop-1-enil)deciloxi]tetrahidropirà (71) i 2-[11-(2-metilcicloprop-1-enil)undeciloxi]tetrahidropirà (72)*

En un matràs de tres boques, flamejat al buit, sota atmosfera d'argó, es disposen 906 mg (2,8 mmol) de **63** (prèviament passat per una columna d'alúmina bàsica) en 8,6 mL d' $\text{Et}_2\text{O}$  anh. Es refreda el baló a  $-78^\circ\text{C}$  i s'addicionen 4,0 mL (6,5 mmol) de *n*-BuLi (1,6 M en hexà). Acabada l'addició, s'escalfa el matràs a ta i es deixa en agitació durant 40 min. Es refreda novament a  $0^\circ\text{C}$ , s'addicionen 1,1 mL de HMPA seca, seguit de 500 mg (1,4 mmol) del iodur **67**. Es deixa en agitació a ta durant 16 h, s'afegeix  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Et}_2\text{O}$ , s'extreu amb  $\text{Et}_2\text{O}$ , i les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl. Un cop assecat amb  $\text{MgSO}_4$ , filtrat i evaporat el solvent, el cru que en resulta es purifica acuradament per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà: $\text{Et}_2\text{O}$  (97:3). S'obtenen d'aquesta forma 230 mg (0,75 mmol, 53%) del producte **70** desitjat.

Anàlogament, 535 mg (1,74 mmol) de **62** en 5,5 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$  anh es fan reaccionar a  $-78^\circ\text{C}$  amb 2,5 mL (4,0 mmol) de *n*-Buli (1,6 M en hexà). Després de 40 min a ta, s'addicionen 0,7 mL de HMPA seguit de 321 mg (0,87 mmol) de **68**. Un cop purificat s'assoleixen 127 mg (0,41 mmol) del ciclopropè **71** esperat amb un rendiment del 48%.

Per tal d'obtenir **72**, 766 mg (2,62 mmol) de **61** en 8,0 mL d'Et<sub>2</sub>O anh es fan reaccionar, a -78°C, amb 3,7 mL (6,11 mmol) de *n*-Buli (1,6M en hexà). Després de 40 min a ta, s'addiciona 1 mL de HMPA seca seguit de 500 mg (1,31 mmol) del iodur **69**, per acabar obtenint, després de realitzar la purificació escaient, 205 mg (0,66 mmol) del ciclopropè **72** esperat amb un rendiment del 51%.

*2-[9-(2-propilcicloprop-1-enil)noniloxi]tetrahidropirà (70)*

**IR (film)/v**: 2929, 2857, 1456, 1136, 1121, 1078, 1033 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,34 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>C); 1,5-1,8 (sc, 10H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,24 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>); 0,91 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,74 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 109,4; 109,1 (C1, C2); 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 29,7; 29,5; 29,4; 29,3; 28,0; 27,3; 26,2; 26,0; 25,4; 20,7; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 13,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C3) ppm.

*2-[10-(2-etilcicloprop-1-enil)deciloxi]tetrahidropirà (71)*

**IR (film)/v**: 2928, 2856, 1455, 1352, 1119, 1079, 1034 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,35 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 1,5-1,8 (sc, 10H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,24 (sa, 12H 6CH<sub>2</sub>); 1,10 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,75 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 110,4; 109,1 (C1, C2); 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 29,7; 29,55; 29,52; 29,4; 29,38; 29,36; 27,4; 26,2; 25,9; 25,4; 20,7; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 11,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C3) ppm.

*2-[11-(2-metilcicloprop-1-enil)undeciloxi]tetrahidropirà (72)*

**IR (film)/v**: 2927, 2859, 1678, 1455, 1352, 1121, 1079, 1034 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,33 (tq, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Cpr); 2,00 (t, *J*=1,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>cp); 1,5-1,8 (sc, 10H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,24 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,74 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 110,0 (C2); 105,1 (C1); 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 29,7; 29,5; 29,4; 29,3; 27,3; 26,2; 25,9; 25,4; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 11,5 (CH<sub>3</sub>); 8,0 (C3) ppm.

*6.1.5.4.4. Síntesi del 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonan-1-ol (73), 10-(2-etilcicloprop-1-enil)decan-1-ol (74) i 11-(2-metilcicloprop-1-enil)undecan-1-ol (75)*

En un matràs d'una boca proveït de refrigerant tipus Dimroth es disposen 230 mg (0,75 mmol) de **70** en 2,8 mL d'EtOH (96% v/v) i 38 mg (0,15 mmol) de PPTS.

S'escafa el sistema a 55°C durant 3 h, es refreda a ta, s'addicionen 15 mL de H<sub>2</sub>O i 15 mL d'Et<sub>2</sub>O, i es separen les fases. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub> i amb NaCl, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> i s'evapora el solvent. El cru així obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (70:30); s'aconsegueixen 146 mg (0,65 mmol) d'alcohol ciclopropènic **73** amb un rendiment del 87%.

De la mateixa forma, si s'utilitzen 127 mg (0,41 mmol) de **71** i 21 mg (0,08 mmol) de PPTS en 1,6 mL d'EtOH a 55°C durant 3 h s'obtenen 81 mg (0,36 mmol, 88%) del producte **74** esperat.

Anàlogament, tot emprant 205 mg (0,66 mmol) de **72** i 33 mg (0,13 mmol) de PPTS en 2,5 mL d'EtOH a 55°C durant 3 h s'aconsegueixen 130 mg (0,58 mmol, 87%) de l'alcohol ciclopropènic **75** desitjat.

*9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonan-1-ol (73)*

**IR (film)/v:** 3305, 2929, 2855, 1496, 1006 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,61 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,34 (tt, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 1,54 (sc, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH i 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,28 (sa, 10H 5CH<sub>2</sub>); 0,91 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,74 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 109,4; 109,1 (C1, C2); 63,0 (CH<sub>2</sub>O); 32,7; 29,5; 29,38; 29,33; 28,0; 27,3; 26,0; 25,7; 20,7; (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C3) ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O, C: 80,29%; H: 12,57%. Trobat, C: 79,45%; H: 12,83%.

*10-(2-etilcicloprop-1-enil)decan-1-ol (74)*

**IR (film)/v:** 3339, 2928, 2856, 1457, 1057, 1009 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,61 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,35 (tt, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,5 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 1,53 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,26 (sa, 12H 6CH<sub>2</sub>); 1,10 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,75 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 110,4; 109,0 (C1, C2); 63,0 (CH<sub>2</sub>O); 32,7; 29,56; 29,50; 29,3; 27,4; 25,9; 25,7; 19,6; (CH<sub>2</sub>); 11,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C3) ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O, C: 80,29%; H: 12,57%. Trobat, C: 79,48%; H: 12,65%.

*11-(2-metilcicloprop-1-enil)undecan-1-ol (75)*

**IR (film)/v:** 3344, 2927, 2855, 1465, 1444, 1057, 1007 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 3,59 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,33 (tq, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Cp); 1,99 (t, *J*=1,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>Cp); 1,51 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,24 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,74 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 110,0 (C2); 105,1 (C1); 62,9

(CH<sub>2</sub>O); 32,7; 29,5; 29,38; 29,33; 27,2; 25,9; 25,7; (CH<sub>2</sub>); 11,4 (CH<sub>3</sub>); 8,0 (C<sub>3</sub>) ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O, C: 80,29%; H: 12,57%. Trobat, C: 79,29%; H: 12,66%.

6.1.5.4.5. *Síntesi dels àcids 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonanoic (76), 10-(2-etilcicloprop-1-enil)decanoic (77) i 11-(2-metilcicloprop-1-enil)undecanoic (78)*

En un matràs d'una boca es disposen 50 mg (0,22 mmol) de l'alcohol **73** dissolts en 1,2 ml de DMF anh, es refreda a 0°C i s'addicionen 590 mg (1,5 mmol) de PDC. Es treu el bany de gel i es deixa en agitació a ta durant 2 h. Passat aquest temps, es torna a refredar a 0°C, s'afegeix H<sub>2</sub>O i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O. Les fases orgàniques reunides es renten repetides vegades amb H<sub>2</sub>O i solució saturada de NaCl. Un cop assecat el solvent, es filtra i es concentra al buit, tot obtenint un oli que es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (98:2); així, s'assoleixen 37 mg (0,15 mmol) de l'àcid esperat **76** amb un rendiment del 69%.

De la mateixa forma, 42 mg (0,18 mmol) d'alcohol **74** es fan reaccionar durant 2 h a ta amb 493 mg (1,31 mmol) de PDC en 1,0 ml de DMF seca. S'aconsegueixen així, 23 mg (0,097 mmol, 52%) de l'àcid **77** esperat.

Similarment, 50 mg (0,22 mmol) de **75** es dissolen en 1,2 ml de DMF anh i es fan reaccionar amb 590 mg (1,5 mmol) de PDC durant 2 h a ta, tot obtenint 25 mg (0,10 mmol) d'àcid **78** amb un 46% de rendiment.

*Àcid 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonanoic (76)*

**IR (film)/v:** 2928, 2857, 1709, 1279, 1009, 934 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,337 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 2,334 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 1,56 (sc, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O i 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,28 (sa, 8H, 4CH<sub>2</sub>); 0,91 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,74 (s, 2H, C<sub>3</sub>H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180, 1 (COOH); 109,4; 109,1 (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>); 34,0; 29,2; 29,1; 29,0; 28,0; 27,2; 25,9; 24,6; 20,6; (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>); 7,2 (C<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid 10-(2-etilcicloprop-1-enil)decanoic (77)*

**IR (film)/v:** 2929, 2857, 1709, 1464, 1268, 1003 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,35 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 2,33 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 1,56 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,27 (sa, 10H, 5CH<sub>2</sub>); 1,10 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,75 (s, 2H, C<sub>3</sub>H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180,0 (COOH); 110,5; 109,0 (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>); 34,0; 29,34; 29,32; 29,1; 29,0; 27,4; 25,9; 24,6; 19,6; (CH<sub>2</sub>); 11,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid 11-(2-metilcicloprop-1-enil)undecanoic (78)*

**IR (film)/v:** 2926, 2856, 1708, 1423, 1021 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ:** 10,33 (sa, 1H COOH); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 2,33 (tq, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Cp); 2,00 (t, *J*=1,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>Cp); 1,5-1,6 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,25 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>); 0,74 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ:** 180,1 (COOH); 109,9 (C2); 105,1 (C1); 34,0; 29,4; 29,36; 29,33; 29,2; 29,0; 27,2; 25,9; 24,6 (CH<sub>2</sub>); 11,5 (CH<sub>3</sub>); 8,0 (C3) ppm.

**6.1.6. Síntesi de la 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonilamina (82) i de l'1-(9-metoxinonil)-2-propilciclopropè (83)****6.1.6.1. Síntesi de la 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonilamina (82)****6.1.6.1.1. Síntesi de l'1-bromo-8-iodooctà (79)**

Tot seguint el procediment descrit per a l'obtenció de **30**, 510 mg (2,4 mmol) de 8-bromooctan-1-ol (**1**) dissolts en 11 ml d'Et<sub>2</sub>O i 6,6 ml de CH<sub>3</sub>CN secs es fan reaccionar amb 1,9 g (7,3 mmol) de PPh<sub>3</sub>, 500 mg (7,3 mmol) d'imidazole i 1,8 g (7,3 mmol) de I<sub>2</sub> per fornir 613 mg (1,9 mmol) del derivat dihalogenat **79** amb un rendiment del 80%.

**IR (film)/v:** 2930, 2854, 1453, 1223, 722 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ:** 3,38 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3,16 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>I); 1,81 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br i CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>I); 1,3-1,4 (sc, 8H, 4CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ:** 34,0; 33,4; 32,7; 30,3; 28,5; 28,3; 28,0, 7,1 (CH<sub>2</sub>) ppm.

**6.1.6.1.2. Síntesi del 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonanitril (81)**

Tal com s'ha descrit en la síntesi dels derivats ciclopropènics **70**, **71** i **72**, 805 mg (2,5 mmol) de **63** dissolts en 7,0 ml de Et<sub>2</sub>O anh. es fan reaccionar, a -78°C, amb 4,4 ml (5,7 mmol) de *n*-BuLi (1,3 M en hexà). Després de 40 min de reacció a ta, es refreda a 0°C i s'addicionen 0,96 ml de HMPA seguit de 400 mg (1,25 mmol) de **79** en 500 µL d'Et<sub>2</sub>O. Un cop tractada la reacció, el cru obtingut **80** es dissol en 2,5 ml de HMPA i es fa reaccionar amb 91 mg (1,85 mmol) de NaCN sec durant 1 h. S'afegeix H<sub>2</sub>O, s'extreu amb Et<sub>2</sub>O i les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl. Un cop assecat amb MgSO<sub>4</sub> i filtrat, el solvent s'elimina i el cru es purifica per

cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (88:12). En aquestes condicions s'obtenen 120 mg (0,55 mmol, 44%) del nitril **81** esperat.

**IR (film)/v:** 2930, 2857, 2246, 1609, 1537, 1454, 1264, 1006, 723 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,34 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 2,31 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 1,55 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN i 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,29 (sa, 8H 4CH<sub>2</sub>); 0,91 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,75 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 119, 8 (CN); 109,3; 109,2 (C1, C2); 29,1; 29,0; 28,69; 28,61; 28,0; 27,2; 25,9; 25,3; 20,6; 17,1 (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C3) ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N, C:82,13%, H: 11,48%; N: 6,38%. Trobat, C: 81,55%; H: 11,37%; N: 6,24%.

#### 6.1.6.1.3. Síntesi de la 9-(2-propilcicloprop-1-enil)nonilamina (**82**)

Sobre una suspensió formada per 13 mg (0,34 mmol) de LiAlH<sub>4</sub> en 400 μL d'Et<sub>2</sub>O, a 0°C i sota atmosfera d'argó, s'addiciona una solució de 50 mg (0,23 mmol) de **81** en 700 μL de Et<sub>2</sub>O. Es deixa en agitació a ta durant 30 min, es filtra el cru sobre una placa del n<sup>o</sup>4 rentant amb H<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, i les fases orgàniques reunides s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub>. Un cop filtrat i evaporat el solvent, el cru que s'obté es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice desactivada amb un 1% de Et<sub>3</sub>N, tot eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:5). S'aconsegueixen 37 mg (0,16 mmol) d'amina **82** amb un rendiment del 72%.

**IR (film)/v:** 3304, 2959, 2927, 2856, 1574, 1486, 1312, 1007 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,64 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 2,34 (sc, 4H, 2CH<sub>2</sub>Cp); 1,55 (sc, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cp); 1,25 (sa, 10H 5CH<sub>2</sub>); 0,89 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,73 (s, 2H, C3H) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 109,4; 109,1 (C1, C2); 42,1 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 33,6; 29,5; 29,4; 29,3; 28,0; 27,3; 26,8; 25,9; 20,6 (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>); 7,3 (C3) ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>N, C:80,65%; H: 13,08%; N: 6,27%. Trobat, C: 80,80%; H: 13,15%; N: 6,05%.

#### 6.1.6.2. Síntesi de l'1-(9-metoxinonil)-2-propilciclopropè (**83**)

En un vial de 3 ml es disposen 50 mg (0,89 mmol) de KOH en pols en 225 μL de DMSO. Es deixa el sistema en agitació a ta durant 5 min i seguidament s'addicionen 25 mg (0,11 mmol) de **73** i 28 μL (0,44 mmol) de CH<sub>3</sub>I. Passades 2 h, s'afegeix H<sub>2</sub>O i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les fases orgàniques reunides es renten amb H<sub>2</sub>O, s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub>, i un cop filtrat i evaporat el solvent a pressió reduïda, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (98:2).

En aquestes condicions s'obtenen 18 mg (0,68 mmol) de l'alcohol metilat **83** amb un 66% de rendiment.

**IR (film)/v:** 2959, 2928, 2857, 1457, 1121, 1062, 1007  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,34 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,30 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2,34 (sc, 4H,  $2\text{CH}_2\text{Cp}$ ); 1,54 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  i  $2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cp}$ ); 1,27 (sa, 10H  $5\text{CH}_2$ ); 0,91 (t,  $J=7,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 0,74 (s, 2H,  $\text{C}_3\text{H}$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 109,4; 109,1 ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ ); 72,9 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 58,5 ( $\text{OCH}_3$ ); 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 28,0; 27,3; 26,1; 26,0; 20,7; ( $\text{CH}_2$ ); 13,9 ( $\text{CH}_3$ ); 7,3 ( $\text{C}_3$ ) ppm. **Anàlisi elemental:** Calculat per  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}$ , C:80,61%; H: 12,68%. Trobat, C: 80.26%; H: 12.73%.

### 6.1.7. Síntesi dels àcids olefínics **120**, **121**, **122**, **123**, **131**, **132**, **133** i **134**

#### 6.1.7.1. Síntesi del tert-butildimetil-11-dodeciniloxisilà (**104**)

En un matràs de 250 mL, prèviament flamejat i sota atmosfera d'argó, s'introdueixen 7,7 g (42,3 mmol) d'11-dodecin-1-ol (**41**) dissolts en 55 mL de DMF anh i 7,2 g (105,8 mmol) d'imidazole. Seguidament s'afegeixen 7,6 g (50,8 mmol) de TBDMSCl i es deixa la reacció a ta durant 2 h. Es refreda a  $0^\circ\text{C}$  i s'hidrolitza l'excés de reactiu amb 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; després de 40 min d'agitació, s'extreu amb AcOEt, i les fases orgàniques reunides es renten amb HCl 1 M, seguit de solució saturada de NaCl. S'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$ , es filtra i s'evapora el solvent per obtenir 12,3 g (41,5 mmol) d'alcohol protegit (**104**) amb un 97% de rendiment.

**IR (film)/v:** 3315, 2929, 2856, 1463, 1255, 1097, 835, 775  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,57 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 2,15 (dt,  $J_1=2,5$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,91 (t,  $J=2,5$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,84 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,25 (sa, 14H,  $7\text{CH}_2$ ); 0,87 (s, 9H,  $3\text{CH}_3$ ); 0,02 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (50 MHz),  $\delta$ : 84,8 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 68,0 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 63,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 32,8; 29,5; 29,4; 29,3; 29,0; 28,7; 28,4; 25,7; ( $\text{CH}_2$ ); 25,9 ( $3\text{CH}_3$ ); 18,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); -5,2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

### 6.1.7.2. Síntesi dels àcids de configuració Z, 120, 121, 122 i 123

#### 6.1.7.2.1. Síntesi del *tert*-butildimetil-11-trideciniloxisilà (105), *tert*-butildimetil-11-tetradeciniloxisilà (106), *tert*-butildimetil-11-pentadeciniloxisilà (107) i del *tert*-butildimetil-11-hexadeciniloxisilà (108)

En un matràs d'una boca, prèviament flamejat i sota atmosfera inert, s'introdueixen 4 g (13,5 mmol) de **104** en 15 mL de THF anh, es refreda el sistema a 0°C i s'addicionen 10,1 mL (16,2 mmol) de *n*-BuLi (1,6 M en hexà). Seguidament, i també a 0°C, s'addiciona 1 mL (16,2 mmol) de CH<sub>3</sub>I dissolt en 15 mL de HMPA anh. Es deixa 5 min a 0°C i 1 h a ta, es torna a refredar a 0°C i s'hidrolitza el cru de reacció amb 10 mL de solució saturada de NH<sub>4</sub>Cl. S'elimina el THF a pressió reduïda i s'extreu amb hexà. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra, s'evapora el dissolvent i el cru es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (97:3). D'aquesta forma s'aconsegueixen 3,0 g (9,7 mmol, 72%) de l'alquí **105** desitjat.

De la mateixa forma, si s'utilitzen 964 mg (3,26 mmol) **104** dissolts en 5 mL de THF, 3 mL (4,89 mmol) de *n*-BuLi (1,6 M en hexà) i 395 µL (4,89 mmol) de EtI dissolts en 5 mL de HMPA s'obtenen 739 mg (2,30 mmol) de l'alquí **106** esperat amb un rendiment del 70%.

Anàlogament, tot utilitzant 4 g (13,5 mmol) de **104** en 15 mL de THF anh, 10,1 mL (16,2 mmol) de *n*-BuLi (1,6 M en hexà) i 1,6 mL (16,2 mmol) de iodopropà en 15 mL de HMPA anh. s'aconsegueixen 3 g (8,9 mmol) de producte esperat **107** amb un rendiment del 66%.

Finalment, si es fan reaccionar 4 g (13,5 mmol) de **104** en 15 mL de THF anh amb 10,1 mL (16,2 mmol) de *n*-BuLi (1,6 M en hexà) i 1,8 mL (16,2 mmol) de iodobutà dissolts en 15 mL de HMPA anh s'assoleixen 2,9 g (8,2 mmol) de **108** amb un rendiment del 61%.

#### *tert*-Butildimetil-11-trideciniloxisilà (**105**)

**IR (film)/v:** 2927, 2856, 1463, 1255, 1097, 835, 775 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ:** 3,57 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 2,08 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>3</sub>); 1,75 (t, *J*=2,5 Hz, 3H, C≡CCH<sub>3</sub>); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,87 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>); 0,02 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 79,4 (CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>3</sub>); 75,2 (CH<sub>3</sub>C≡C); 63,3 (CH<sub>2</sub>O); 32,8; 29,5; 29,46; 29,41; 29,1; 29,0; 28,8; 25,7; 18,7 (CH<sub>2</sub>); 25,9 (3CH<sub>3</sub>); 18,3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 3,4 (CH<sub>3</sub>C≡C); -5,2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.



*tert-Butildimetil-11-tetradeciniloxisilà (106)*

**IR (film)/v:** 2971, 2927, 2853, 1462, 1147, 1110, 1044, 919  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,57 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 2,12 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2$ ); 1,26 (sa, 16H, 8 $\text{CH}_2$ ); 1,09 (t,  $J=7,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); 0,87 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ); 0,02 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 81,5 ( $\text{EtC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 79,5 ( $\text{EtC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 67,8 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 29,7; 29,5; 29,44; 29,41; 29,1; 28,8; 26,1; 25,9 (3 $\text{CH}_3$ ); 18,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 18,7; 14,3 ( $-\text{CH}_2-$ ); 12,4 ( $\text{CH}_3$ ); -5,2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

*tert-Butildimetil-11-pentadeciniloxisilà (107)*

**IR (film)/v:** 2954, 2929, 2856, 1461, 1255, 1097, 835, 775  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 3,57 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 2,09 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2$ ); 1,25 (sa, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ); 0,94 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 0,87 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ); 0,02 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 80,3; 80,0 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2$ ); 63,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 32,8; 29,5; 29,47; 29,42; 29,15; 29,13; 28,8; 25,7; 22,5; 20,7; 18,7 ( $\text{CH}_2$ ); 25,9 (3 $\text{CH}_3$ ); 18,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 13,4 ( $\text{CH}_3$ ); -5,2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

*tert-Butildimetil-11-hexadeciniloxisilà (108)*

**IR (film)/v:** 2954, 2929, 2856, 1461, 1255, 1097, 835, 775  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 3,57 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 2,12 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2$ ); 1,25 (sa, 20H, 10 $\text{CH}_2$ ); 0,88 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 0,87 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ); 0,02 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 80,2; 80,1 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2$ ); 63,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 32,8; 31,2; 29,5; 29,47; 29,42; 29,15; 29,14; 28,8; 25,7; 21,9; 18,7; 18,4 ( $\text{CH}_2$ ); 25,9 (3 $\text{CH}_3$ ); 18,3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 13,6 ( $\text{CH}_3$ ); -5,2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

6.1.7.2.2. *Síntesi del (Z)-11-tridecen-1-ol (116), (Z)-11-tetradecen-1-ol (117), (Z)-11-pentadecen-1-ol (118) i (Z)-11-hexadecen-1-ol (119)*

En un matràs d'una boca s'introdueixen 300 mg (0,97 mmol) de **105** dissolts en 3,3 mL d'hexà. S'addicionen 30 mg (2% mol) de Pd/BaSO<sub>4</sub> al 10% i 30  $\mu\text{L}$  de quinoleïna, es purga el sistema al buit, es connecta una entrada amb H<sub>2</sub> i es deixa en agitació a ta durant 3 h. Es filtra el cru de reacció sobre Celite<sup>®</sup> rentant amb Et<sub>2</sub>O, s'evapora el solvent, s'afegeixen 10 mL d'hexà i 10 mL de HCl 1 M i s'extreu amb hexà. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el solvent a pressió reduïda. El cru obtingut es dissol en 7 mL de THF anh, s'addicionen 1,45 mL (1,45 mmol) de solució 1 M de TBAF en THF i es deixa en agitació a ta durant 1 h. Transcorregut aquest temps, s'addiciona 1

mL de solució 1 M de HCl, s'evapora el THF a pressió reduïda, s'afegeix H<sub>2</sub>O i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> i el cru resultant es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (75:25); s'obtenen 148 mg (0,74 mmol) de l'alcohol **116** amb un rendiment del 78%.

Anàlogament, si s'utilitzen 200 mg (0,62 mmol) de **106** en 2,7 ml d'hexà, 24 mg de Pd/BaSO<sub>4</sub> al 10% i 25 µL de quinoleïna hidrogenant durant 3 h, tot dissolent el cru que s'obté en 7 mL de THF i fent-lo reaccionar amb 925 µL (0,93 mmol) de solució 1 M de TBAF en THF s'aconsegueixen 102 mg (0,48 mmol) de l'alcohol **117** amb un rendiment del 78%.

Per tal d'obtenir l'alcohol **118**, 300 mg (0,89 mmol) de **107** dissolts en 3 mL d'hexà es suspenen sobre 23 mg (2% mol) de catalitzador de Pd enverinat amb un 10% de BaSO<sub>4</sub> i s'afegeixen 23 µL de quinoleïna. Un cop reduït, el cru es dissol en en 7 ml de THF i es fa reaccionar amb 1,32 mL (1,32 mmol) de solució 1 M de TBAF en THF per acabar obtenint 151 mg (0,67 mmol) que correspon a un 75%.

Finalment, tot utilitzant 300 mg (0,85 mmol) de l'alquí **108** dissolts en 3,3 mL d'hexà, 27 mg (2% mol) de catalitzador de Pd-BaSO<sub>4</sub> i 27 µL de quinoleïna i dissolent el cru que en resulta en 7 ml de THF per fer-lo reaccionar amb 1,27 mL (1,27 mmol) de solució 1 M de TBAF en THF s'aconsegueixen 151 mg (0,63 mmol) de l'alcohol **119** que suposen un 74% de rendiment.

*(Z)-11-Tridecen-1-ol (116)*

**IR (film)/v**: 3361, 3011, 2925, 2854, 1454, 1056 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 5,39 (sc, 2H, CH=CH); 3,61 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,00 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>3</sub>); 1,57 (dd, *J*<sub>1</sub>=0,9 Hz, *J*<sub>2</sub>=6,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 130,8 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 123,6 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 63,0 (CH<sub>2</sub>OH); 32,7; 29,57; 29,54; 29,4; 29,2; 26,8; 25,7 (CH<sub>2</sub>) ppm.

*(Z)-11-Tetradecen-1-ol (117)*

**IR (film)/v**: 3346, 3004, 2962, 2926, 2855, 1454, 1058 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 5,31 (sc, 2H, CH=CH); 3,60 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,00 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,92 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 131,4 (EtC=CCH<sub>2</sub>); 129,2 (EtC=CCH<sub>2</sub>); 63,0 (CH<sub>2</sub>OH); 32,7; 29,7; 29,57; 29,52; 29,49; 29,40; 29,2; 27,0; 25,7; 20,4 (CH<sub>2</sub>); 14,3 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*(Z)*-11-Pentadecen-1-ol (**118**)

**IR (film)/ $\nu$** : 3339, 3011, 2925, 2854, 1463, 1055  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 5,33 (sc, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 3,61 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,98 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2$ ); 1,25 (sa, 18H,  $9\text{CH}_2$ ); 0,87 (t,  $J=7,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 130,0; 129,6 ( $\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2$ ); 63,0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 32,7; 29,7; 29,58; 29,54; 29,5; 29,4; 29,2; 27,1; 25,7; 22,8 ( $\text{CH}_2$ ); 13,8 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

*(Z)*-11-Hexadecen-1-ol (**119**)

**IR (film)/ $\nu$** : 3328, 3011, 2925, 2854, 1465, 1056  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 5,32 (sc, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 3,61 (t,  $J=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,99 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2$ ); 1,25 (sa, 20H,  $10\text{CH}_2$ ); 0,87 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 129,86; 129,85 ( $\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2$ ); 63,0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 32,7; 31,9; 29,7; 29,52; 29,54; 29,50; 29,4; 29,2; 27,1; 26,8; 25,7; 22,3 ( $\text{CH}_2$ ); 13,9 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

6.1.7.2.3. *Síntesi dels àcids (Z)*-11-tridecenoic (**120**), (*Z*)-11-tetradecenoic (**121**), (*Z*)-11-pentadecenoic (**122**) i (*Z*)-11-hexadecenoic (**123**)

El reactiu de Jones es prepara de la següent manera: sobre una solució de 76 mg (0,76 mmol) de  $\text{CrO}_3$  en 525  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , s'addicionen, a  $0^\circ\text{C}$ , 65  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  del 98%. En un matràs d'una boca es disposen 76 mg (0,38 mmol) de **116** en 2 mL d'acetona, es refreda a  $0^\circ\text{C}$  i s'addiciona el reactiu de Jones preparat. Es deixa en agitació 16 h a ta, s'afegeix  $\text{HCl}$  1 M i s'extreu amb  $\text{AcOEt}$ . Les fases orgàniques reunides es renten amb  $\text{HCl}$  1 M, s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$  i un cop filtrat i evaporat el solvent a pressió reduïda, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (99:1). S'obtenen 50 mg (0,23 mmol) de l'àcid **120** esperat amb un rendiment del 62%.

De manera similar, 83 mg (0,39 mmol) d'alcohol **117** es fan reaccionar, a  $0^\circ\text{C}$ , amb el reactiu de Jones preparat a partir de 78 mg (0,78 mmol) de  $\text{CrO}_3$ , 540  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  i 66  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  del 98%. D'aquesta forma s'aconsegueixen 54 mg (60%) de l'àcid **121** esperat.

Anàlogament, 126 mg (0,56 mmol) de **118**, dissolts en 3 mL d'acetona, es fan reaccionar, a  $0^\circ\text{C}$ , amb el reactiu de Jones format per 112 mg (1,12 mmol) de  $\text{CrO}_3$ , 780  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  i 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  del 98% tot aconseguint 94 mg (0,39 mmol) de l'àcid **122** amb un rendiment del 70%.

Finalment, 118 mg (0,49 mmol) de **119** en 3 mL d'acetona, es fan reaccionar, a 0°C, amb el reactiu de Jones format per 100 mg (1,0 mmol) de CrO<sub>3</sub>, 700 µL de H<sub>2</sub>O i 86 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del 98% tot fornint 90 mg (0,35 mmol) de l'àcid **123** amb un rendiment del 72%.

*Àcid (Z)-11-tridecenoic (120)*

**IR (film)/v**: 3012, 2926, 2854, 1709, 1457, 1411, 1236, 1090, 940 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 5,38 (sc, 2H, CH=CH); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 2,00 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>3</sub>); 1,59 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,57 (d, *J*=5,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,26 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 179,7 (COOH); 130,8 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>-); 123,6 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>-); 33,9; 29,5; 29,4; 29,3; 29,23; 29,21; 29,0; 26,8; 24,6 (-CH<sub>2</sub>-); 12,6 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid (Z)-11-tetradecenoic (121)*

**IR (film)/v**: 3340-2671, 3005, 2928, 2851, 1712, 1454, 1408, 1259, 934 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 5,31 (sc, 2H, -CH=CH-); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,99 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,61 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,26 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>); 0,93 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 180,4 (COOH); 131,5 (EtC=CH); 129,2 (EtC=CH); 34,0; 29,7; 29,4; 29,3; 29,21; 29,20; 29,0; 27,0; 24,6; 20,4 (CH<sub>2</sub>); 14,3 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid (Z)-11-pentadecenoic (122)*

**IR (film)/v**: 3005, 2926, 2855, 1710, 1457, 1412, 1286, 1235, 937 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 5,33 (sc, 2H, CH=CH-); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,98 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,60 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,26 (sa, 14H, CH<sub>2</sub>); 0,87 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 179,9 (COOH); 130,0; 129,6 (HC=CH); 33,9; 29,7; 29,4; 29,3; 29,27; 29,24; 29,21; 29,0; 27,1; 24,6; 22,8 (CH<sub>2</sub>); 13,8 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid (Z)-11-hexadecenoic (123)*

**IR (film)/v**: 3005, 2926, 2855, 1711, 1465, 1412, 1285, 1202, 1084 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 5,32 (sc, 2H, CH=CH-); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,99 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,61 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,26 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>); 0,87 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 179,8 (COOH); 129,87; 129,84 (HC=CH); 33,9; 31,9; 29,7; 29,4; 29,3; 29,24; 29,22; 29,0; 27,1; 26,9; 24,6; 22,3 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>) ppm.

### 6.1.7.3. Síntesi dels àcids de configuració *E*, 131, 132, 133 i 134

#### 6.1.7.3.1. Síntesi del 2-(11-trideciniloxi)tetrahidropirà (109), 2-(11-pentadeciniloxi)tetrahidropirà (110) i 2-(11-hexadeciniloxi)tetrahidropirà (111)

En matràs d'una boca s'introdueix 1 g (3,2 mmol) de **105** en 25 mL de THF i s'addicionen tot seguit 1,5 g (4,8 mmol) de TBAF·3H<sub>2</sub>O. Es deixa 1 h en agitació a ta, s'evapora el dissolvent, s'afegeix HCl 1 M i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'assequen sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el solvent a pressió reduïda. El cru obtingut es dissol en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s'addiciona una punta d'espàtula de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, es refreda a 0°C i s'afegeix 300 µL (4,8 mmol) de DHP. Després de 45 min en agitació a 0°C, s'addiciona solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El cru així obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (95:5). Un cop evaporat el solvent, s'obtenen 480 mg (1,7 mmol, 54%) de l'alcohol protegit **109**.

Anàlogament, 1 g (2,9 mmol) de **107** en 25 mL de THF es fan reaccionar durant 45 min a ta amb 1,4 g (4,4 mmol) de TBAF·3H<sub>2</sub>O. El cru així obtingut es dissol en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s'addiciona una punta d'espàtula de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, es refreda a 0°C, i s'afegeix 295 µL (4,4 mmol) de DHP per acabar obtenint 600 mg (1,9 mmol, 67%) del derivat tetrahidropiranílic **110**.

Finalment, si s'utilitza 1 g (2,8 mmol) de **108** en 25 mL de THF i 1,3 g (4,3 mmol) de TBAF·3H<sub>2</sub>O i es dissol el cru obtingut un cop tractada la reacció en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, per fer-lo reaccionar amb una punta d'espàtula de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O i 210 µL (4,3 mmol) de dihidropirà s'aconsegueixen 370 mg (1,1 mmol, 47%) del derivat **111**.

#### 2-(11-Trideciniloxi)tetrahidropirà (109)

**IR (film)/v**: 2928, 2850, 1465, 1351, 1200, 1136, 1120, 1078, 1032 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'*H*); 2,08 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,75 (t, *J*=3,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>C≡C); 1,5-1,6 (sc, 6H, C2'*H*, C3'*H* i C4'*H*); 1,25 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 98,8 (C1'); 79,4 (CH<sub>2</sub>C≡C); 75,2 (CH<sub>3</sub>C≡C); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 29,7; 29,5; 29,4; 29,1; 29,0; 28,8; 26,2; 25,4; 19,6; 18,7 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4') ppm.

#### 2-(11-Pentadeciniloxi)tetrahidropirà (110)

**IR (film)/v**: 2929, 2855, 1455, 1200, 1134, 1119, 1078, 1033 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'*H*); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i

C5'H); 2,09 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>); 1,5-1,6 (sc, 6H, C2'H, C3'H i C4'H); 1,25 (sa, 18H, 9CH<sub>2</sub>); 0,94 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ**: 98,8 (C1'); 80,3; 80,0 (CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 30,7; 29,7; 29,5; 29,4; 29,15; 29,12; 28,8; 26,2; 25,4; 22,5; 20,7; 19,6; 18,7 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 13,4 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*2-(11-Hexadeciniloxi)tetrahidropirà (111)*

**IR (film)/v**: 2927, 2855, 1453, 1351, 1200, 1135, 1077, 1033 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (200 MHz), **δ**: 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 2,11 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>); 1,3-1,5 (sc, 6H, C2'H, C3'H i C4'H); 1,26 (sa, 20H, 10CH<sub>2</sub>); 0,87 (t, *J*=7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (50 MHz), **δ**: 98,8 (C1'); 80,1 (CH<sub>2</sub>C≡CCH<sub>2</sub>); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 31,2; 30,7; 29,7; 29,5; 29,4; 29,1; 28,8; 26,2; 25,5; 21,9; 19,6; 18,7; 18,4 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 13,6 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*6.1.7.3.2. Síntesi del 2-((E)-11-trideceniloxi)tetrahidropirà (124), 2-((E)-11-pentadeceniloxi)tetrahidropirà (125) i 2-((E)-11-hexadeceniloxi)tetrahidropirà (126)*

En un matràs de 3 boques proveït de condensador de NH<sub>3</sub>, refredat a -78°C, es condensen 50 mL de NH<sub>3</sub>. Seguidament s'addicionen 480 mg (1,7 mmol) de **109** dissolts en 18 mL de THF anh i 200 mg (8,6 mmol) de sodi metàl·lic tot prenent la solució un color blau intens. Es manté el condensador de NH<sub>3</sub> a -78°C i es deixa la reacció a reflux durant 8 h. Transcorregut aquest temps, s'elimina l'amoníac, es refreda a 0°C i s'afegeix MeOH, seguit de solució saturada de NH<sub>4</sub>Cl. S'evapora el solvent a pressió reduïda i s'extreu amb Et<sub>2</sub>O, rentant les fases orgàniques reunides amb solució saturada de NaCl. Un cop assecat sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrat i eliminat el solvent, s'obtenen 456 mg (1,6 mmol) de l'alquè **124** amb un rendiment del 95%.

De forma similar, sobre 60 mL de NH<sub>3</sub> líquid, s'addicionen 600 mg (1,9 mmol) de **110** en 21 mL de THF anh seguit de 224 mg (9,7 mmol) de sodi metàl·lic. Un cop eliminat l'amoníac, i fet el tractament de la reacció, s'obtenen 529 mg (1,7 mmol) de l'alquè **125** desitjat (88%).

Finalment, sobre 50 mL de NH<sub>3</sub> condensat, s'addicionen 422 mg (1,3 mmol) de **111** en 16 mL de THF anh i 150 mg (6,5 mmol) de sodi metàl·lic, tot aconseguint 417 mg (1,3 mmol) del compost esperat **126** que correspon a un 98% de rendiment.

*2-((E)-11-trideceniloxi)tetrahidropirà (124)*

**IR (film)/v**: 2929, 2855, 1466, 1123, 1035, 962 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ**: 5,38 (sc, 2H, CH=CH); 4,55 (dd, *J*<sub>1</sub>=3,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=4,5 Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 1,93 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C=C); 1,61 (dd, *J*<sub>1</sub>=2,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>C=C);

1,5-1,6 (sc, 6H, C2'H, C3'H i C4'H); 1,23 (sa, 16H, 8CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 131,6 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 124,5 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 32,5; 30,7; 29,7; 29,6; 29,5; 29,49; 29,47; 29,1; 26,2; 25,4; 19,6 (-CH<sub>2</sub>-, C2', C3', C4'); 17,9 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*2-((E)-11-pentadeceniloxi)tetrahidropirà (125)*

**IR (film)/v**: 2929, 2860, 1461, 1123, 1035, 962 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 5,36 (sc, 2H, CH=CH); 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 1,93 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,3-1,5 (sc, 6H, C2'H, C3'H i C4'H); 1,24 (sa, 18H, 9CH<sub>2</sub>); 0,85 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 130,5; 130,0 (HC=CH); 98,8 (C1'); 67,6 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 34,7; 32,6; 30,7; 29,7; 29,6; 29,5; 29,4; 29,1; 26,2; 25,4; 22,7; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 13,6 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*2-((E)-11-hexadeceniloxi)tetrahidropirà (126)*

**IR (film)/v**: 2929, 2860, 1466, 1123, 1084, 1035, 967 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz),  $\delta$ : 5,36 (sc, 2H, CH=CH); 4,55 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H, C1'H); 3,3-3,8 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>O i C5'H); 1,94 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,5-1,8 (sc, 6H, C2'H, C3'H i C4'H); 1,24 (sa, 20H, 10CH<sub>2</sub>-); 0,86 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz),  $\delta$ : 130,34; 130,29 (HC=CH); 98,8 (C1'); 67,7 (C5'); 62,3 (CH<sub>2</sub>O); 32,6; 32,2; 31,8; 30,7; 29,7; 29,6; 29,5; 29,4; 29,1; 26,2; 25,4; 22,1; 19,6 (CH<sub>2</sub>, C2', C3' i C4'); 13,9 (CH<sub>3</sub>) ppm.

**6.1.7.3.3. Síntesi dels àcids (E)-11-tridecenoic (131), (E)-11-tetradecenoic (132), (E)-11-pentadecenoic (133) i (E)-11-hexadecenoic (134)**

Tot seguint el procediment d'oxidació explicat en l'obtenció dels àcids de configuració Z, **120**, **121**, **122** i **123**, 456 mg (1,6 mmol) de derivat **124** es dissolen en 12 mL d'acetona i es fan reaccionar, a 0°C, amb el reactiu de Jones preparat a partir de 484 mg (4,8 mmol) de CrO<sub>3</sub>, 3,4 mL de H<sub>2</sub>O i 420 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del 98%. S'obtenen així 232 mg (1,1 mmol, 68%) de l'àcid **131** desitjat.

Pel que fa a l'àcid **132**, abans de realitzar l'oxidació de Jones, cal realitzar la hidròlisi prèvia. Així, en un matràs d'una boca es disposen 100 mg (0,39 mmol) de l'acetat d'(E)-11-tetradecenil dissolts en 1,8 mL de MeOH i s'addicionen 217 mg (1,57 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Es deixa en agitació a ta durant 16 h passades les quals s'afegeix HCl 1 M, s'elimina el MeOH i s'extreu amb AcOEt. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl i un cop assecat sobre MgSO<sub>4</sub> s'evapora el solvent obtenint un cru que s'oxida mitjançant el reactiu de Jones format per 78 mg (0,78

mmol) de CrO<sub>3</sub>, 550 µL de H<sub>2</sub>O i 67 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aconseguint 58 mg (0,26 mmol) de l'àcid **132** amb un rendiment del 66%.

Anàlogament, 529 mg (1,7 mmol) de **125** dissolts en 12 mL d'acetona, es fan reaccionar, a 0°C, amb el reactiu de Jones preparat a partir de 512 mg (5,1 mmol) de CrO<sub>3</sub>, 3,6 mL de H<sub>2</sub>O i 444 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del 98% tot obtenint 304 mg (1,3 mmol) de l'àcid **133** amb un rendiment del 74%.

Finalment, 417 mg (1,3 mmol) de **126** en 11 mL d'acetona, es fan reaccionar, a 0°C, amb el reactiu de Jones preparat amb 386 mg (3,9 mmol) de CrO<sub>3</sub>, 2,6 mL de H<sub>2</sub>O i 334 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> del 98%; s'aconsegueixen 215 mg (0,85 mmol) de l'àcid **134** amb un rendiment del 66%.

*Àcid (E)-11-tridecenoic (131)*

**IR (film)/v:** 3021, 2929, 2860, 1715, 1441, 1285, 967 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 5,38 (sc, 2H, CH=CH); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,93 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>3</sub>); 1,61 (dd, *J*<sub>1</sub>=1,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=3,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,53 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,24 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 179,7 (COOH); 131,6 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 124,5 (CH<sub>3</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 34,0; 32,5; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 29,0; 24,6 (CH<sub>2</sub>); 17,9 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid (E)-11-tetradecenoic (132)*

**IR (film)/v:** 3108-2675, 3005, 2962, 2926, 2854, 1713, 1461, 1437, 1414, 1286 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 5,39 (sc, 2H, CH=CH); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,95 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,60 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,25 (sa, 12H, CH<sub>2</sub>); 0,93 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180,5 (COOH); 131,8 (EtC=CH); 129,3 (EtC=CH); 34,1; 32,5; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 25,5; 24,6; (CH<sub>2</sub>); 13,9 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid (E)-11-pentadecenoic (133)*

**IR (film)/v:** 3031, 2924, 2855, 1710, 1461, 1412, 1285, 967 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 5,36 (sc, 2H, CH=CH); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,94 (sc, 4H, CH<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>); 1,61 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 1,25 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>); 0,86 (t, *J*=7,5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 179,9 (COOH); 130,5; 130,1 (HC=CH); 34,7; 33,9; 32,5; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 29,09; 29,03; 24,6; 22,7 (CH<sub>2</sub>); 13,6 (CH<sub>3</sub>) ppm.

*Àcid (E)-11-hexadecenoic (134)*

**IR (film)/v:** 2929, 2855, 1710, 1461, 1417, 1294, 967 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 5,36 (sc, 2H, CH=CH); 2,32 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 1,94 (sc, 4H,



$\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2$ ); 1,61 (sc, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,25 (sa, 16H,  $8\text{CH}_2$ ); 0,86 (t,  $J=6,5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 180,2 ( $\text{COOH}$ ); 130,32; 130,30 ( $\text{HC}=\text{CH}$ ); 34,0; 32,5; 32,2; 31,8; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 29,09; 29,93; 24,6; 22,1 ( $\text{CH}_2$ ); 13,9 ( $\text{CH}_3$ ) ppm.

### 6.1.8. Síntesi de l'àcid (*Z,Z*)-11,13-[15,15,16,16,16- $^2\text{H}_5$ ]-hexadecadienoic (140)

#### 6.1.8.1. Síntesi del 2-(11,13-tetradecadiiniloxi)tetrahidropirà (135)

En un matràs de 3 boques, flamejat al buit i sota atmosfera d'argó, s'introdueixen 200 mg (1,0 mmol) d'1,4-bis-(trimetilsilil)-1,3-butadií en 4 mL de THF anh. Es refreda la solució a  $-78^\circ\text{C}$  i s'addicionen 980  $\mu\text{l}$  (1,0 mmol) de  $\text{CH}_3\text{Li}\cdot\text{LiBr}$  (1,1 M en  $\text{Et}_2\text{O}$ ). Es deixa en agitació a ta durant 4 h, passades les quals es torna a refredar a  $-78^\circ\text{C}$ . S'addicionen 400 mg (1,0 mmol) de **68** dissolts en 2 mL de DMPU seca i es deixa la reacció a ta durant 16 h. El tractament de la mateixa es realitza tot afegint 7 mL de solució saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , evaporant el THF a pressió reduïda, i extraient la fase aquosa amb hexà. Les fases orgàniques reunides es renten amb  $\text{H}_2\text{O}$ , solució saturada de  $\text{NaCl}$ , s'asseca sobre  $\text{MgSO}_4$ , es filtra, i un cop eliminat el solvent, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà: $\text{Et}_2\text{O}$  (95:5). S'obtenen, d'aquesta manera, 200 mg (0,69 mmol) de l'alquí **135** amb un 72% de rendiment.

**IR (film)/v**: 3311, 3238, 2931, 2854, 2225, 1465, 1352, 1136, 1120, 1078, 1033  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 4,53 (dd,  $J_1=3,0$  Hz,  $J_2=4,5$  Hz, 1H,  $\text{C1}'\text{H}$ ); 3,3-3,8 (sc, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$  i  $\text{C5}'\text{H}$ ); 2,21 (dt,  $J_1=1,0$  Hz,  $J_2=7,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ ); 1,93 (t,  $J=1,0$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ); 1,5-1,8 (sc, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{C2}'\text{H}$ ,  $\text{C3}'\text{H}$  i  $\text{C4}'\text{H}$ ); 1,25 (sa, 14H,  $7\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 98,8 ( $\text{C1}'$ ); 78,5 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 68,4 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 67,6 ( $\text{C5}'$ ); 64,6 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 64,4 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 62,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 30,7; 29,7; 29,47; 29,41; 29,3; 29,0; 28,7; 27,9; 26,2; 25,4; 22,6; 18,9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C2}'$ ,  $\text{C3}'$  i  $\text{C4}'$ ) ppm.

#### 6.1.8.2. Síntesi del [15,15,16,16,16- $^2\text{H}_5$ ]-11,13-hexadecadiin-1-ol (137)

En una baló de 3 boques proveït d'entrada d'argó i flamejat al buit, es disposen 426 mg (1,5 mmol) de **135** dissolts en 5 mL de THF anh. Es refreda el sistema a  $-25^\circ\text{C}$  i

s'addicionen 1,2 mL (1,9 mmol) de *n*-BuLi (1,5 M en hexà). Es deixa en agitació a aquesta temperatura durant 90 min. Seguidament s'afegeixen 160 µL (1,9 mmol) de CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>I dissolts en 5 mL de HMPA seca. Es permet que la temperatura arribi a ta i es deixa en agitació 5 h més. S'addicionen 5 mL de solució saturada de NH<sub>4</sub>Cl, s'elimina el THF, s'extreu amb hexà i les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl. Després d'assecar amb MgSO<sub>4</sub>, filtrar i evaporar el solvent a pressió reduïda, el cru obtingut es disposa en un matràs d'una boca, s'addicionen 10 mL de MeOH, 10 mg de *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, i es deixa en agitació a ta durant 16 h. Transcorregut aquest temps, s'evapora el MeOH, s'extreu amb AcOEt, es renta la fase orgànica amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra i s'elimina el solvent. El cru obtingut, es purifica mitjançant cromatografia en columna de gel de sílice, tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (82:18). S'aconsegueixen 135 mg (0,56 mmol, 40%) de l'alcohol deuterat **137**.

**IR (film)/ν:** 3320, 2929, 2854, 2234, 1465, 1056 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), δ: 3,59 (t, *J*=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 2,19 (t, *J*=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡C); 1,46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C); 1,24 (sa, 12H, 6CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), δ: 78,5 (C≡CC≡CCH<sub>2</sub>); 77,4 (C≡CC≡CCH<sub>2</sub>); 65,1 (C≡CC≡CCH<sub>2</sub>); 64,6 (C≡CC≡CCH<sub>2</sub>); 62,9 (CH<sub>2</sub>OH); 33,2; 30,3; 30,2; 30,0; 29,4; 29,1; 28,1; 26,3; 18,9 (quin, *J*=22 Hz, CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>); 16,6; 12,3 (hept, *J*=20 Hz, CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>) ppm.

### 6.1.8.3. Síntesi del [15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-11,13-hexadecadiinoat de metil (138)

En un baló de tres boques es disposen 135 mg (0,56 mmol) de l'alcohol **137** en 6 mL de DMF seca. S'addicionen 1,7 g (4,5 mmol) de PDC i es deixa el sistema en agitació a ta durant 16 h. S'aboca el cru sobre 25 mL d'aigua, s'acidifica amb HCl 1 M i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tot rentant les fases orgàniques reunides amb aigua i solució saturada de NaCl. S'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, es filtra, s'evapora i el cru obtingut es disposa en un matràs amb entrada d'argó, flamejat al buit. S'addicionen 2,5 mL de DMF seca, 335 mg (2,4 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anh i es deixa en agitació a ta durant 10 min. Transcorregut aquest temps, s'introdueixen 176 µL (2,8 mmol) de CH<sub>3</sub>I i es deixa en agitació durant 16 h. S'aboca el cru de reacció sobre 15 mL d'aigua, s'extreu amb hexà, es renta la fase orgànica amb solució saturada de NaCl, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, i un cop filtrat i evaporat el solvent al buit, el cru així obtingut es purifica per cromatografia en

columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (96:4); s'obtenen, d'aquesta forma, 94 mg (0,35 mmol) de l'èster metílic **138** amb un rendiment del 66%.

**IR (film)/v:** 2929, 2856, 2235, 1739, 1463, 1434, 1172  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (200 MHz),  $\delta$ : 3,60 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 2,27 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ ); 2,20 (t,  $J=7.0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ ); 1,22 (sa, 14H, 7 $\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 174,0 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ); 77,4 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 76,6 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 65,1 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 64,5 ( $\text{C}\equiv\text{CC}\equiv\text{CCH}_2$ ); 51,2 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 34,0; 29,18; 29,11; 29,0; 28,9; 28,7; 28,2; 24,8; 19,0; 18,8 (quin,  $J=21$  Hz,  $\text{CD}_3\text{CD}_2$ ); 12,3 (hept,  $J=20$  Hz,  $\text{CD}_3\text{CD}_2$ ) ppm.

#### 6.1.8.4. Síntesi del (Z,Z)-[15,15,16,16,16- $^2\text{H}_5$ ]-11,13-hexadecadienoat de metil (**139**)

##### *Preparació del Zn activat amb Ag i Cu:*

En una placa porosa del n<sup>o</sup>4 es disposen 2,45 g (37,6 mmol) de Zn en pols i es renten amb 14 mL de HCl 0,5 M durant 30 s. Seguidament s'afegeix aigua i es transvasa el metall humit a un matràs de fons rodó sota atmosfera d'argó, suspent-lo en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . S'afegeixen 240 mg (1,2 mmol) de  $\text{Cu}(\text{OAc})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  i es deixa en agitació durant 15 min. A continuació s'addicionen 240 mg (1,4 mmol) de  $\text{AgNO}_3$  i s'agita durant 30 min. Es filtra el metall així obtingut, tot rentant amb  $\text{H}_2\text{O}$  (2x20 mL), MeOH (2x10 mL), acetona (2x10 mL) i  $\text{Et}_2\text{O}$  (2x10 mL) i es deixa assecar.

Es transfereix el Zn activat a un matràs d'una boca, tot suspent-lo en 10 mL de MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  (1:1). Sota atmosfera d'argó, s'addicionen 118 mg (0,44 mmol) de **138** i es deixa a ta fins que el cromatograma de gasos no mostri producte de partida, tot afegint més Zn activat si la reacció no avança. Es filtra el cru al buit sobre Celite<sup>®</sup>, es renta amb hexà/MeOH i s'evapora el solvent. S'obté un cru que es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb hexà:AcOEt (92:8). S'aconsegueixen 70 mg (0,26 mmol, 58%) d'un oli groguenc que s'assignà al diè **139** esperat.

**IR (film)/v:** 2929, 2860, 1737, 1461, 1123, 1035, 962  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 6,17-6,24 (sc, 2H,  $\text{C}_2\text{D}_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 5,38-5,42 (sc, 2H,  $\text{C}_2\text{D}_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 3,64 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 2,26 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ ); 2,12 (sc, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$ ); 1,24 (sa, 14H, 7 $\text{CH}_2$ ) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 174,2 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ); 133,4 ( $\text{C}_2\text{D}_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 132,0 ( $\text{C}_2\text{D}_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 123,4 ( $\text{C}_2\text{D}_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 122,9 ( $\text{C}_2\text{D}_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 51,3 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 34,0; 29,5; 29,37; 29,33; 29,19; 29,14; 29,0; 27,4; 24,9; 19,8 (quin,  $J=19$  Hz,  $\text{CD}_3\text{CD}_2$ ); 13,0 (hept,  $J=19$  Hz,  $\text{CD}_3\text{CD}_2$ ) ppm.

#### 6.1.8.5. Síntesi de l'àcid (Z,Z)-[15,15,16,16,16-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-11,13-hexadecadienoic (140)

En un vial de 3 mL es disposen 70 mg (0,26 mmol) de l'èster **139** i s'afegeixen 0,6 mL de solució 2,5 M de KOH en EtOH més 2 gotes d'aigua. Es deixa en agitació a ta durant 16 h, s'evapora l'EtOH amb corrent de N<sub>2</sub>, s'afegeix HCl 1 M fins aconseguir un pH àcid, s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>, i un cop filtrat i evaporat, s'obtenen 51 mg (0,20 mmol) de l'àcid **140** esperat amb un 78% de rendiment.

**IR (film)/v:** 3035, 3030, 2927, 2854, 2223, 1708, 1463, 1411, 1288, 1238 cm<sup>-1</sup>.

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 9,91 (sa, 1H, CO<sub>2</sub>H); 6,18-6,26 (sc, 2H, C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>CH=CH-CH=CH); 5,40-5,43 (sc, 2H, C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>CH=CH-CH=CH); 2,31 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H); 2,13 (sc, 2H, CH<sub>2</sub>C=C); 1,27 (sa, 14H, 7CH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 180,2 (CO<sub>2</sub>H); 133,4 (C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>CH=CH-CH=CH); 132,0 (C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>CH=CH-CH=CH); 123,4 (C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>CH=CH-CH=CH); 123,0 (C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>CH=CH-CH=CH); 34,1; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 20,19; 29,16; 27,4; 24,6 (CH<sub>2</sub>) 19,6 (quin, *J*=20 Hz, CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>); 13,1 (hept, *J*=19 Hz, CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>) ppm.

#### 6.1.9. Síntesi de derivats del Coenzim A en fase sòlida

##### 6.1.9.1. Síntesi del tioacetat de S-octil (141) per transtioesterificació sobre el tioacetat de S-4-(benzilcarbamoil)fenil (147)

###### 6.1.9.1.1. Proves de protecció de l'àcid 4-mercaptobenzoic

###### 6.1.9.1.1.1. Síntesi de l'àcid 4-(tetrahidropiraniltio)benzoic (142)

En un matràs de 5 mL es disposen 100 mg (0,65 mmol) d'àcid *p*-mercaptobenzoic i 10 mg d'àcid *p*-toluensulfònic en 650 µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec i s'addicionen 65 µL (0,71 mmol) de dihidropirà. Es deixa en agitació a ta durant 30 min, i s'afegeix HCl 1 M, s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub>. Un cop filtrat, el solvent s'evapora tot obtenint 152 mg d'un sòlid blanc que s'assignà al tiol protegit **142** amb un rendiment del 98%.

**IR (KBr)/v:** 2995-2544, 2938, 1680, 1593, 1418, 1294, 1278, 1185, 1033, 763 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/d<sub>6</sub>DMSO), **δ:** 7,62 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C2H); 7,16 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C3H); 5,07 (dd, *J*<sub>1</sub>=4,0 Hz, *J*<sub>2</sub>=5,5 Hz, 1H, C1'H); 3,83 (dd, *J*<sub>1</sub>=5,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=11,5 Hz, 1H, C5'H); 3,34 (dd, *J*<sub>1</sub>=5,5 Hz, *J*<sub>2</sub>=11,5 Hz, 1H, C5'H); 1,7-1,3 (sc,

6H, C2'H, C3'H i C4'H) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{d}_6\text{-DMSO}$ ),  $\delta$ : 167,3 (COOH); 141,5 (C4); 129,3 (C2), 127,7 (C1); 127,5 (C3); 83,2 (C1'); 63,7 (C5'); 30,6 (C2'); 24,6 (C4'); 20,7 (C3') ppm. **P.f.**=152-154°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}$ , C: 60,48%; H: 5,92%; S: 13,45%. Trobat, C: 59,24%; H: 5,92%; S: 13,24%.

#### 6.1.9.1.1.2. Síntesi de l'àcid 4-(tert-butoxicarboniltio)benzoic (**143**)

Es disposen 200 mg (1,3 mmol) d'àcid *p*-mercaptobenzoic en 5 mL de MeOH. S'addicionen, sota atmosfera d'argó, 180  $\mu\text{L}$  (1,3 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  seca seguit de 340 mg (1,5 mmol) de  $(\text{Boc})_2\text{O}$ . Es deixa en agitació a ta durant 16 h, s'evapora el MeOH, i s'addicionen 100 mL de solució tampó  $\text{AcONa}/\text{AcOH}$  (pH=3,8). S'extreu amb  $\text{AcOEt}$ , s'asseca i un cop filtrat, el solvent és eliminat per donar lloc a 322 mg (1,27 mmol) del tiol protegit esperat **143** amb un rendiment 98%.

**IR (KBr)/v:** 3098-2542, 1729, 1688, 1592, 1418, 1370, 1290, 1118, 933, 764  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 8,09 (d,  $J=8,0$  Hz, 2H, C2H); 7,62 (d,  $J=8,0$  Hz, 2H, C3H); 1,50 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 167,5 (COOH); 166,4 (SCOO); 133,75 (C2); 133,71 (C1), 131,2 (C4); 129,9 (C3); 85,8 (3CH<sub>3</sub>); 27,8 (CH<sub>3</sub>) ppm. **P.f.**=112-114°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}$ , C: 56,67%; H: 5,55%; S: 12,61%. Trobat, C: 56,07%; H: 5,67%; S: 11,00%.

#### 6.1.9.1.1.3. Síntesi de l'àcid 4-(tritiltio)benzoic (**144**)

En un matràs de 25 mL es disposen 2,0 g (12,9 mmol) d'àcid 4-mercaptobenzoic en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anh. S'addiciona 1,0 mL (6,89 mmol) de piridina anh i es deixa en agitació a ta durant 10 min. Passat aquest temps s'afegeixen 3,97 g (14,26 mmol) de clorur de trifenilmetà i es deixa en agitació durant 16 h. S'elimina el solvent, s'afegeix solució saturada de NaCl i s'extreu amb  $\text{AcOEt}$ . Les fases orgàniques reunides s'assequen amb  $\text{MgSO}_4$  i un cop filtrat i evaporat el solvent, el sòlid obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (98:2). S'obtenen 4,66 g (11,7 mmol) del tiol protegit **144** amb un 91% de rendiment.

**IR (KBr)/v:** 1687, 1593, 1489, 1443, 1419, 1309, 1293, 741, 700  $\text{cm}^{-1}$ . **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz),  $\delta$ : 7,67 (d,  $J=9,0$  Hz, 2H, C2H); 7,39 (m, 6H, 3Ph<sub>Tritil</sub>); 7,24 (m, 9H, 3Ph<sub>Tritil</sub>); 6,99 (d,  $J=9,0$  Hz, 2H, C3H) ppm. **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz),  $\delta$ : 171,2 (COOH); 143,9; 143,8; 130,6; 129,9; 129,5; 127,1; 126,5 (C1-C4 i C<sub>Tritil</sub>); 70,9 (Ph<sub>3</sub>C) ppm. **P.f.**=237-239°C (dec). **Anàlisi elemental:** Calculat per  $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{S}$ , C: 78,76%; H: 5,08%; S: 8,09%. Trobat, C: 77,57%; H: 5,01%; S: 7,57%.

#### 6.1.9.1.2. Síntesi del tioacetat de *S*-4-(benzilcarbamoil)fenil (147)

##### 6.1.9.1.2.1. Síntesi de la 4-(trilitio)-*N*-benzilbenzamida (145)

En un matràs de 2 boques de 50 mL es disposen, sota atmosfera d'argó, 825 µL (7,56 mmol) de benzilamina en 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anh. S'addicionen 62 mg (0,50 mmol) de DMAP, 2 g (5,04 mmol) de l'àcid **144**, es refreda el sistema a 0°C i es fa reaccionar amb 967 mg (5,04 mmol) de EDC. Es deixa a ta durant 16 h, s'afegeix H<sub>2</sub>O i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaCl, s'assequen amb MgSO<sub>4</sub> i un cop filtrat i eliminat el solvent, s'obtenen 2,23 g (4,6 mmol) d'un sòlid blanc que s'assigna a l'amida **145** desitjada (91%).

**IR (KBr)/v:** 3346, 1637, 1589, 1542, 1482, 1439, 1314, 1293, 735, 700 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO), **δ:** 8,97 (t, *J*=5,5 Hz, 1H, CONH); 7,54 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C2H); 7,31-7,23 (m, 20H, 4Ph); 6,93 (d, *J*=8,0 Hz, 2H, C3H); 4,38 (d, *J*=5,5 Hz, 2H, PhCH<sub>2</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO), **δ:** 165,3 (CONH); 143,6; 139,5; 138,3; 132,7; 131,6; 129,4; 128,1; 127,9; 127,2; 127,0; 126,6 (C1-C4 i 4Ph); 70,3 (Ph<sub>3</sub>C); 42,5 (PhCH<sub>2</sub>) ppm. **P.f.**=280-282°C.

##### 6.1.9.1.2.2. Síntesi de la *N*-benzil-4-mercaptobenzamida (146)

En un matràs de 10 mL s'introdueixen, sota atmosfera d'argó, 325 mg (0,68 mmol) de **145**. S'addicionen 2,8 mL d'una mescla TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, v/v) seguit de 217 µL (1,36 mmol) de Et<sub>3</sub>SiH, observant-se descoloració del cru de reacció. Transcorreguts 45 min s'addiciona H<sub>2</sub>O i s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Un cop sec, s'evapora el solvent a pressió reduïda i el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (96:4). En aquestes condicions s'aconsegueixen 157 mg (0,64 mmol, 95%) del tiol **146** esperat.

**IR (KBr)/v:** 3311, 3054, 2564, 1637, 1598, 1555, 1491, 1422, 1319, 1255, 1100, 842, 709 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 7,65 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C2H); 7,34 (sa, 5H, PhCH<sub>2</sub>); 7,29 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C3H); 6,35 (t, *J*=5,5 Hz, 1H, CONH); 4,63 (d, *J*=5,5 Hz, 2H, PhCH<sub>2</sub>); 3,57 (s, 1H, SH) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 166,5 (CONH); 138,0; 136,3; 131,2; 128,8; 128,5; 127,9; 127,6; 126,8 (C1-C4 i Ph); 44,1 (PhCH<sub>2</sub>) ppm. **P.f.**=154-156°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NOS; C: 69,10%; H: 5,39%; N: 5,76%; S: 13,18%. Trobat, C: 68,75%; H: 5,68%; N: 5,15%; S: 12,55%.

#### 6.1.9.1.2.3. Síntesi del tioacetat de *S*-4-(benzilcarbamoil)fenil (**147**)

En un matràs de 5 mL es disposen 100 mg (0,41 mmol) de tiol **146** dissolts en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. S'addicionen 235 µL (4,11 mmol) de AcOH glacial, 5 mg (0,04 mmol) de DMAP, seguit de 118 mg (0,62 mmol) de EDC. Es deixa reaccionant a ta durant 16 h, s'addiciona H<sub>2</sub>O, s'extreu amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i les fases orgàniques reunides es renten amb solució saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Un cop assecat i eliminat el solvent, el cru obtingut es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1); s'obtenen així 98,1 mg (0,34 mmol) de l'acetat **147** amb un rendiment del 84%.

**IR (KBr)/v:** 3323, 1706, 1641, 1555, 1320, 1125, 849, 714 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 7,75 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C2H); 7,39 (d, *J*=8,5 Hz, 2H, C3H); 7,30 (sa, 5H, PhCH<sub>2</sub>); 6,83 (t, *J*=5,5 Hz, 1H, CONH); 4,56 (d, *J*=5,5 Hz, 2H, PhCH<sub>2</sub>); 2,41 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz), **δ:** 193,1 (SCOCH<sub>3</sub>); 166,5 (CONH); 137,9; 135,0; 134,2; 131,6; 128,6; 127,7; 127,6; 127,5 (C1-C4 i Ph); 44,0 (PhCH<sub>2</sub>); 30,2 (SCOCH<sub>3</sub>) ppm. **P.f.**=136-138°C. **Anàlisi elemental:** Calculat per C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>S; C: 67,34%; H: 5,30%; N: 4,91%; S: 11,24%. Trobat, C: 67,98%; H: 5,24%; N: 4,61%; S: 10,73%.

#### 6.1.9.1.3. Síntesi del tioacetat de *S*-octil (**141**) per transtioesterificació

En un matràs de 10 mL s'addicionen, sota atmosfera d'argó, 153 µL (0,87 mmol) de DIEA en 1,5 ml de DMF anh. Seguidament, s'afegeixen 90 µL (0,52 mmol) d'octiltiol i es deixa en agitació a ta durant 10 min. Passat aquest temps, s'addiciona l'acetat **147** (100 mg, 0,35 mmol) en 0,5 ml de DMF i es deixa reaccionant durant 16 h. Transcorregut aquest temps, s'afegeix H<sub>2</sub>O, s'acidifica fins a pH àcid i s'extreu amb AcOEt. Les fases orgàniques reunides es renten exhaustivament amb H<sub>2</sub>O i un cop assecat i filtrat, el cru es purifica per cromatografia en columna de gel de sílice tot eluint amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1) per tal de recuperar el tiol **147** de partida, i després es torna a repurificar tot eluint amb hexà:Et<sub>2</sub>O (98:2) per tal de separar el tioacetat de *S*-octil (**141**) de l'1-octiltiol en excés. En aquestes condicions s'obtenen 43 mg (0,23 mmol, 65%) del tioacetat **141** esperat juntament amb 68 mg (0,24 mmol) del tiol **146** (80% de recuperació).

Si s'utilitzen 74 mg (0,87 mmol) de NaHCO<sub>3</sub>, el resultat és el mateix.

**IR (film)/v:** 2957, 2926, 2854, 1695, 1462, 1354, 1134, 952, 630 cm<sup>-1</sup>. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz), **δ:** 2,83 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>S); 2,28 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 1,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S); 1,23 (sa, 10H, 5CH<sub>2</sub>); 0,84 (t, *J*=7,2 Hz, CH<sub>3</sub>) ppm. **RMN de <sup>13</sup>C** (75

MHz),  $\delta$ : 196,0 (SCOCH<sub>3</sub>); 31,7; 30,5 (SCOCH<sub>3</sub>); 29,6; 29,1; 29,0; 28,7; 22,5 (CH<sub>2</sub>); 14,0 (CH<sub>3</sub>) ppm.

### 6.1.9.2. Síntesi de derivats de CoASH mitjançant la reacció de transtioesterificació

#### 6.1.9.2.1. Síntesi de les resines PEGA (155, 156, 157, 158 i 159) i ArgoPore<sup>®</sup> (162, 163, 164, 165 i 166)

##### 6.1.9.2.1.1. Síntesi de les resines PEGA-SH (154) i ArgoPore<sup>®</sup>-SH (161)

Es consideren 500 mg de resina PEGA-NH<sub>2</sub> (NovaBiochem, 0,4 mmol/g). S'infla aquesta mitjançant rentats successius amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O i DMF (3x3 mL cadascun). S'addicionen 3 mL de solució de DIEA al 10% en DMF i es deixa en agitació durant 15 min. Es filtra i es renta amb DMF i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x4 mL). Es suspèn la resina en 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s'addicionen 12 mg (0,2 mmol) de DMAP, 396 mg (1 mmol) de **144** i 192 mg (1 mmol) d'EDC. Es deixa reaccionant 3 h, es filtra i es torna a repetir la reacció. Aquest cop es deixa 16 h a ta, tot donant un test de Kaiser negatiu. Es filtra i es renta amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i DMF (3x4 mL), afegint a continuació 4 mL d'una solució de Ac<sub>2</sub>O:DIEA:DMF (15:15:70). Després de 10min en agitació es filtra i es renta amb DMF, MeOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x3 mL), per tal d'obtenir la resina protegida **153**.

Pel cas de la resina ArgoPore<sup>®</sup>-NH<sub>2</sub> (Aldrich, 0,6-1,1 mmol/g), es segueix el mateix procediment que amb la resina PEGA, tot emprant 1,09 g (2,75 mmol) de **144**, 527 mg (2,75 mmol) d'EDC i 67 mg (0,55 mmol) de DMAP, en 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; s'obté la resina protegida **160**.

A continuació es desprotegeix el grup tritil, tot suspenent la resina en 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i afegint, sota atmosfera d'argó, 4 mL de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) seguit de 65  $\mu$ L (0,4 mmol) de Et<sub>3</sub>SiH en el cas de la resina PEGA i 180  $\mu$ L (1,1 mmol) per la resina macroporosa. Es deixa 45 min en agitació, es filtra, es renta amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x3 mL) i es torna a repetir la desprotecció durant 45 min més. Seguidament, es filtra i es renta de forma successiva amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, Et<sub>2</sub>O i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tot aconseguint les resines **154** i **161** sobre les quals es realitza el test d'Ellman quantitatiu per tal d'obtenir la càrrega.

PEGA-SH:

IR(KBr)/v: 2857, 1659 (*st* C=O), 1455, 1352, 1253, 1108 cm<sup>-1</sup>.

ArgoPore<sup>®</sup>-SH:

IR(KBr)/v: 2918, 2856, 1668 (*st* C=O), 1485, 1453, 830, 795, 759, 701 cm<sup>-1</sup>.



6.1.9.2.1.2. *Síntesi de les resines modificades PEGA (155, 156, 157, 158 i 159) i ArgoPore<sup>®</sup> (162, 163, 164, 165 i 166)*

Es parteix d'una resina PEGA-SH (**154**) amb una càrrega de 0,26 mmol/g i d'una resina ArgoPore<sup>®</sup>-SH (**161**) de càrrega 0,32 mmol/g.

Es prenen 50 mg (13 µmol) de la resina **154** i 41 mg (13 µmol) de la resina **161** i s'infla amb 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durant 30 min. La resina es filtra, s'omple amb 600 µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o DMF (en el cas d'emprar l'àcid 2-cloro-5-nitrobenzoic), s'addicionen 5 mg de DMAP i 130 µmol de cada àcid (7,5 µL de AcOH en el cas de formar les resines **155** i **162**; 14 µL d'àcid 2-metilbutanoic per formar les resines **157** i **164**; 13 µL d'àcid (*E*)-2-pentenoic per les resines **158** i **165**; 35 mg d'àcid palmític per sintetitzar les resines **156** i **163**; i 26 mg de l'àcid 2-cloro-2-nitrobenzoic per formar les resines **159** i **166**). En acabat s'afegeixen 7,5 mg (39 µmol) d'EDC i es deixa en agitació a ta durant 16 h, tot obtenint un test d'Ellman qualitatiu negatiu. La resina es filtra i es renta amb CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>2</sub>O, MeOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x1 mL cadascú).

6.1.9.2.2. *Síntesi de l'acetil-CoA (148), 2-metilbutiril-CoA (149), (E)-2-pentenoil-CoA (150), palmitoil-CoA (151) i 2-cloro-5-nitrobenzoil-CoA (152)*

Es pren cadascuna de les resines esterificades, tant la de base PEGA (**155-159**) com la de base ArgoPore<sup>®</sup> (**162-166**) i es transfereixen a un vial de vidre d'1 mL proveït de tap amb sèptum. Es purga el vial mitjançant una corrent d'argó i s'addicionen, sota atmosfera d'argó, 5 mg (7,5 µmol) de CoASH dissolts en 800 µL de solució desgasada de tampó NaHCO<sub>3</sub> (0,1 M, pH=8,5). La mescla s'agita en el *roller* a ta durant 16 h. Transcorregut aquest temps, es filtra la resina, tot rentant amb H<sub>2</sub>O milliQ (0,5 mL x 4 cops), recollint el filtrat en un vial de vidre de 5 mL. Es liofilitza la solució aquosa tot obtenint un sòlid blanc esponjós el qual s'analitza per HPLC emprant una columna de fase reversa (C<sub>18</sub>), i acetonitril/tampó K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=5,3) com a fase mòbil.

No es mostren els espectres de ressonància d'hidrogen (500 MHz, D<sub>2</sub>O).

## **6.2. BIOQUÍMICA**

### **6.2.1.1. Insectes**

Els insectes de l'espècie *S. littoralis* pertanyen a la colònia que es manté en el nostre departament. Els animals es mantenen sota un fotoperíode de 16 h de llum (fotofase) i 8 h de foscor (escotofase), a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  i una humitat relativa del  $65 \pm 5\%$ . Les larves s'alimenten amb una dieta artificial. Les pupes són sexades una setmana abans de l'eclosió i separades segons el sexe. Els adults són alimentats amb una dissolució de sacarosa al 10%. En els assaigs s'utilitzen únicament femelles verges d'1 a 4 h de vida.

Pel que fa als insectes de l'espècie *T. processionea*, les pupes de femelles van ser proporcionades pel Dr M. Breuer de la *Catholic University of Lueven*, Bèlgica. Un cop van arribar al nostre laboratori, es van mantenir en les mateixes condicions de temperatura i humitat indicades anteriorment fins a l'emergència dels adults.

### **6.2.1.2. Dissecció de les glàndules feromonals**

En *S. littoralis*, la glàndula feromonal és un sac ventral eversible d'epiteli glandular, d'1 o 2 mm de diàmetre, localitzada en la membrana intersegmental entre el vuitè i el novè segment abdominal. Només emergeix a l'exterior durant el període d'emissió de feromona i resta invaginada en períodes d'inactivitat sexual. La dissecció es realitza tot prement lleugerament l'abdomen, per tal d'aconseguir l'extrusió de l'ovopositor i l'evaginació de la glàndula feromonal, la qual es dissectiona amb cura amb unes tisores entomològiques.

En *T. processionea*, la glàndula és una anella d'epiteli glandular que envolta la membrana situada entre el dos darrers segments abdominals. La dissecció es realitza tot seccionant l'ovipositor, que es disposa sota els binoculars adherit a un tros de paper de filtre humitejat amb aigua. Amb l'ajuda de tisores i pinces entomològiques, l'epiteli glandular es separa de la resta de l'ovipositor amb molta cura.

### **6.2.1.3. Tractaments**

#### **6.2.1.3.1. Determinació de l'efecte isotòpic**

Els experiments van ser conduïts *in vitro*, tot utilitzant plaques de poliestirè de 96 pous de fons rodó. Sobre cada pou s'afegeixen 5  $\mu\text{L}$  de medi d'incubació. Aquest

consisteix en una solució de medi salí Grace (Sigma-Aldrich) (135  $\mu\text{L}$ ) i una solució en DMSO (15  $\mu\text{L}$ ) d'una mescla 1:1 de cadascun dels àcids utilitzats (**24** i **28**; **25** i **28**; **34** i **38**; **35** i **38**) d'una concentració individual inicial de 10 mg/mL. Les glàndules feromonals de *S. littoralis* són separades, netejades amb cura i submergides en cada pou amb medi d'incubació. Les plaques es segellen amb un plàstic adherent i s'incuben durant 3 h a 25°C. Passat aquest temps, les glàndules es recullen, s'extreuen els lípids i els extractes així obtinguts són metanolitzats tal com es detalla en apartats posteriors per tal d'obtenir els èsters metílics.

L'efecte isotòpic (KIE) va ser calculat a partir de les proporcions de producte format procedents del substrat no marcat i de l'anàleg deuterat, i està referit a les abundàncies dels ions moleculars respectius dels diversos isotopòmers del (*E,E*)-10,12-tetradecadienoat de metil ( $d_4$ , 242;  $d_5$ , 243). Els efectes isotòpics van ser corregits considerant la proporció exacta dels substrats marcats i no marcats administrats, proporció determinada mitjançant les anàlisis per CG-EM d'una mostra derivatitzada amb  $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ . Les correccions van ser també realitzades tot considerant la incorporació incompleta de deuteri en els substrats i l'abundància natural dels isòtops del carboni i de l'oxigen en els ions seleccionats. Aquests darrers valors foren obtinguts a partir dels cromatogrames de CG-EM d'extractes de teixits incubats amb els substrats d'una forma individual.

#### 6.2.1.3.2. *Determinació de l'estereoselectivitat de la 1,4-dessaturasa*

Aquests experiments es van realitzar *in vitro* tot utilitzant plaques de poliestirè de 96 pous de fons rodó, de forma anàloga als experiments acabats de descriure. Així, sobre cada pou s'afegeixen 5  $\mu\text{L}$  de medi d'incubació consistent en una solució de medi salí Grace (135  $\mu\text{L}$ ) i una solució en DMSO (15  $\mu\text{L}$ ) de cadascun dels àcids utilitzats en aquest estudi (**55**, **56**, **168** i **169**) d'una concentració individual inicial 10 mg/mL. Després de 3 h d'incubació a 25°C les glàndules es recullen, s'extreuen els lípids i els extractes així obtinguts són metanolitzats tal com es detalla en apartats posteriors, per tal d'obtenir els èsters metílics els quals s'analitzen per CG-EM-SIM tot seleccionant els ions a  $m/z$  223-227 (tractament amb **168** o **169**) o  $m/z$  240-244 (tractament amb **55** o **56**). L'estereoespecificitat va ser determinada d'acord amb l'abundància dels ions en l'interval  $m/z$  223-227 en el primer cas i en l'interval  $m/z$  240-244 en el segon cas.

#### 6.2.1.3.3. *Experiments d'inhibició per ciclopropens*

Novament, els experiments van ser realitzats *in vitro*, en plaques de poliestirè de 96 pous de fons rodó. En aquest estudi, cada pou s'omple amb 5 µL de medi d'incubació Grace que conté el substrat marcat (0.5 µg/µL, 2.07 mM) i el ciclopropè corresponent a les dosis indicades. Les glàndules feromonals de *S. littoralis* són separades i submergides en cada pou amb medi d'incubació. Després de 3 h a 25°C, aquestes es recullen, s'extreuen els lípids i els extractes es metanolitzen tal com es detalla en apartats posteriors per tal d'obtenir els èsters metílics. El medi d'incubació es prepara just abans de començar cada experiment a partir de dissolucions mare de cada àcid en DMSO (10 mg/mL).

#### 6.2.1.3.4. *Experiments amb T. processionea*

Els experiments van ser conduïts *in vivo*, durant la fotofase<sup>[33]</sup>. Les femelles verges de *T. processionea* s'immobilitzen sobre una placa de suro amb l'ajuda d'una peça de gasa i la glàndula feromonal es manté evaginada tot pressionant l'extrem de l'abdomen amb unes agulles entomològiques. Sobre el teixit glandular, s'aplica tòpicament una dissolució en DMSO de cada àcid utilitzat (0,1 µL, d'una solució 10 µg/µL). En total s'aplica una dosi de 4 µg (0,4 µL) de substrat en quatre incubacions diferents separades cadascuna 60 min. Una hora després de la darrera aplicació s'injecta, si s'escau, una solució de PBAN (Bachem/Peninsula Laboratories, San Carlos, CA) en medi salí Meyer & Miller (188 mM NaCl, 20 mM KCl, 9 mM CaCl<sub>2</sub> i 1 mM MgSO<sub>4</sub>) i les glàndules es disseccionen 2 h després, s'extreuen els lípids glandulars i els extractes així obtinguts s'analitzen per CG-EM o bé es realitza la metanolisi, si és necessària, abans de procedir a l'anàlisi.

#### 6.2.1.4. *Obtenció d'extractes*

L'extracció de feromona es realitza tot submergint les glàndules en hexà (25-50 µL/glàndula) a 25°C durant 1 h. Els lípids s'extreuen amb 1 mL d'una barreja de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1, v/v) a 25°C durant 2 h.

En el cas d'haver d'afegir un patró intern (10 µL d'una solució d'acetat de dodecil, 10 ng/µL), aquest s'afegeix just abans d'extreure la fase orgànica i transferir-la a un vial cònic.

### 6.2.1.5. *Microreaccions*

#### 6.2.1.5.1. *Metanolisi*

Els extractes lipídics es tracten amb 100 µL d'una solució 0,5 M de KOH en MeOH. Després de 30 min a ta, s'acidifica amb un volum igual de HCl 1 M i la fase aquosa s'extreu amb 100 µL d'hexà. La fase orgànica es traspasa a un vial cònic mitjançant una pipeta Pasteur i l'extracte orgànic es guarda a -80°C fins el moment d'efectuar l'anàlisi.

En el cas d'haver d'afegir un patró intern (10 µL d'una solució de pentadecanoat de metil, 10 ng/µL), aquest s'afegeix just abans d'extreure la fase orgànica i transferir-la a un vial cònic.

#### 6.2.1.5.2. *Esterificació amb BF<sub>3</sub>·CH<sub>3</sub>OH*

Sobre 1 mg de l'àcid a esterificar s'addicionen 30 µL de solució de BF<sub>3</sub>·MeOH. Es deixa en reacció durant 1 h a ta, s'evapora el solvent, s'afegeixen 2 mL d'hexà i es procedeix a l'anàlisi per CG-EM.

#### 6.2.1.5.3. *Derivatització d'olefines amb disulfur de dimetil (DMDS)*

Sobre 20 µL d'un extracte hexànic d'èsters metílics s'addicionen 50 µL de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub> i 10 µL d'una solució etèrea de I<sub>2</sub> (60 mg/mL). La solució es protegeix de la llum i s'escalfa a 45-50°C durant 36-48 h. Es refreda, s'afegeixen 20 µL d'hexà, solució aquosa saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> fins a descoloració del iode inicial i s'elimina la fase aquosa. Es renta de nou amb H<sub>2</sub>O, es separa la fase orgànica i l'extracte es guarda a -80°C fins el moment d'efectuar l'anàlisi.

#### 6.2.1.5.4. *Derivatització de diens conjugats amb 4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-diona (MTAD)*

Sobre 10 µL d'un extracte orgànic d'èsters metílics s'addicionen 2,5 µL d'una solució de MTAD en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,2 mg/mL) acabada de preparar. S'agita suaument, s'evapora el dissolvent fins a obtenir 2 µL de solució i s'analitza per CG-EM.

#### 6.2.1.5.5. *Anàlisi instrumental*

Les anàlisis per CG-EM s'han realitzat en un cromatògraf de gasos Fisons MD 8000 acoblat a un detector selectiu de masses Fisons MD-800 amb analitzador quadrupolar, tot utilitzant una columna HP-1 de 30 m x 0,25 µm x 0,20 mm d.i. i heli com a gas portador, o bé en un espectròmetre de masses Trace MS ThermoQuest amb

analitzador de tipus quadrupol acoblat a un cromatògraf de gasos amb la mateixa columna descrita anteriorment. El mode d'ionització és per impacte electrònic.

Es van seguir els següents programes de temperatures: de 60°C a 200°C a 5°C/min i després fins a 300°C a 10°C/min, tot romanent a aquesta temperatura 10 min (anàlisi dels èsters metílics); o bé de 60°C a 200°C a 5°C/min i després fins a 300°C a 10°C/min, tot romanent a aquesta temperatura 20 min (anàlisi d'adductes de DMDS i MTAD). La temperatura de la font era de 200°C, la de l'injector, de 250°C i la del *transfer*, de 250°C. En la injecció de la mostra la vàlvula *split* restà tancada durant 48 segons. Els ions seleccionats en les anàlisis que es feren per adquisició selectiva d'ions s'especifiquen a la memòria per a cada cas concret.

#### **6.2.1.6. Anàlisi estadística dels resultats**

En tots els experiments els resultats s'expressen com la mitjana  $\pm$  error estàndard. Aquest error es calcula com  $\sigma/\sqrt{n}$ , on  $\sigma$  és la desviació estàndard i  $n$ , el nombre de rèpliques. L'existència de diferències significatives entre dues mitjanes es determinà pel test *t* de Student ( $p > 0,05$ ).

## 6.3. BIOLOGIA MOLECULAR

### 6.3.1. Dades generals

Les soques de llevat utilitzades en aquesta memòria van ser subministrades pel Dr Charles E. Martin (Rutgers University, NJ, USA) o bé es van comprar a través del servei *Euroscarf* (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>).

Tot el material de vidre, plàstic, reactius, dissolvents, dissolucions, etc, utilitzats en els experiments de clonatge foren esterilitzats mitjançant l'autoclau (Autester Mod. 437-G, P-Selecta) durant 20 min a 120°C i 2 atm excepte pels casos indicats, on es va utilitzar un filtre de 0,22 µm (Millex<sup>®</sup>-GS Millipore).

Els assaigs funcionals realitzats amb el plasmidi pYES2 es realitzen a l'interior d'una cambra de flux laminar per tal d'evitar contaminacions bacterianes.

Les reaccions de PCR van ser realitzades en un termociclador PTC-100™ Programmable thermal controller, MJ-Research, Inc. o en un aparell Techne Genics. Les reaccions corresponents a la PCR colonial foren realitzades en un RapidCycles, Idaho Technology (IT). Les incubacions de bacteris *E. coli*, es van fer en una incubadora New Brunswick Scientific, Classic series 524 Incubator shaker, Edison, WJ, USA a 37°C. Les incubacions amb llevat *S. cerevisiae* es van realitzar en una incubadora Infors AG, CH-4103 (Bottmingen) a temperatura variable (18-30°C). Les seqüències es van obtenir mitjançant un equip ABI system. Les electroforesis es van realitzar en un equip Q5-710 Quickscreen (Shelton Scientific) tot utilitzant un tampó TAE (pH=8,3) i un voltatge de 90 V. Els gels foren d'una solució d'agar al 1,2% en tampó TAE (p/v) tot emprant dos tipus de marcadors de DNA, un per fragments petits i un altre per fragments grans (Low i High DNA Mass™ Ladder de la casa Gibco) i una solució de glicerol/blau de bromofenol com a agent de càrrega; es va utilitzar com a solució reveladora una dissolució aquosa de bromur d'etidi (10 mg/mL) i un aparell d'UV Gelstation, CoHU High Performance CCD Carrera.

## 6.3.2. Medis utilitzats

### 6.3.2.1. Medis de cultiu en plaques d'agar

#### 6.3.2.1.1. Plaques de LB

Es dissolen 10 g de peptona, 5 g d'extracte de llevat, 10 g de NaCl i 15 g d'agar en 1 L de H<sub>2</sub>O milliQ. S'esterilitza la mescla, es deixa refredar fins a uns 55°C, s'addicionen 1000 µL de solució aquosa 40 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoïl-β-(D)-galactopiranosid (*X-Gal*), 500 µL d'ampicil·lina (100 mg/mL) i 1200 µL d'una solució 20 mg/mL d'isopropiltiogalactòsid (*IPTG*). Es vessa el contingut en plaques rodones de poliestirè i es permet que solidifiqui. Les plaques es tapen i es guarden a 4°C.

#### 6.3.2.1.2. Plaques de YPD

Es dissolen 10 g d'extracte de llevat, 20 g de peptona i 20 g d'agar en 1 L de H<sub>2</sub>O milliQ. S'esterilitza la mescla i es deixa refredar fins a uns 55°C i s'addicionen 50 mL d'una solució estèril de glucosa al 40%. Es vessa el contingut en plaques rodones de poliestirè i es permet que solidifiqui. Les plaques es tapen i es guarden a 4°C.

Si es volen obtenir plaques de YPD que contenen àcids grassos, un cop se li ha afegit la glucosa, s'addicionen 40 mL d'una solució estèril de tergitol NP-40 al 25% (p/v) i 250 µL d'una solució etanòlica d'àcid oleic (1 M) i 250 µL d'una solució etanòlica d'àcid palmitoleic (1 M). Es vessa el contingut en plaques rodones de poliestirè i es permet que solidifiqui. Les plaques es tapen i es guarden a 4°C.

#### 6.3.2.1.3. Plaques de SD

Es dissolen 340 mg de YNB, 1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 4 g d'agar en 200 mL de H<sub>2</sub>O milliQ. S'esterilitza la mescla, es deixa refredar fins a uns 55°C i s'addicionen 10 mL d'una solució estèril de glucosa al 40%, 400 µL d'una solució de sulfat d'adenina al 0,5% (esterilitzada per filtració), 200 µL d'una solució de triptòfan a l'1% (esterilitzada per filtració), 2 mL d'una solució estèril de CAS aminoàcids (BioScience) al 10%, 8 mL d'una solució estèril de tergitol NP-40 al 25% i 110 µL d'una solució etanòlica d'àcid oleic (1 M) i 110 µL d'una solució etanòlica d'àcid palmitoleic (1 M). Es vessa el contingut en plaques rodones de poliestirè i es permet que solidifiqui. Les plaques es tapen i es guarden a 4°C.



### **6.3.2.2. Medis de cultiu líquids**

#### **6.3.2.2.1. Medi LB**

El protocol és el mateix que per a la formació de plaques, però sense afegir agar. Les ampolles de vidre es guarden a 4°C.

#### **6.3.2.2.2. Medi YPD**

El protocol és el mateix que per a la formació de plaques YPD (amb i sense àcids grassos), però sense afegir agar. En el cas d'utilitzar àcids grassos, s'afegeixen a partir de solucions etanòliques 1 M. Aquests s'addicionen just en el moment de realitzar l'experiment.

#### **6.3.2.2.3. Medi SOS**

Es prepara una dissolució 1 M en sorbitol, 6,5 mM en CaCl<sub>2</sub>, 0,25% (p/v) en extracte de llevat i 0,5% (p/v) en peptona. Un cop s'obté una solució homogènia, s'esterilitza per filtració i es guarda a 4°C.

#### **6.3.2.2.4. Medi SD**

El protocol és el mateix que per a la formació de plaques, però sense afegir agar. Les ampolles de vidre es mantenen a 4°C.

#### **6.3.2.2.5. Medi inductiu SD amb galactosa**

Es dissolen 340 mg de YNB i 1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 200 mL de H<sub>2</sub>O milliQ. S'esterilitza la mescla, es deixa refredar fins a uns 55°C i s'addicionen els següents components estèrils: 20 mL d'una solució de galactosa al 20% (esterilitzada per filtració), 400 µL d'una solució de sulfat d'adenina al 0,5% (esterilitzada per filtració), 200 µL d'una solució de triptòfan a l'1% (esterilitzada per filtració), 2 mL d'una solució de CAS aminoàcids al 10%, 8 mL d'una solució de tergitol NP-40 al 25% i 110 µL d'una solució etanòlica (1 M) dels àcids necessaris per a cada assaig. Aquest medi es prepara immediatament abans d'utilitzar-lo.

### **6.3.3. Clonatge de les diferents dessaturases**

#### **6.3.3.1. Aïllament i purificació del MRNA**

Es segueix el protocol per a purificar mRNA descrit al kit “Poly(A) pure™ & Micropoly(A) pure™ mRNA isolation” d’Ambion, tot utilitzant 200 glàndules feromonals i aproximadament 0,5 mL de cos gras.

#### **6.3.3.2. Construcció de les dues biblioteques de cDNA**

En aquest cas, 3 µL de dissolució de cadascun dels mRNA aïllats (glàndula i cos gras) van ser utilitzats com a motlles per a la transcriptasa inversa a l’hora de construir les dues biblioteques de cDNA (3’RACE i 5’RACE) segons el protocol descrit al kit GeneRacer™ d’Invitrogen.

#### **6.3.3.3. Unió dels diferents fragments de DNA als vectors PCR™ 4-TOPO, YEpOLEX i pYES2**

Cadascun dels productes de PCR amplificats amb els *primers* degenerats i amb els *primers* específics dissenyats per a obtenir l’ORF, van ser units al vector PCR™ 4-TOPO d’Invitrogen (kit TOPO TA Cloning)

En el cas d’emprar els vectors YEpOLEX i pYES2, el procediment és tal com es detalla: el fragment d’ORF amplificat per PCR es purifica tot seguint el protocol recomanat en el kit QIAquick PCR Purification de QIAGEN. Aquesta seqüència de DNA es digereix amb els dos enzims de restricció *Xba*I o *Sac*I d’una forma seqüencial (tal com s’explicarà més endavant), tot purificant la mescla de reacció abans de realitzar la següent digestió per mitjà del kit MiniElute Reaction Cleanup de QIAGEN i segons es detalla en el protocol. Finalment, es determina la concentració de DNA per mitjà d’un gel d’electroforesi.

El vector emprat també es digereix i es purifica per electroforesi, tot tallant la banda corresponent amb una ganiveta afilada i purificant-la per mitjà del kit Quantum Prep Gel Slice de BioRad, seguint les especificacions recomenades. Es quantifica la concentració per mitjà d’un gel d’electroforesi.

Un cop es disposa tant del vector com del producte de PCR purificats i digerits es realitza la reacció utilitzant l’enzim T4 (Gibco) tot atenent a la relació estequiomètrica que existeix entre el fragment de PCR (al voltant d’1 kb) i el vector (entre 6 i 7 kb) i emprant un excés de producte de PCR 10 cops superior al del vector. Per exemple, si la concentració del fragment de DNA és de 8 ng/µL i la del plasmidi YEpOLEX és de 7

ng/ $\mu$ L, la unió es realitza tot utilitzant 2  $\mu$ L de vector, 4  $\mu$ L de producte de PCR, 10  $\mu$ L de tampó, 1  $\mu$ L d'enzim T4 i 3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. La incubació es realitza a 25°C durant 30 min i transcorregut aquest temps, es procedeix a la transformació de bacteris d'*E. coli*.

#### 6.3.3.4. *Selecció de les colònies positives: PCR colonial*

La PCR colonial es realitza tal com segueix: per mitjà d'un escuradents estèril, es selecciona una colònia blanca d'*E. coli* i s'introdueix en un tub *ependorf* que conté 1  $\mu$ L de *Taq* polimerasa (Promega), 2  $\mu$ L dels *primers* GeneRacer<sup>®</sup> (Invitrogen), 1  $\mu$ L de dNTP, 1  $\mu$ L de tampó, 1  $\mu$ L de Ficoll i 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, tot imprimint un moviment giratori a l'escuradents per tal de trencar les cèl·lules. Amb el mateix escuradents, es pren una altra part de la mateixa colònia i es transfereix a una altra placa de LB, tot incubant a 37°C durant 16 h més. La PCR colonial consta del següent programa de temperatures: 94°C (1 min); 30 cicles de 94°C (0 min), 58°C (0 min), 72°C (30 s); i 72°C (1 min).

En el cas de realitzar la PCR colonial sobre els cultius cel·lulars de plasmidis que contenen els diferents ORFs, es substitueixen els *primers* GeneRacer<sup>®</sup> pels *primers* específics dissenyats per amplificar aquests fragments. A més a més, el programa de temperatures és 94°C (1 min); 30 cicles de 94°C (30 s), T<sub>h</sub> (30 s), 72°C (60 s); i 72°C (2 min), tot utilitzant com a temperatura d'hibridació (T<sub>h</sub>) la mateixa temperatura emprada en l'amplificació de l'ORF corresponent per PCR.

#### 6.3.3.5. *Purificació dels plasmidis*

Un cop s'han seleccionat les colònies positives i aquestes ja han tornat a créixer en una nova placa de LB, mitjançant una anella de platí (esterilitzada al bec Bunsen) es prenen les noves colònies i s'inoculen en 5 mL de solució LB amb ampicil·lina tot permetent el creixement durant 24 h a 37°C amb una agitació de 265 rpm.

Quan ja hi ha hagut creixement es procedeix a la purificació dels plasmidis, tot seguint el protocol detallat al kit Quantum Prep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep de BIO-RAD, obtenint-se 75  $\mu$ L de solució aquosa d'aquests plasmidis.

#### 6.3.3.6. *Digestió de les mostres de DNA mitjançant enzims de restricció*

Les reaccions portades a terme amb les endonucleases de restricció, en concret amb els enzims *EcoRI*, *XbaI* i *SacI* (Promega), es van realitzar seguint les indicacions del fabricant tot prenent 2  $\mu$ L de cada plasmidi, 2  $\mu$ L del tampó corresponent, 2  $\mu$ L de BSA acetilada, 0,5  $\mu$ L de l'enzim de restricció i 13,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

Pel cas de la digestió de fragments de DNA procedents d'una reacció de PCR (com en el cas d'unir el fragment d'ORF als vectors YEpOLEX o pYES2) es prenen 30 µL de solució de DNA, 4 µL del tampó corresponent, 4 µL de BSA acetilada i 2 µL de l'enzim adequat.

Els temps d'incubació a 37°C varien segons l'enzim utilitzat i estan tabulats als protocols corresponents.

#### **6.3.3.7. Reaccions de PCR**

Les diferents seqüències d'interès, tant de glàndula feromonal com de cos gras, es van amplificar mitjançant la reacció de PCR tot utilitzant els diferents *primers* dissenyats (Taula 2.2, pàgina 117) i la *Taq* polimerasa com a enzim (HotStarTaq™ Master Mix kit de QIAGEN).

##### **6.3.3.7.1. Amplificacions de les diferents regions centrals**

Una reacció estàndard conté 25 µL de HotStarTaq™ mix (QIAGEN), 0,5 µM de cada parella de *primers* per separat (PR3+PR4, PR5+PR6 o PR9+PR10) i 5 µL de la biblioteca de cDNA escollida (3'RACE o 5'RACE), en un volum total de reacció de 50 µL. La PCR va ser realitzada sota les següents condicions:

1. 95°C de temperatura de desnaturalització, 15 min.
2. 33 cicles de 95°C, 30 s; temperatura d'hibridació adequada, 30 s; i 72°C, 3 min.
3. 72°C de temperatura final d'extensió, 10 min.

Les diferents temperatures d'hibridació van ser les següents: pel cas del cos gras, tot utilitzant els *primers* PR5+PR6, la temperatura va ser de 50°C. Pel cas d'utilitzar la biblioteca construïda per a la glàndula, les temperatures foren: 45°C pels *primers* PR3+PR4 i PR9+PR10; i 50°C pels *primers* PR5+PR6.

##### **6.3.3.7.2. Obtenció dels diferents ORFs**

Una reacció estàndard conté 25 µL de HotStarTaq™ mix (QIAGEN), 5 µL del *primer* específic, 1 µL del primer GeneRace®, 5 µL de la biblioteca de cDNA escollida (3'RACE o 5'RACE) i 14 µL d'aigua en un volum total de reacció de 50 µL. La PCR va ser realitzada sota les següents condicions:

1. 95°C de temperatura de desnaturalització, 15 min.
2. 30 cicles de 95°C, 30 s; temperatura d'hibridació adequada, 30 s; i 72°C, 3 min.
3. 72°C de temperatura final d'extensió, 10 min.

Les diferents temperatures d'hibridació van ser les següents:

Per obtenir SLF-ORF: 57°C quan s'utilitza la biblioteca 3'RACE (amb els *primers* SLF-Z9-3'-1 i GR-3'-P) i 58°C tot utilitzant els *nested primers* (SLF-Z9-3'-2 i GR-3'-NP). Quan s'utilitza la biblioteca 5'RACE, 57°C (amb els *primers* SLF-Z9-5'-1 i GR-5'-P) i 58°C tot utilitzant els *nested primers* (SLF-Z9-5'-2 i GR-5'-NP).

Per obtenir SLG-ORF5: 52°C quan s'utilitza la biblioteca 3'RACE (amb els *primers* SLG-CR5-3'-1 i GR-3'-P) i 58°C tot utilitzant els *nested primers* (SLG-CR5-3'-2 i GR-3'-NP). Quan s'utilitza la biblioteca 5'RACE, 58°C (amb els *primers* SLG-CR5-5'-1 i GR-5'-P) i 60°C tot utilitzant els *nested primers* (SLG-CR5-5'-2 i GR-5'-NP).

Per obtenir SLG-ORF4: 60°C quan s'utilitza la biblioteca 3'RACE (amb els *primers* SLG-CR4-3'-1 i GR-3'-P) i 60°C tot utilitzant els *nested primers* (SLG-CR4-3'-2 i GR-3'-NP). Quan s'utilitza la biblioteca 5'RACE, 60°C (amb els *primers* SLG-CR4-5'-1 i GR-5'-P) i 60°C tot utilitzant els *nested primers* (SLG-CR4-5'-2 i GR-5'-NP).

Per obtenir SLG-ORF22: 60°C quan s'utilitza la biblioteca 3'RACE (amb els *primers* SLG-CR5-3'-1 i GR-3'-P) i 60°C tot utilitzant els *nested primers* (SLG-CR5-3'-2 i GR-3'-NP). Quan s'utilitza la biblioteca 5'RACE, 57°C (amb els *primers* SLG-CR5-5'-1 i GR-5'-P) i 54°C tot utilitzant els *nested primers* (SLG-CR5-5'-2 i GR-5'-NP).

#### 6.3.3.7.3. *Amplificació dels diferents ORFs*

En aquest cas, les condicions van ser:

1. 95°C de temperatura de desnaturalització, 15 min.
2. 30 cicles de 95°C, 30 s; temperatura d'hibridació adequada, 30 s; i 72°C, 3 min.
3. 72°C de temperatura final d'extensió, 10 min.

Les diferents temperatures d'hibridació van ser les següents:

Per tal d'amplificar el SLF-ORF, tot utilitzant els *primers* SLF-5'-ORF-4 i SLF-3'-ORF-2 la temperatura d'hibridació va ser de 60°C.

Per tal d'amplificar el SLG-ORF5, tot utilitzant els *primers* SLG-5'-ORF5 i SLG-3'-ORF5 la temperatura d'hibridació va ser de 57°C.

Per tal d'amplificar el SLG-ORF4, tot utilitzant els *primers* SLG-5'-ORF4-1 i SLG-3'-ORF4-1 (en el cas d'emprar el vector YEpOLEX) la temperatura d'hibridació va ser de 60°C; si s'utilitzen els *primers* SLG-5'-ORF4-3 i SLG-3'-ORF4-2 (en el cas d'emprar el vector pYES2) la temperatura d'hibridació va ser de 61°C.

Per tal d'amplificar el SLG-ORF22, tot utilitzant els *primers* SLG-5'-ORF22 i SLG-3'-ORF22 la temperatura d'hibridació va ser de 57°C.

#### **6.3.3.8. Transformació de cèl·lules d'*E. coli* i de *S. cerevisiae***

El vector PCR™ 4-TOPO va ser utilitzat per transformar cèl·lules competents de *E. coli* pertanyents a la soca JM109, tot seguint les indicacions del fabricant. Un cop les cèl·lules van ser transformades, s'afegeixen 250 µL de medi de cultiu SOC (Sigma-Aldrich) i s'incuba a 37°C durant 1 h (agitació a 200 rpm). Finalment, es sembren dues plaques de medi LB (150 µL en una i 100 µL en l'altra), s'inverteix la placa i s'incuba a 37°C durant 16 h.

Les cèl·lules de llevat de *S. cerevisiae* (L8-14C o ΔElo1) competents (tractament amb acetat de liti i de cesi segons el procediment descrit al kit Alkali-Cation yeast transformation de BIO 101) van ser transformades amb 0,5-1 µg de cada plasmidi YEpOLEX o pYES2 que porten unit cadascun dels fragments d'ORFs trobats, seguint el protocol detallat al manual de BIO 101. Sobre aquestes cèl·lules transformades s'afegeixen 200 µL de medi SOS i es sembren plaques de YPD (amb i sense àcids grassos) en el cas d'utilitzar el vector YEpOLEX i plaques de SD si s'ha utilitzat el vector pYES2. Les plaques de YPD s'incuben durant 24 h a 30°C mentre que les de SD s'incuben durant 72 h, a 30°C.

#### **6.3.4. Assaigs funcionals**

##### **6.3.4.1. Incubacions de *S. cerevisiae* amb plasmidis YEpOLEX**

Es disposa de colònies que han crescut en plaques de YPD en presència o absència dels àcids oleic i palmitoleic. Si no es requereix l'addició d'àcids grassos exògens, amb cada colònia de llevat transformat s'inoculen 50 mL de medi YPD i el

cultiu es fa créixer a 30°C durant 24 h mantenint l'agitació a 300 rpm. Si és necessari afegir àcids grassos al medi de cultiu, el procediment és el mateix, però s'utilitza un medi YPD que conté tergitol a l'1% i els àcids grassos adequats a una concentració final de 0,5 mM.

#### **6.3.4.2. Incubacions de *S. cerevisiae* amb plasmidis *pYES2***

En aquest cas, es disposa de colònies que han crescut en plaques de SD en presència dels àcids oleic i palmitoleic. S'inocula cada colònia en 2 mL de medi SD amb glucosa, tergitol (1%) i àcids oleic i palmitoleic (0,5 mM) i el cultiu es fa créixer a 30°C durant 48 h en agitació a 300 rpm. El medi es centrifuga a 3000 rpm durant 5 min, el sobrenedant es descarta i les cèl·lules es resuspenen en 1 mL de medi inductiu SD amb galactosa acabada de preparar. Es repeteix l'operació 2 cops més, les cèl·lules es resuspenen en 500 µL de medi inductiu i s'inoculen 15 mL del mateix medi al que s'hauran afegit els àcids grassos adequats a cada assaig (0,5 mM). Si no s'especifica res més, s'incuba durant 72 h a 26°C fins a obtenir una OD<sub>600</sub> pròxima a 1.

#### **6.3.4.3. Incubacions amb les soques salvatges (*W303a*, *NCS*) i mutada (*ΔElo1*)**

En aquests experiments, cada soca es fa créixer en plaques de YPD a 30°C durant 48 h. En experiments a petita escala, cada colònia s'inocula en 2 mL de medi YPD al que s'han afegit els àcids grassos d'interès a una concentració final de 0,5 mM i tergitol (1%). Es permet créixer a 30°C durant 16 h en agitació a 200 rpm. En assaigs a més gran escala, els inòculs es realitzen en 50 mL de medi YPD i es segueix el mateix procediment.

En els estudis d'obtenció d'àcid linolenic conjugat (CLA) a partir d'àcid vaccènic a través d'un procés en discontinu, el procediment experimental és el següent: cada colònia s'inocula en 2 mL de medi YPD (cultiu control) o 2 mL de medi YPD amb àcid vaccènic (0,5 mM) i tergitol (1%). S'agita (200 rpm) a 30°C durant 24 h, la suspensió es centrifuga i sobre el sobrenedant, transferit a un tub nou, s'afegeixen 500 µL del cultiu control. S'incuba a 30°C durant 24 h a 200 rpm i es repeteix la mateixa seqüència cada 24 h. Les cèl·lules resultants de cada centrifugació es tracten tal com s'indica en l'apartat següent.

#### **6.3.4.4. Preparació d'extractes i anàlisi instrumental**

Sobre els precipitats de les cèl·lules, rentades extensivament amb H<sub>2</sub>O milliQ (3 x 1 mL, 3000 rpm/5 min), s'afegeix 1 mL d'una mescla CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v) i s'agita durant 2 h. Passat aquest temps, es centrifuga a 13200 rpm durant 12 s i es transfereix el sobrenedant a un vial de 3 mL. S'evapora el solvent amb una corrent de nitrogen i es realitza la metanolisi seguint el procediment habitual, tot afegint, si cal, un patró intern. Sobre els extractes metanolitzats es realitzen les derivatitzacions oportunes, ja sigui amb DMDS o MTAD. Les mostres es concentren (corrent de nitrogen) fins a 20 µL i 1 µL s'analitza per CG-EM.



## **7. CONCLUSIONS**



## 7. CONCLUSIONS

### CAPÍTOL 1

1. Els resultats obtinguts tant en la determinació de les KIEs en experiments competitius com en la determinació de l'estereoespecificitat de la 1,4-dessaturasa, demostren que l'abstracció de l'àtom d'hidrogen en C10, però no l'eliminació de l'àtom d'hidrogen en C13, és sensible a la substitució per deuteri. Aquests resultats són consistents amb la hipòtesi segons la qual la reacció de dessaturació en 1,4 implica una primera etapa lenta, que consisteix en l'abstracció de l'hidrogen *pro*-(R) de la posició C10, amb la formació d'un intermedi al·lílic inestable de vida mitja molt curta, el qual col·lapsa en el corresponent diè mitjançant l'eliminació ràpida de l'hidrogen *pro*-(R) de la posició C13 seguit d'una reorganització concomitant del doble enllaç inicial. Contrastant amb tots els casos descrits a la literatura, la 1,4-dessaturasa estudiada en aquest treball constitueix el primer exemple en què una dessaturasa d'estereoespecificitat *pro*-(R)/*pro*-(R) condueix a insaturacions de configuració *E*. La geometria (*E,E*) del producte de dessaturació ve determinada per la relació *sin* que adopten els dos hidrògens *pro*-(R) del substrat olefínic en el lloc actiu de l'enzim.
2. Els àcids 3-tiatetradecanoic (**38**) i 3-oxatetradecanoic (**39**) no són dessaturats en C11 per la  $\Delta$ 11 dessaturasa de *S. littoralis* quan s'incuben amb el teixit glandular. Aquests resultats poden explicar-se tot considerant que els substrats naturals de l'enzim, els àcids palmític i mirístic, que es troben a les membranes cel·lulars, presenten una afinitat molt superior per la  $\Delta$ 11 dessaturasa que la dels derivats sintetitzats, els quals no poden competir amb els substrats naturals per la unió amb l'enzim. La baixa afinitat pot ser deguda a una interacció poc favorable entre els

àtoms de sofre i oxigen i algun residu aminoacídic present al canal hidrofòbic de l'enzim que allotja el substrat.

3. Tots els compostos ciclopropènics investigats, **73-78**, inhibeixen de forma molt efectiva i amb potències similars, totes les dessaturases de *S. littoralis*. Els efectes dels compostos amb els anells en 10, 11 i 12 sobre la  $\Delta 11$  desaturasa eren d'esperar considerant la hipòtesi de Fogerty. Pel que fa als efectes inhibidors de la  $\Delta 9$  dessaturasa, és raonable proposar que la dessaturació de l'àcid (*E*)-11-tetradecenoic al corresponent diè s'inhibeix pels compostos **73-78**, que podrien interferir amb el reconeixement del doble enllaç del substrat per l'enzim. Finalment, l'efecte inhibidor de **73-78** sobre la 1,4-dessaturasa no té precedents a la literatura, però assumint un tipus d'inhibició com el de les 1,2-dessaturases, també en aquest cas s'acompleix la norma de Fogerty. Per tant, cap dels ciclopropens preparats permet diferenciar entre les diferents activitats dessaturasa operatives en la glàndula feromonal de *S. littoralis*.
4. L'efecte inhibidor demostrat amb els alcohols **73-75** indica que no és necessària la formació d'un èster de CoA de l'àcid gras ciclopropènic per tal que aquests actuïn com a inhibidor, tal com s'havia establert. Les diferents activitats inhibidores entre l'alcohol **73** i l'èter **83** suggereixen que l'efecte inhibidor requereix la formació d'un enllaç per ponts d'hidrogen entre l'extrem funcionalitzat de l'inhibidor i la dessaturasa, tot actuant l'inhibidor com a donador. A més, la preparació d'aquests alcohols procedeix amb un rendiment molt superior a les síntesis descrites anteriorment, ensems de ser més directa.

## CAPÍTOL 2

5. El gen SLG-ORF5 clonat a partir de glàndules feromonals de *S. littoralis* codifica la  $\Delta 11$  dessaturasa d'aquesta espècie. Per expressió heteròloga en *S. cerevisiae* es confirma que la biosíntesi de la feromona sexual presenta una única  $\Delta 11$  dessaturasa que transforma l'àcid palmític en l'àcid (*Z*)-11-hexadecenoic i l'àcid mirístic, en els dos isòmers geomètrics, (*E*) i (*Z*), de l'àcid 11-tetradecenoic. Aquest resultat està d'acord amb la hipòtesi formulada en treballs anteriors en què una única  $\Delta 11$  dessaturasa proporciona un únic isòmer geomètric o tots dos tot depenent de la longitud de la cadena del substrat.

6. Els gens SLF-ORF i SLG-ORF22, clonats a partir de cos gras i glàndules feromonals, respectivament de *S. littoralis*, codifiquen dues  $\Delta 9$  dessaturases les quals difereixen en la proporció d'àcids palmitoleic i oleic que produeixen, que és de 7:3 en el cas de l'enzim glandular, i de 3:2 en la dessaturasa del cos gras. A més, els dos enzims produeixen l'àcid (Z,E)-9,11-tetradecadienoic a partir de l'àcid (E)-11-tetradecenoic i l'àcid (Z)-9-tetradecenoic a partir de l'àcid mirístic. En incubar aquests gens en presència d'una barreja equimolar d'àcids mirístic i (E)-11-tetradecenoic s'obtenen els àcids (Z,E)-9,11-tetradecadienoic i quantitats substancialment inferiors de palmitoleic i oleic, però no l'àcid (Z)-9-tetradecenoic. El mateix resultat, a excepció de la formació de qualsevol diè, s'obté amb l'àcid (Z)-11-tetradecenoic. Per tant, tant l'àcid (E)-11-tetradecenoic com el (Z)-11-tetradecenoic inhibeixen l'activitat de la  $\Delta 9$  dessaturasa sobre l'àcid mirístic. Donat que l'àcid miristoleic present a la glàndula feromonal de *S. littoralis* prové de l'escurçament de la cadena de l'àcid (Z)-11-hexadecenoic, sembla que la presència d'aquests dos àcids inhibeixi la dessaturació en (Z)-9 de l'àcid mirístic. L'absència d'àcid (E)-11-tetradecenoic en el cos gras fa que la  $\Delta 9$  dessaturasa sigui activa sobre l'àcid tetradecanoic en aquestes cèl·lules. Aquest resultat representa el primer exemple fins el moment de l'existència d'una regulació endògena de l'activitat de les dessaturases en glàndules feromonals de lepidòpters. Per altra banda, cap de les dues  $\Delta 9$  dessaturases expressades no va proporcionar l'àcid (E,E)-10,12-tetradecadienoic a partir de l'àcid (Z)-11-tetradecenoic.
7. En les condicions experimentals utilitzades, les cèl·lules mutants de *S. cerevisiae* transformades amb el gen SLG-ORF4 no produeixen l'àcid (E,E)-10,12-tetradecadienoic a partir de l'àcid (Z)-11-tetradecenoic i, per tant, no sembla que aquest gen sigui el precursor de la 1,4-dessaturasa. Tampoc s'obtenen els productes de dessaturació en (Z)-12 dels àcids miristoleic ni oleic i, per tant, no sembla tampoc que codifiqui una  $\Delta 12$  dessaturasa. Els experiments dirigits a identificar la funció del producte del gen SLG-ORF4 es continuen en el nostre laboratori.
8. Considerant els resultats obtinguts tant al Capítol 1 com al Capítol 2 d'aquesta memòria, no es pot assegurar de manera definitiva que la formació dels diens (Z,E)-9,11-14:Acid i (E,E)-10,12-14:Acid estigui catalitzada per una única dessaturasa o, si contràriament, intervenen dues unitats discretes, tot depenent de la configuració del diè de partida.

### CAPÍTOL 3

9. Per incubació de diferents soques del llevat *S. cerevisiae* amb diversos àcids grassos insaturats en (*E*)-11, s'obtenen els corresponents diens (*Z,E*)-9,11 en proporcions que varien segons la soca emprada (W303a, NCS i  $\Delta$ Elo1). Els àcids grassos de geometria *Z* no són substrats de la  $\Delta$ 9 dessaturasa.
10. Per incubació d'una soca  $\Delta$ Elo1 de *S. cerevisiae* amb l'àcid 11-tridecinoic s'obtingué l'àcid (*Z*)-9-tridecen-11-inoic. Aquests resultat suggereix que els àcids grassos acetilènics són substrats de les acil-CoA dessaturases i obre la possibilitat d'accedir a un procediment de síntesi enzimàtica d'enins.
11. L'àcid (*Z,E*)-9,11-octadecadienoic isomèricament pur pot obtenir-se enzimàticament per incubació amb àcid vaccènic de *S. cerevisiae*. Malgrat que la conversió és molt elevada, en alguns casos total, el rendiment de producte final obtingut és encara molt baix, d'un 2% com a màxim tot emprant la soca NCS. L'optimització d'aquest procediment es continua actualment en el nostre laboratori.

### CAPÍTOL 4

12. L'acetat de (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienil, component majoritari de la feromona sexual de la processionària del roure, *T. processionea*, es biosintetitza a partir de l'àcid palmític, per dues dessaturacions consecutives en (*Z*)-11 ( $\Delta$ 11 dessaturasa) i (*Z*)-13 ( $\Delta$ 13 dessaturasa), tot obtenint l'àcid (*Z,Z*)-11,13-hexadecadienoic, el qual és finalment reduït (reductasa) i acetilat (acetiltransferasa) al producte final.
13. La producció de feromona sexual en femelles de *T. processionea* està regulada hormonalment pel PBAN. Possiblement, aquest neuropèptid actua activant la reducció del dienoat a l'alcohol.
14. La glàndula feromonal de la processionària del roure és capaç de dessaturar l'àcid 11-hexadecinoic en (*Z*)-13 per produir l'ení propi de *T. pityocampa*. A més, l'eninoat és transformat en el corresponent acetat, tot demostrant que la  $\Delta$ 13 dessaturasa, la reductasa i l'acetiltransferasa de la glàndula feromonal de la processionària del roure són capaces de transformar els intermedis biosintètics de la processionària del pi en els corresponents acetats. Per tant, la reductasa de *T. processionea* és poc específica envers el substrat i l'absència d'ení en la feromona sexual de la processionària del roure és deguda a la manca d'activitat acetiltransferasa.

Per contra, les femelles de *T. pityocampa* no poden produir la feromona sexual de *T. processionea*, malgrat disposar del precursor adequat a la glàndula feromonal. Per tant, la processionària del pi presenta una reductasa específica del substrat enínic. Així doncs, sembla que la variació fenotípica en l'estructura de la feromona entre la *T. processionea* i la *T. pityocampa* es deu a l'absència de la  $\Delta 11$  acetilenasa en la processionària del roure i a l'existència d'una reductasa altament específica per l'eninoat intermedi en la processionària del pi.

## CAPÍTOL 5

15. La síntesi en fase sòlida de derivats d'acil-CoA mitjançant la reacció de transtioesterificació entre el CoASH i un tioèster ancorat a una resina és, *a priori*, un procediment prometedor que ofereix moltes ventatges respecte als descrits en solució. En aquests moments sembla que, tot i que la reacció aparentment ha funcionat, s'han d'optimitzar molts paràmetres, com el tipus de resina utilitzada, la pròpia reacció de transtioesterificació, etc. A temps d'escriure aquesta Tesi, encara s'està a l'espera dels resultats obtinguts en les anàlisis per HPLC acoblada a espectrometria de masses i de les anàlisis per RMN de  $^1\text{H}$  de 500 MHz.





## **8. BIBLIOGRAFIA**



## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] L. B. Bjostad, W. A. Wolf, W. Roelofs, *Pheromone biochemistry*, Academic Press, New York 1987, p. 77.
- [2] W. L. Roelofs, L. Bjostad, *Bioorg. Chem.* 12 (1984) 279.
- [3] K. Bloch, *Acc. Chem. Res.* 2 (1969) 193.
- [4] R. J. Heath, C. O. Rock, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1833.
- [5] C. D. Stubbs, A. D. Smith, *Biochim. Biophys. Acta* 779 (1984) 89.
- [6] J. Shanklin, E. B. Cahoon, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 611.
- [7] Y. Lindqvist, W. Huang, G. Schneider, J. Shanklin, *EMBO J.* 15 (1996) 4081.
- [8] B. G. Fox, J. Shanklin, J. Ai, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, *Biochemistry* 33 (1994) 12776.
- [9] P. Strittmatter, L. Spatz, C. D., M. J. Rogers, B. Setlow, R. Redline, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4565.
- [10] D. A. Los, N. Murata, *Bioch. Biophys. Acta* 1394 (1998) 3.
- [11] D. K. Bloomfield, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 337.
- [12] P. Sperling, E. Heinz, *Wur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 158.
- [13] M. Fukuchi-Mizutani, M. Mizutani, Y. Tanaka, T. Kusumi, D. Ohta, *Plant Physiol.* 119 (1999) 353.
- [14] J. Nagai, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 4626.
- [15] F. Rodríguez, D. L. Hallahan, J. A. Pickett, F. Camps, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22 (1992) 143.
- [16] J. Shanklin, C. Somerville, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 2510.
- [17] J. Shanklin, C. Achim, H. Schmidt, B. G. Fox, E. Münck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2981.
- [18] W. Liu, H. Jiao, N. C. Murray, M. O'Connor, W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 620.
- [19] P. Sperling, U. Zähringer, E. Heinz, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28590.
- [20] E. B. Cahoon, T. J. Carlson, K. G. Ripp, B. J. Schweiger, G. A. Cook, S. E. Hall, A. J. Kinney, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 12935.
- [21] M. Lee, M. Lenman, A. Banas, M. Bafor, S. Singh, M. Schweizer, R. Nilsson, C. Liljenberg, A. Dahlqvist, P. Gummesson, S. Sjö Dahl, A. Green, S. Stymne, *Science* 280 (1998) 915.
- [22] M. G. Aarts, C. J. Keijzer, W. J. Stiekema, A. Pereira, *Plant Cell.* 7 (1995) 2115.
- [23] L. Shu, J. C. Nesheim, K. Kauffmann, E. Münck, J. D. Lipscomb, L. Que, *Science* 275 (1997) 515.
- [24] E. G. Lund, T. A. Kerr, J. Sakai, W. P. Li, D. W. Russell, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 34316.
- [25] J. E. Stuke, V. M. McDonough, C. E. Martin, *J. Biol. Chem.* 266 (1990) 20144.
- [26] J. Shanklin, E. Whittle, B. G. Fox, *Biochemistry* 33 (1994) 12787.
- [27] K. E. Liu, S. J. Lippard, *Adv. Inorgan. Chem.* 42 (1995) 263.
- [28] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 6295.
- [29] C. E. Linn, M. G. Campbell, W. L. Roelofs, *Science* 237 (1986) 650.
- [30] W. L. Roelofs, *J. Chem. Ecol.* 4 (1978) 685.
- [31] E. Dunkelblum, M. Kehat, S. Gothilf, S. Greenberg, B. Sklarsz, *Phytoparasitica* 10 (1982) 21.
- [32] T. Martínez, G. Fabriàs, F. Camps, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1381.
- [33] I. Navarro, E. Mas, G. Fabriàs, F. Camps, *Bioorg. Med. Chem.* 5 (1997) 1267.
- [34] K. Fritsche, E. Hornung, N. Peitzsch, A. Renz, I. Feussner, *FEBS Lett.* 462 (1999) 249.
- [35] M. L. Wise, J. Rossi, W. H. Gerwick, *Biochemistry* 36 (1997) 2985.

- [36] N. B. Fang, P. Teal, R. E. Doolittle, J. H. Tumlinson, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25 (1995) 39.
- [37] C. Löfstedt, M. Bengtsson, *J. Chem. Ecol.* 14 (1988) 903.
- [38] R. Yamaoka, Y. Taniguchi, K. Hayashita, *Experientia* 4 (1984) 81.
- [39] G. Arsequell, G. Fabriàs, F. Camps, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14 (1990) 47.
- [40] E. Dunkelblum, M. Kehat, *Insect Biochem.* 17 (1987) 877.
- [41] X. Qiu, D. W. Reed, H. Hong, S. L. MacKenzie, P. S. Covello, *Plant Physiol.* 125 (2001) 847.
- [42] D. W. Reed, C. K. Savile, X. Qiu, P. H. Buist, P. S. Covello, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5024.
- [43] C. K. Savile, D. W. Reed, D. Meesapyodsuk, P. S. Covello, P. B. Buist, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* (2001) 1116.
- [44] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 871.
- [45] J. L. Abad, F. Camps, G. Fabriàs, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3279.
- [46] A. Pinilla, F. Camps, G. Fabriàs, *Biochemistry* 38 (1999) 15272.
- [47] S. Skrede, H. N. Sorensen, L. N. Larsen, H. H. Steineger, K. Hovik, O. S. Spydevold, R. Horn, J. Bremer, *Biochim. Biophys. Acta* 1344 (1997) 115.
- [48] G. Fabriàs, L. Gosalbo, J. Quintana, F. Camps, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 1503.
- [49] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, Wiley & Sons, Inc., New York 1999.
- [50] D. Seebach, E. J. Corey, *J. Org. Chem.* 40 (1975) 231.
- [51] C. S. Marvel, F. D. Hager, *Org. Synthesis I* (1941) 248.
- [52] A. P. Krapcho, A. J. Lovey, *Tetrahedron Lett.* 12 (1973) 957.
- [53] A. P. Krapcho, J. F. Weimaster, J. M. Eldridge, E. G. E. J. Jahngen, A. J. Lovey, W. P. Stephens, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 138.
- [54] B. Huang, E. J. Parish, H. D. Miles, *J. Org. Chem.* 39 (1974) 2647.
- [55] R. Aneja, W. M. Hollis, A. P. Davies, G. Eaton, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 4641.
- [56] D. Seebach, N. R. Jones, E. J. Corey, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 300.
- [57] E. J. Corey, B. W. Erickson, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 3553.
- [58] S. N. Huckin, L. Weiler, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 1082.
- [59] E. Wai-Si, D. Prestwitch, *J. Lab. Comp. Rad.* XXV (1988) 627.
- [60] Y. Yoshida, Y. Sakakura, N. Aso, S. Okada, Y. Tanabe, *Tetrahedron* 55 (1999) 2183.
- [61] H. C. Brown, S. Krishnamurthy, *J. Org. Chem.* 54 (1980) .
- [62] J. A. Marshall, A. G. Cleary, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 858.
- [63] J. M. Khurana, P. K. Sahoo, *Synth. Commun.* 22 (1992) 1691.
- [64] M. O. Funk, A. W. Alteneder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 (1983) 937.
- [65] M. D. Rahman, D. L. Ziering, S. J. Mannarelli, K. L. Swartz, D. S. Huang, R. A. Pascal, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 1656.
- [66] P. H. Buist, H. G. Dallmann, R. R. Rymerson, P. M. Seigel, P. Skala, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 435.
- [67] A. Pinilla, E. Mas, F. Camps, G. Fabriàs, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31 (2001) 401.
- [68] P. Wu, H. J. Grav, R. S. Horn, J. Bremer, *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996) 751.
- [69] K. E. Hovik, O. S. Spydevold, J. Bremer, *Biochim. Biophys. Acta* 1349 (1997) 251.
- [70] M. J. Pitt, C. J. Easton, C. J. Moody, A. Ferrante, A. Poulos, D. A. Rathjen, *Synthesis* (1997) .
- [71] R. O. Hutchins, Suchismita, R. E. Zipkin, I. M. Taffer, R. Sivakumar, A. Monaghan, E. M. Elisseou, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 55.
- [72] H. A. Bates, J. Farina, M. Tong, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 2637.
- [73] W. Beckmann, G. Doerjter, E. Logemann, G. Merkel, G. Schill, C. Zürcher, *Synthesis* (1975) 423.
- [74] L. Brandsma, H. D. Verkruisje, *Synthesis of acetylenes, allenes and cumulenes*, Elsevier, New York 1981.
- [75] M. W. Hutzinger, A. C. Oehlschlager, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 4595.
- [76] S. Rodríguez, F. Camps, G. Fabriàs, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8052.
- [77] M. L. Wise, J. Rossi, W. H. Gerwick, *Biochemistry* 33 (1994) 15223.
- [78] S. Rodríguez, G. Hao, W. Liu, B. Piña, G. Fabriàs, F. Camps, W. L. Roelofs, *en preparació* (2003) .
- [79] A. G. McInnes, J. A. Walter, J. L. C. Wright, *Tetrahedron* 39 (1983) 3515.
- [80] L. J. Morris, *Biochem. J.* 118 (1970) 681.
- [81] G. J. Schroepfer, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 54.

- [82] W. Boland, C. Frossl, M. Schottler, M. Toth, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1993) 1155.
- [83] I. Navarro, I. Font, G. Fabriàs, F. Camps, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11335.
- [84] A. Svatos, B. Kalinová, W. Boland, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29 (1999) 225.
- [85] J. L. Abad, F. Camps, G. Fabriàs, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31 (2001) 799.
- [86] P. H. Buist, D. M. Marecak, E. T. Partington, P. Skala, *J. Org. Chem.* 55 (1990) 5667.
- [87] P. H. Buist, D. M. Marecak, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 5073.
- [88] J. L. Abad, G. Fabriàs, F. Camps, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 8582.
- [89] H. L. Holland, H. Popperl, R. W. Ninniss, P. C. Chenchaiiah, *Can. J. Chem.* 63 (1985) 1119.
- [90] K. Soai, S. Yokoyama, K. Ebihara, T. Hayasaka, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 22 (1987) 1690.
- [91] K. Soai, A. Ookawa, T. Kaba, K. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7111.
- [92] K. Soai, S. Yokohama, T. Hayasaka, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 4264.
- [93] H. Takahashi, T. Kawakita, M. Ohno, M. Yoshioka, S. Kobayashi, *Tetrahedron* 48 (1992) 5691.
- [94] D. Seebach, A. K. Beck, R. Imwinkelned, S. Roggo, A. Wonnacott, *Helv. Chim. Acta* 70 (1987) 954.
- [95] S. Saito, T. Kano, K. Katanaka, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* 62 (1997) 5651.
- [96] M. T. Reetz, T. Kuekenhoehner, P. Weinig, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 5711.
- [97] A. S. Demir, I. Mecitoglu, C. Tanyeli, V. Gülbeyaz, *Tetrahedron: Asymmetry* 7 (1996) 3359.
- [98] B. Di Simone, D. Savoia, E. Tagliavini, A. Umani-Ronchi, *Tetrahedron: Asymmetry* 6 (1995) 301.
- [99] P. Delair, C. Einhorn, J. Einhorn, J. L. Luche, *Tetrahedron* 51 (1995) 165.
- [100] G. J. Quallich, T. M. Woodall, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 4145.
- [101] M. F. Grundon, D. G. McCleery, J. W. Wilson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1981) 231.
- [102] P. V. Ramachandran, H. C. Brown, S. Swaminathan, *Tetrahedron: Asymmetry* 1 (1990) 433.
- [103] R. J. D. Evans, S. R. Landor, J. P. Regan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1974) 552.
- [104] T. Oriyama, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* (1984) 2071.
- [105] T. Osawa, *Chem. Lett.* (1985) 1609.
- [106] B. Herradón, S. Valverde, *Tetrahedron: Asymmetry* 5 (1994) 1479.
- [107] F. Molinari, R. Gandolfi, R. Villa, E. Occhiato, *Tetrahedron: Asymmetry* 10 (1999) 3515.
- [108] K. Nakamura, T. Matsuda, T. Itoh, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 5727.
- [109] K. Nakamura, T. Matsuda, *J. Org. Chem.* 63 (1998) 8957.
- [110] T. Matsuda, T. Harada, N. Nabajima, T. Itoh, K. Nakamura, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 157.
- [111] N. S. Clair, W. Y., A. L. Margolin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 381.
- [112] G. Shen, Y. Wang, C. Bradshaw, C. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 9 (1990) 677.
- [113] A. Sharma, A. Pawar, S., S. Chattopadhyay, *Synth. Commun.* 26 (1996) 19.
- [114] I. Izquierdo, M. T. Plaza, M. Rodríguez, J. A. Tamayo, A. Martos, *Tetrahedron: Asymmetry* 12 (2001) 293.
- [115] S. R. Ghorpade, K. B. Bastawade, D. V. Gokhale, P. D. Shinde, V. A. Mahajan, U. R. Kalkote, T. Ravindranathan, *Tetrahedron: Assymetry* 10 (1999) 4115.
- [116] P. Sonnet, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 3477.
- [117] Y. Naoshima, M. Kamezawa, H. Tachibana, Y. Munakata, T. Fujita, K. Kihara, T. Raku, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1993) 557.
- [118] M. Ors, A. Morcuende, M. I. Jiménez-Vacas, S. Valverde, B. Herradón, *Synthetic Lett.* (1996) 449.
- [119] E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *Chem. Rev.* 92 (1992) 1071.
- [120] C. R. Johnson, *Acc. Chem. Res.* 31 (1998) 333.
- [121] G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 2226.
- [122] E. J. Corey, G. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* 5 (1979) 399.
- [123] P. L. Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 2559.
- [124] A. E. J. Nooy, A. C. Besemer, *Tetrahedron* 51 (1995) 8023.
- [125] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 4155.
- [126] A. J. Mancuso, S. L. Huang, D. Swern, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2480.
- [127] C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *Biochim. Biophys. Acta* 1206 (1994) 1.

- [128] T. Ema, S. Maeno, Y. Takaya, T. Sakai, M. Utaka, *Tetrahedron: Asymmetry* 7 (1996) 625.
- [129] T. Gitselen, M. Bauer, P. Adlercreutz, *Biochim. Biophys. Acta* 1345 (1997) 188.
- [130] D. L. Ward, C. K. Rhee, *Tetrahedron Lett.* 32 (1991) 7165.
- [131] S. Rodríguez, P. Clapés, F. Camps, G. Fabriàs, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 2228.
- [132] H. Cook, *Biochemistry of Lipids and Membranes*, The Benjamin Cumming Publishing, Co. Ltd., Menlo Park, CA 1985.
- [133] J. R. Nunn, *J. Chem. Soc.* (1952) 313.
- [134] H. W. Kircher, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41 (1964) 4.
- [135] P. K. Raju, R. Reiser, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 379.
- [136] E. Allen, A. R. Johnson, A. C. Fogerty, J. A. Pearson, F. S. Shenstone, *Lipids* 2 (1967) 419.
- [137] S. V. Pande, J. F. Mead, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1856.
- [138] R. Jeffcoat, *Lipids* 12 (1977) 480.
- [139] A. R. Johnson, A. C. Fogerty, J. A. Pearson, F. S. Shenstone, A. M. Bersten, *Lipids* 4 (1968) 265.
- [140] J. R. Clark, H. W. Kircher, *Lipids* 7 (1972) 769.
- [141] A. C. Fogerty, A. R. Johnson, J. A. Pearson, *Lipids* 7 (1972) 335.
- [142] J. Cao, J. P. Blond, J. Bézard, *Biochim. Biophys. Acta* (1993) 27.
- [143] L. Gosalbo, G. Fabriàs, F. Camps, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26 (1994) 279.
- [144] L. Gosalbo, G. Fabriàs, G. Arsequell, F. Camps, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22 (1992) 687.
- [145] G. Fabriàs, M. Barrot, F. Camps, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25 (1995) 655.
- [146] M. Cano, J. Quintana, L. Julià, F. Camps, J. Joglar, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 5096.
- [147] J. Quintana, M. Barrot, G. Fabriàs, F. Camps, *Tetrahedron* 54 (1998) 10187.
- [148] J. Quintana, *Tesi doctoral*, Universitat de Barcelona, Barcelona 1999.
- [149] L. Gosalbo, M. Barrot, G. Fabriàs, G. Arsequell, F. Camps, *Lipids* 28 (1993) 1125.
- [150] M. Cano, F. Camps, J. Joglar, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 9819.
- [151] J. Al Dulayymi, M. S. Baird, M. J. Simpson, S. Nyman, *Tetrahedron* 52 (1996) 12509.
- [152] A. R. Al Dulayymi, J. Al Dulayymi, M. S. Baird, M. E. Gerrard, G. Koza, S. D. Harkins, E. Roberts, *Tetrahedron* 52 (1996) 3409.
- [153] A. R. Al Dulayymi, M. Baird, *Tetrahedron* 52 (1996) 10955.
- [154] A. T. Stoll, E. Negishi, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 5671.
- [155] M. Barrot, *Tesi doctoral*, Universitat de Barcelona, Barcelona 1995.
- [156] T. Ando, R. Ohno, K. Ikemoto, M. Yamamoto, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3350.
- [157] N. Kamiya, Y. Chikami, Y. Ishii, *Synlett* (1990) 675.
- [158] J. E. Shaw, D. Y. Hsia, G. S. Parries, T. K. Sawyer, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 1017.
- [159] W. N. Smith, O. F. Beumel Jr, *Synthesis* (1974) 441.
- [160] R. Davis, K. G. Untch, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 2987.
- [161] F. Camps, V. Gasol, A. Guerrero, *Synth. Commun.* 18 (1988) 445.
- [162] R. Lespieau, M. Bourguel, *Org. Synthesis I* (1941) 186.
- [163] W. E. Willy, D. R. McKean, B. A. Garcia, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49 (1976) 1989.
- [164] M. D. Jones, B. Nilsson, M. Szelke, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 2286.
- [165] K. Sato, M. Aoki, J. Takagi, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 12386.
- [166] K. Sato, M. Aoki, J. Takagi, K. Zimmermann, R. Noyori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 72 (1999) 2287.
- [167] K. Sato, M. Hyodo, J. Takagi, M. Aoki, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 1439.
- [168] R. A. W. Johnstone, M. E. Rose, *Tetrahedron* 35 (1979) 2169.
- [169] G. Cimino, M. Gavagnin, G. Sodano, A. Spinella, G. Strazzullo, F. J. Schmitz, G. Yalamanchili, *J. Org. Chem.* 52 (1986) 2301.
- [170] B. Pöhl, T. Raichle, S. Ghisla, *Eur. J. Biochem.* 160 (1986) 109.
- [171] H. E. Nordby, B. W. Heywang, H. W. Kircher, A. R. Kemmerer, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39 (1962) 183.
- [172] T. Ando, R. Ohno, K. Ikemoto, Y. Yajima, *J. Pesticide Sci.* 20 (1995) 25.
- [173] H. W. Cook, *Lipids* 14 (1979) 763.
- [174] E. B. Cahoon, Y. Lindqvist, G. Schneider, J. Shanklin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4872.
- [175] M. A. Thiede, P. Strittmatter, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 14459.
- [176] M. A. Thiede, J. Ozols, P. Strittmatter, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13230.

- [177] J. M. Ntambi, S. A. Buhrow, K. H. Kaestner, R. J. Christy, E. Sibley, T. J. Kelly, M. D. Lane, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17291.
- [178] J. E. Stukey, V. M. McDonough, C. E. Martin, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16537.
- [179] P. E. Tiku, A. Y. Gracey, A. I. Macartney, R. J. Beynon, A. R. Crossins, *Science* 271 (1996) 815.
- [180] C. Wicker-Thomas, C. Henriot, R. Dallerac, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27 (1997) 963.
- [181] D. Knipple, C. Rosenfield, S. J. Miller, W. Liu, J. Tang, P. W. K. Ma, W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15287.
- [182] W. Liu, P. W. K. Ma, P. Marsella-Herrick, C. Rosenfield, D. C. Knipple, W. L. Roelofs, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29 (1999) 435.
- [183] G. Hao, W. Liu, M. O'Connor, W. L. Roelofs, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32 (2002) 961.
- [184] C. Rosenfield, K. M. You, P. Marsella-Herrick, W. L. Roelofs, D. C. Knipple, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31 (2001) 949.
- [185] W. Liu, H. Jiao, M. O'Connor, W. L. Roelofs, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32 (2002) 1489.
- [186] G. Hao, M. O'Connor, W. Liu, W. L. Roelofs, *J. Insect Sci. en prensa* (2003) .
- [187] W. L. Roelofs, W. Liu, G. Hao, H. Jiao, A. P. Rooney, C. E. Linn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 13621.
- [188] T. A. Brown, *Gene cloning. An introduction.*, Chapman & Hall, Londres 1990.
- [189] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
- [190] P. Chomczynski, N. Sacchi, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156.
- [191] J. M. Clark, *Nucl. Acids Res.* 20 (1988) 9677.
- [192] D. A. Mead, N. K. Pey, C. Herrnstadt, R. A. Marcil, L. M. Smith, *Biotechnology* 9 (1991) 657.
- [193] D. B. Clewell, J. Doly, *Nucl. Acids Res.* 7 (1979) 1513.
- [194] A. G. Mitchell, C. E. Martin, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29766.
- [195] E. Dunkelblum, S. H. Tan, P. J. Silk, *J. Chem. Ecol.* 11 (1985) 265.
- [196] B. Schmitz, R. A. Klein, *Chem. Phys. Lipids* 39 (1986) 285.
- [197] M. Vincenti, G. Guglielmetti, G. Cassani, C. Tonini, *Anal. Chem.* 59 (1987) 694.
- [198] N. M. Carballeira, F. Shalabi, C. Cruz, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 5575.
- [199] F. C. Griepink, T. A. van Beek, M. A. Posthumus, A. de Groot, *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 411.
- [200] N. M. Carballeira, C. Cruz, *Chem. Phys. Lipids* 84 (1996) 81.
- [201] G. Dobson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 137.
- [202] R. Schneider, V. Tatzler, G. Gogg, E. Leitner, S. D. Kohlwein, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 3655.
- [203] G. Arsequell, G. Fabriàs, F. Camps, *Insect Biochem.* 19 (1989) 623.
- [204] M. M. Mahfouz, A. J. Valicenti, R. T. Holman, *Biochim. Biophys. Acta* 618 (1980) 1.
- [205] R. Chellappa, P. Kandasamy, C. S. Oh, Y. Jiang, M. Vemula, C. E. Martin, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43548.
- [206] Y. Tamaki, H. Noguchi, T. Yushima., *Appl. Entomol. Zool.* 8 (1973) 200.
- [207] R. A. Jurenka, *Cell Mol. Life Sci.* 53 (1997) 501.
- [208] M. Choi, K. S. Han, K. S. Boo, R. A. Jurenka, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32 (2002) 1353.
- [209] M. Renobales, C. Cripps, D. W. Stanley-Samuelson, R. A. Jurenka, G. J. Blomquist, *Trends Biochem. Sci.* 12 (1987) 364.
- [210] Y. L. Ha, N. K. Grimm, M. W. Pariza, *Carcinogenesis* 8 (1987) 1881.
- [211] C. Ip, M. Singh, H. J. Thompson, J. A. Scimeca, *Cancer Res.* 54 (1994) 1212.
- [212] M. W. Pariza, Y. Park, M. E. Cook, *Toxicol. Sci.* 52 (1999) 107.
- [213] K. N. Lee, D. Kritchevsky, M. W. Pariza, *Atherosclerosis* 108 (1994) 19.
- [214] Y. Park, K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook, M. W. Pariza, *Lipids* 32 (1997) 853.
- [215] M. E. Dougan, R. J. L. Aalhus, A. L. Schaefer, J. K. G. Kramer, *Can. J. Anim. Sci.* 77 (1997) 723.
- [216] C. C. Miller, Y. Park, M. W. Pariza, C. M. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198 (1994) 1107.
- [217] P. E. Hughes, W. J. Hunter, S. B. Tove, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 3643.

- [218] N. Sehat, M. P. Yurawecz, J. A. G. Roach, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, Y. Ku, *Lipids* 33 (1998) 217.
- [219] A. Bernas, N. Kumar, P. Mäki-Arvela, E. Laine, B. Holmbom, T. Salmi, D. Y. Murzin, *Chem. Commun.* (2002) 1142.
- [220] C. Chen, C. Sih, *J. Org. Chem.* 63 (1998) 9620.
- [221] C. A. Chen, C. J. Sih, W. Lu, C. J. Sih, *Lipids* 34 (1999) 879.
- [222] M. S. F. Jie, M. K. Pasha, M. S. Alam, *Lipids* 32 (1997) 1041.
- [223] O. Berdeaux, W. W. Christie, F. D. Gunstone, J. L. Sebedio, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1011.
- [224] R. Adlof, *Chem. Phys. Lipids* 88 (1997) 107.
- [225] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver, *Science* 274 (1996) 546.
- [226] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry* 2000.
- [227] S. Servi, *Synthesis* (1990) 1.
- [228] M. Schwartz, R. M. Waters, *Synthesis* (1972) 567.
- [229] O. Jiménez, *Tesi doctoral*, Universitat de Barcelona, Barcelona 2002.
- [230] T. W. Wang, A. S. Lewin, G. M. Small, *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 3495.
- [231] U. Murawski, H. Egge, *J. Chrom. Sci.* 13 (1975) 497.
- [232] B. Frérot, G. Demolin, *Boll. Zool. Agr. Bachic. Ser. II* 25 (1993) 33.
- [233] A. Guerrero, F. Camps, J. Coll, M. Riba, J. Einhorn, C. Descoins, J. Y. Lallemand, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 2013.
- [234] G. Fabriàs, G. Arsequell, F. Camps, *Insect Biochem.* 19 (1989) 177.
- [235] M. Barrot, G. Fabriàs, F. Camps, *Tetrahedron* 50 (1994) 9789.
- [236] C. Quero, E. Malo, G. Fabriàs, F. Camps, P. Lucas, M. Renou, A. Guerrero, *J. Chem. Ecol.* 23 (1997) 713.
- [237] M. Avignon-Tropis, J. R. Pougny, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 4951.
- [238] A. K. Raina, *Annu. Rev. Entomol.* 38 (1993) 329.
- [239] R. A. Jurenka, E. Jacquin, W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 8621.
- [240] J. D. Tang, R. E. Charlton, R. A. Jurenka, W. A. Wolf, P. L. Phelan, L. Sreng, W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1806.
- [241] E. Mas, J. Lloria, C. Quero, F. Camps, G. Fabriàs, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30 (2000) 455.
- [242] N. B. Fang, P. Teal, J. H. Tumlinson, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29 (1995) 35.
- [243] R. A. Ozawa, T. Ando, H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Suzuki, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (1993) 2144.
- [244] P. E. A. Teal, J. H. Tumlinson, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 4 (1987) 261.
- [245] H. J. Bestmann, M. Herrig, A. B. Attygalle, *Experientia* 43 (1987) 1033.
- [246] R. A. Jurenka, W. L. Roelofs, *Insect Biochem.* 19 (1989) 639.
- [247] C. H. Zhao, M. Bengtsson, C. Lofsted, *J. Chem. Ecol.* 21 (1995) 1495.
- [248] P. Sperling, M. Lee, T. Girke, U. Zähringer, S. Stymne, E. Heinz, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 3801.
- [249] G. Villorbina, S. Rodríguez, F. Camps, G. Fabriàs, *Ins. Biochem. Molec. Biol.* 33 (2003) 155.
- [250] D. B. McCormick, L. D. Wright, *Methods Enzymol.* 18A (1970) .
- [251] C. Lee, A. F. Chen, *The pyrimidine nucleotide coenzymes*, Academic Press, New York 1982.
- [252] S. M. Grundy, *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) 24.
- [253] D. R. Sliskovic, A. D. White, *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 194.
- [254] W. V. Shaw, A. G. W. Leslie, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20 (1991) 363.
- [255] N. A. Elshourbagy, J. C. Near, P. J. Kmetz, G. M. Sathe, C. Southan, J. E. Strickler, M. Gross, J. F. Young, T. N. C. Wells, P. H. E. Groot, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1430.
- [256] A. M. Schultz, L. E. Henderson, S. Oroszlan, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 (1988) 611.
- [257] B. C. Wise, J. F. Kuo, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 1259.
- [258] P. S. Tippet, K. E. Neet, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12839.
- [259] W. M. Bortz, F. Lynen, *Biochem. Z.* 337 (1963) 505.
- [260] P. A. Srere, *Biochim. Biophys. Acta* 106 (1965) 445.
- [261] S. V. Pande, M. C. Blanchaner, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 402.
- [262] S. S. Kakar, W. H. Huang, A. Askari, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 42.



- [263] E. A. Lock, A. M. Mitchell, C. R. Elcombe, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29 (1989) 145.
- [264] N. Pfanner, L. Orci, B. S. Glick, M. Amherdt, S. R. Aeden, V. Malhotra, J. E. Rothman, *Cell* 59 (1989) 95.
- [265] S. S. Patel, D. R. Walt, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 7132.
- [266] A. Kornberg, W. E. Prides, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 329.
- [267] U. M. Billhardt, P. Stein, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* 17 (1989) 1.
- [268] D. P. Martin, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7287.
- [269] S. Shimizu, R. Komaki, Y. Tani, H. Yamada, *FEBS Lett.* 151 (1983) 303.
- [270] R. J. Banis, C. S. Roberts, G. B. Stokes, S. B. Tone, *Anal. Biochem.* 73 (1976) 1.
- [271] E. J. Simon, D. Shemin, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 2520.
- [272] M. F. B. Silva, J. P. N. Ruiter, L. Ijlst, P. Allers, H. J. Brink, C. Jakobs, M. Duran, I. Tavares de Almeida, R. J. A. Wanders, *Anal. Biochem.* 290 (2001) 60.
- [273] P. Goldman, P. R. Vagelos, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2620.
- [274] Y. Lapidot, S. Rappoport, Y. Wolman, *J. Lipid Res.* 8 (1967) 142.
- [275] A. Al-Arif, M. Blecher, *J. Lipid Res.* 10 (1969) 344.
- [276] M. Blecher, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 404.
- [277] A. Kawaguchi, T. Yoshimura, S. Okuda, *J. Biochem.* 89 (1981) 337.
- [278] M. Pourfarzam, K. Bartlett, *Methods Enzymol.* 279 (1997) 240.
- [279] W. Seubert, *Biochem. Prep.* 7 (1960) 80.
- [280] L. Gehring, D. Haase, K. Habben, C. Kerkhoff, H. Meyer, V. Kaeffer, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 1118.
- [281] T. Ouyang, D. R. Walt, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 3752.
- [282] T. Wieland, H. Köppe, *Ann. Chem. (Justus Liebigs)* 588 (1954) 15.
- [283] E. R. Stadtman, *Methods of Enzymology* 3 931.
- [284] P. J. Arps, *Methods Enzymol.* 188 (1990) 386.
- [285] E. Duran, H. Duran, L. Cazaux, L. Gorrichon, P. Tisnes, F. Sarni, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1 (1987) 143.
- [286] R. Padmakumar, R. Padmakumar, R. Banerjee, *Methods Enzymol.* 279 (1997) 220.
- [287] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [288] E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 113.
- [289] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 (1996) 17.
- [290] A. Vaino, K. D. Janda, *J. Comb. Chem.* 2 (2000) 579.
- [291] W. Li, B. Yan, *J. Org. Chem.* 63 (1998) 4092.
- [292] B. Yan, *Acc. Chem. Res.* 31 (1998) 621.
- [293] F. Lorgé, A. Wagner, C. Mioskowski, *J. Comb. Chem.* 1 (1999) 25.
- [294] R. Hany, D. Rentsch, B. Dhanapal, D. Obrecht, *J. Comb. Chem.* 3 (2001) 85.
- [295] R. C. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. Ziliox, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 2650.
- [296] B. J. Egner, J. L. Langley, M. Bradley, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 2652.
- [297] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* 34 (1970) 595.
- [298] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70.
- [299] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* 33 (1992) 3077.
- [300] M. Grotli, H. Gotfredsen, J. Rademan, J. Burchardt, A. J. Clark, J. Duus, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* 2 (2000) 108.
- [301] M. Meldal, F. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. Palcic, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 1849.
- [302] M. Meldal, I. Svendsen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1995) 1591.
- [303] M. Meldal, I. Svendsen, K. Breddam, F. Auzanneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 3314.
- [304] J. A. Camarero, G. J. Cotton, A. Adeva, T. W. Muir, *J. Peptide Res.* 51 (1998) 303.
- [305] H. K. Smith, M. Bradley, *J. Comb. Chem.* (1999) .
- [306] Ashish, W. C. Wimley, *Biochemistry* (2001) .
- [307] E. Block, V. Eswarakrishnan, M. Gernon, G. Ofori-Okai, C. Saha, K. Tang, J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 658.
- [308] M. G. Missakian, R. Ketcham, A. R. Martin, *J. Org. Chem.* 39 (1973) 2010.
- [309] Y. Basel, A. Hassner, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 6368.
- [310] F. Houlihan, F. Bouchard, M. J. Fréchet, *Can. J. Chem.* 63 (1985) 153.
- [311] A. McKillop, R. J. K. Taylor, R. J. Watson, N. Lewis, *Synthesis* (1994) 31.
- [312] E. Ponnusamy, U. Fotadar, A. Spisni, D. Fiat, *Synthesis* (1986) 48.

- [313] P. Garner, J. M. Park, *J. Org. Chem.* 52 (1986) 2361.
- [314] F. S. Gibson, S. C. Bergmeier, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* 59 (1994) 3216.
- [315] R. J. Boyce, G. C. Mulqueen, G. Pattenden, *Tetrahedron* 51 (1995) 7321.
- [316] M. A. Kotharé, J. Ohkanda, J. W. Lockman, Y. Qian, M. A. Blaskovich, S. M. Sebti, A. D. Hamilton, *Tetrahedron* 56 (2000) 9833.
- [317] Y. Sugano, J. A. Katzenellenbogen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6 (1996) 361.
- [318] J. C. Noveron, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 3247.
- [319] D. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 2739.
- [320] I. Annis, L. Chen, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 7226.
- [321] J. R. Horton, L. M. Stamp, A. Routledge, *Tetrahedron Lett.* (2000) 9181.
- [322] D. Hudson, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 617.
- [323] O. Kuisle, E. Quiñoá, R. Riguera, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 8063.
- [324] R. M. Lawrence, S. A. Biller, O. M. Fryszman, M. A. Poss, *Synthesis* (1997) 553.
- [325] N. Weber, E. Klein, K. D. Mukherjee, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 1297.
- [326] P. Mayville, G. Ji, R. Beavis, H. Yang, M. Goger, R. P. Novick, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 1248.
- [327] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 4325.
- [328] J. E. Biaglow, J. Donahue, S. Tuttle, K. Held, C. Chrestensen, J. Mieyal, *Anal. Biochem.* 281 (2000) 77.
- [329] G. L. Ellman, K. D. Courtney, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 3102.
- [330] J. P. Badyal, A. M. Cameron, N. R. Cameron, D. M. Coe, R. Cox, B. G. Davis, L. J. Oates, G. Oye, P. G. Steel, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 8531.
- [331] L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 2363.
- [332] L. M. Gayo, M. J. Suto, *Tetrahedron Lett.* 38 (1997) 211.