



DEPT. DE QUÍMICA ANALÍTICA
i QUÍMICA ORGÀNICA
Universitat Rovira i Virgili

**Síntesi estereoselectiva de l'anàleg perfluorat de
l'esfingolípid GT11 amb una estructura central
tipus triazole 1,5-disubstituit**

Treball de fi de grau

Adrià Figueras Boldó

Curs 2020-21

Tutora: Maribel Matheu Malpartida

Agraïments

Voldria començar donant gràcies a la tutora, Maribel Matheu, per totes les explicacions, correccions i suggeriments que ha aportat al llarg de tot aquest treball.

També voldria mostrar un agraïment als companys del grup SINTCARB Albert, Javier, Jordi, Miguel, Isabel, Marc, Álvaro i Paula per l'experiència viscuda, així com una menció especial al Pablo, el company de vitrina que ha aconseguit que m'agradi el jazz i autor dels consells que tant m'han ajudat en la realització d'aquest treball de fi de grau que ara tens a les mans.

Finalment, penso que aquests agraïments no serien complets sense un record a tots els amics que m'han acompanyat al llarg del grau i n'han fet una experiència inoblidable, moltes gràcies!

Índex

Abreviacions i acrònims

Resum	1
1. Introducció	2
1.1. Relació entre els esfingolípid i el càncer	2
1.2. Síntesi <i>de novo</i> : dihidroceramida i Des1	4
1.3. Inhibidors esfingolípid de la Des1 basats en el GT11	6
1.4. Antecedents	7
1.5. Justificació de la molècula objectiu	8
2. Objectiu del treball	10
3. Discussió de resultats	11
4. Part experimental	27
4.1. Mètode general	27
4.2. Procediment de síntesi i caracterització del productes	27
5. Conclusions i treball futur	33
Annexes	35

Abreviacions i acrònims

AcOEt: acetat d'etil

ap: aparent

aq: aquós

Boc: *terc*-butoxicarbonil

BuLi: butil liti

COD: 1,5-cicloctadiè

COSY: de l'anglès "COrrrelation SpectroscopY"

Cp*: 1,2,3,4,5-pentametilciclopentadiè

d: doblet

DCM: diclorometà

dd: doble doblet

Des1: dihidroceramida desaturasa 1

dt: doble triplet

EDC: *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

gem: geminal

HMPA: hexametilfosforotriamida

HOBt: hidroxibenzotriazole

HSQC: de l'anglès "Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy"

IR: infraroig

MeOH: metanol

ppm: part per milió

rds: etapa que determina la velocitat d'un cicle catalític (de l'anglès "Rate Determining Step")

RMN: ressonància magnètica nuclear

s: singlet

SAR: estudis d'estructura-activitat (de l'anglès "Structure-Activity Relationship")

t: triplet

TBAF: fluorur de tetrabutilamoni

THF: tetrahidrofurà

TLC: cromatografia de capa fina (de l'anglès "Thin-Layer Chromatography")

tt: triple triplet

VIH: virus de la immunodeficiència humana

δ : desplaçament químic

Resum

Català

En aquest treball de fi de grau s'explora la síntesi estereoselectiva d'un nou anàleg de la ceramida GT11, l'inhibidor més potent, fins al moment, de l'enzim dihidroceramida desaturasa 1.

Aquest nou anàleg conté un heterocicle aromàtic tipus triazole disubstituint en les posicions 1,5 i una amida amb una cadena perfluorada com a característiques notables, tot mantenint aquells trets estructurals que s'han detectat com a clau a l'hora d'aconseguir la inhibició de l'enzim.

La síntesi plantejada es sustenta en dues etapes clau: una addició estereoselectiva a l'aldehid de Garner i la formació d'un grup triazole 1,5-disubstituint mitjançant una cicloadició azida-alquí amb la particularitat de l'ús d'un catalitzador de ruteni.

Tot i les dificultats a l'hora de dur a terme la caracterització del producte final, la informació que s'ha pogut reunir podria indicar que la síntesi ha estat un èxit.

Anglès

This final degree project explores the stereoselective synthesis of a novel analogue based on the ceramide GT11, so far, the most potent inhibitor of the enzyme dihydroceramide desaturase 1.

This new analogue contains a 1,5-disubstituted triazole moiety and an amide with a perfluorinated chain as notable characteristics, while maintaining those structural features that have been detected as key in achieving enzyme inhibition.

The proposed synthesis is based on two key stages: a stereoselective addition to Garner's aldehyde and the formation of a 1,5-disubstituted triazole group by an azide-alkyne cycloaddition with the particularity of the use of a ruthenium catalyst.

Despite the difficulties in the characterization of the final product, the information gathered may indicate that the synthesis has been a success.

1 Introducció

1.1 Relació entre els esfingolípíd i el càncer

Els esfingolípíd van ser descoberts l'any 1874 per Johann Ludwig Thudichum al fraccionar extractes de cervell amb etanol. L'arrel del mot esfingolípíd, "esfingo", prové de la paraula grega esfinx, ésser mitològic grec meitat dona meitat lleó alat que plantejava enigmes que havien de ser resolts.¹ El nom es correlaciona amb l'estructura d'aquests compostos, que presenten un cap polar unit a un fragment apolar.

La funció biològica d'aquests compostos ha estat àmpliament estudiada durant els darrers anys i actualment hi ha suficient evidència científica per assegurar que la presència de determinats esfingolípíd té efectes decisius en la regulació de la supervivència, diferenciació i mort cel·lular (d'ara en endavant, apoptosi).²

Els esfingolípíd constitueixen una àmplia gamma de compostos formats a partir de la modificació d'un esquelet comú per a tots ells, constituït per una cadena llarga de carbonis (normalment 18 en el cas dels mamífers) amb un grup hidroxil primari (glicosilat en cas dels glicolípíd) i un grup 1,2-aminoalcohol en disposició *anti*. Quan el grup amino es troba unit a un àcid gras es constitueix una ceramida (Figura 1).

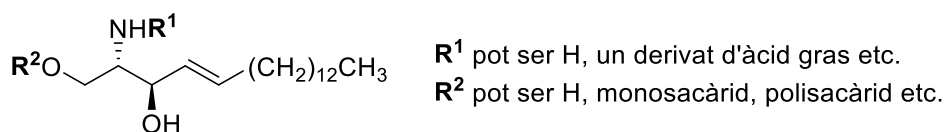


Figura 1: Estructura general dels esfingolípíd

Tot i que inicialment van ser estudiats per la seva condició de component principal de les membranes cel·lulars, aquest treball donarà especial rellevància a la capacitat reguladora sobre la proliferació cel·lular que presenta l'equilibri entre tres esfingolípíd concrets: la ceramida, l'esfingosina i l'esfingosina-1-fosfat. Els processos implicats en aquest equilibri, anomenat reòstat, es detallen a continuació (Esquema 1).

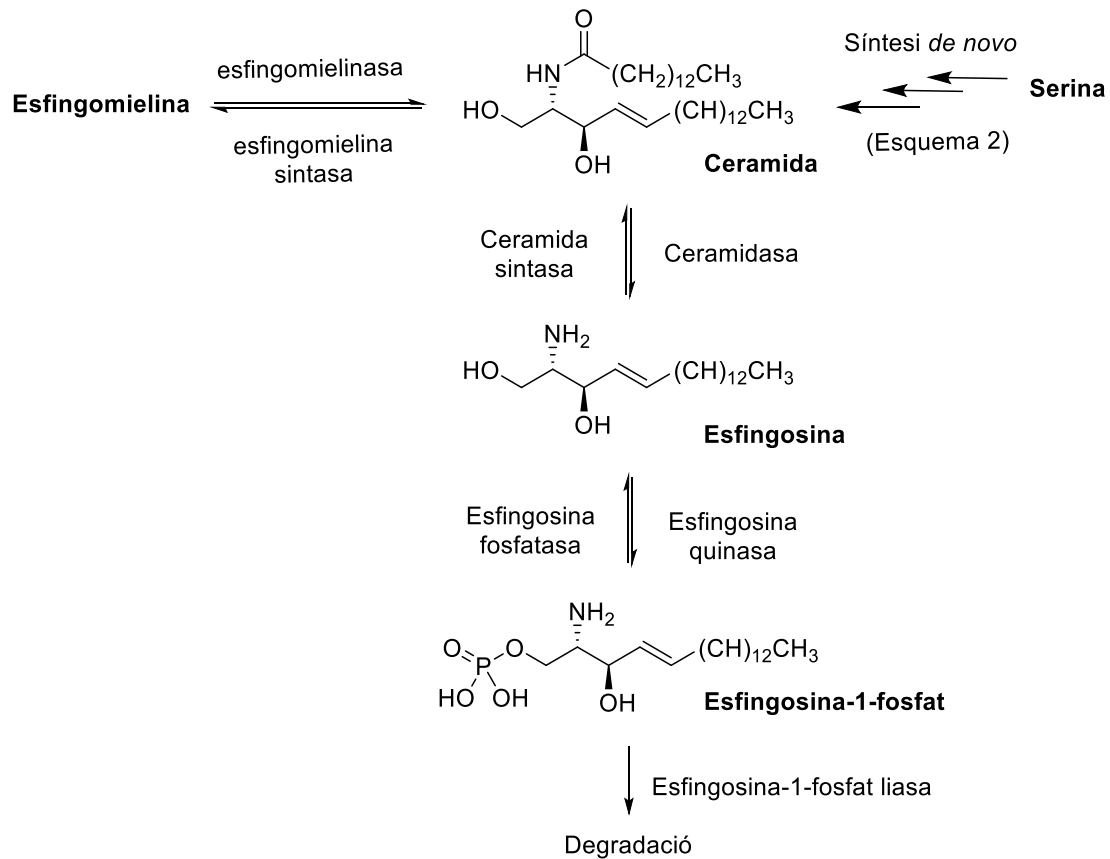
- La ceramida es pot obtenir per:
 - La hidròlisi d'esfingolípíd complexos, com l'esfingomièlina, mitjançant l'acció d'esfingomièlinases.
 - Partint de l'esfingosina mitjançant la ceramida sintasa.
 - La síntesi *de novo*. Aquest punt serà àmpliament discutit més endavant.
- Per tal d'evitar la acumulació de ceramida, aquesta pot ser eliminada a través de dues vies diferents:
 - Conversió a esfingomièlina catalitzada per la esfingomièlina sintasa.

¹ Thudichum, J.L.W. *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*; Archon Books: North Haven, CT, USA, 1962

² Tirodkar, T. S.; Voelkel-Johnson, C. Sphingolipids in Apoptosis. *Exp. Oncol.* **2012**, *34* (3), 231–242.

- Per mitjà de l'acció de ceramidases, que transformen la ceramida en esfingosina.
- Existeix una sola via per a la formació de l'esfingosina-1-fosfat:
 - Acció de l'esfingosina quinasa sobre l'esfingosina.
- Dues vies permeten disminuir la proporció d'esfingosina-1-fosfat:
 - Desfosforilació a esfingosina per la esfingosina fosfatasa.
 - Degradació. És la única via de sortida del metabolisme dels esfingolípídís, es duu a terme mitjançant esfingosina-1-fosfat liases.

Així doncs, l'esfingosina actua com a pont entre l'esfingosina-1-fosfat i la ceramida, permetent la seva interconversió.



Esquema 1: Ruta metabòlica dels esfingolípídís

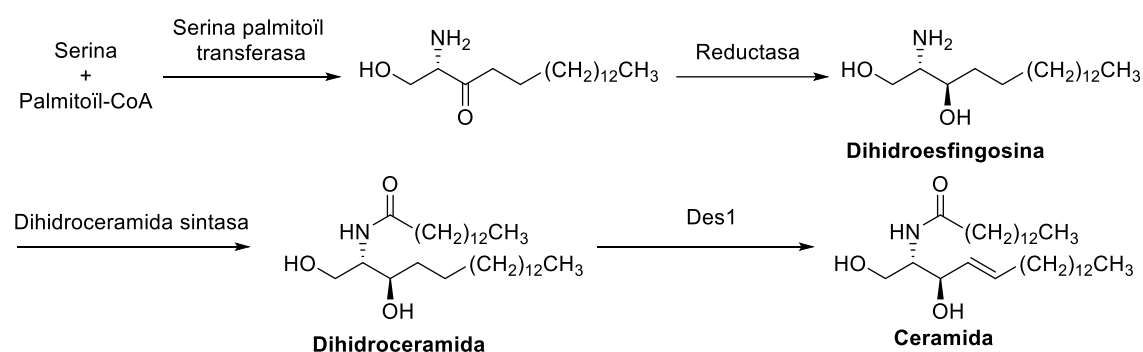
Degut a que el metabolisme dels esfingolípídís està format íntegrament per reaccions reversibles catalitzades per enzims, es pot afirmar que existeix un flux continu de transformacions que modifiquen la supervivència de la cèl·lula en canviar les concentracions de metabòlits que promouen o neguen l'apoptosi.

Concretament, diversos estudis relacionen directament la presència de grans concentracions de ceramida amb altes tasses d'apoptosi,³ mentre que la l'esfingosina-1-fosfat presentaria un efecte antagònic, promovent la supervivència cel·lular.⁴

1.2 Síntesi *de novo*: dihidroceramida i Des1

De novo és una expressió llatina que significa “de nou”, és utilitzada per definir aquelles síntesis a les quals es forma un producte complex a partir de substrats relativament senzills.

La síntesi *de novo* de la ceramida s'inicia amb la reacció entre la serina i el palmitoïl-CoA catalitzada per la serina palmitoïl transferasa. Seguidament, l'aminocetona obtinguda és reduïda per una reductasa obtenint la dihidroesfingosina, que al seu torn és acilada per la dihidroceramida sintasa produint dihidroceramida. Finalment, la dihidroceramida és dessaturada en *trans*- en la posició C₄-C₅ per la dihidroceramida desaturasa 1 (Des1)³ (Esquema 2).



Esquema 2: Síntesi *de novo* de la ceramida

Al 2006 els avenços en esfingolipidòmica van permetre al grup de Merrill observar altes presències de dihidroceramida, així com una inesperada baixa concentració de ceramida, al tractar cèl·lules humanes de la pròstata amb fenretinida (4-hidroxifenilretinamida), un producte antitumoral.⁵

Aquest fet és summament important i produeix un punt d'inflexió en el coneixement sobre els esfingolípids ja que fins aquell moment es creia que la dihidroceramida no era biològicament activa (de fet, es responsabilitzava a un hipotètic increment de ceramida l'eficàcia antitumoral de la fenretinida). Aquest compost no havia rebut gaire interès per part de la comunitat

³ Morad, S. A. F.; Cabot, M. C. Ceramide-Orchestrated Signalling in Cancer Cells. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (1), 51–65.

⁴ Kee, T. H.; Vit, P.; Melendez, A. J. J. Sphingosine Kinase Signalling In Immune Cells *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, 153–161.

⁵ Zheng, W.; Kollmeyer, J.; Symolon, H.; Momin, A.; Munter, E.; Wang, E.; Kelly, S.; Allegood, J. C.; Liu, Y.; Peng, Q.; Ramaraju, H.; Sullards, M. C.; Cabot, M.; Merrill, A. H. Ceramides and Other Bioactive Sphingolipid Backbones in Health and Disease: Lipidomic Analysis, Metabolism and Roles in Membrane Structure, Dynamics, Signaling and Autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**, *1758* (12), 1864–1884.

científica, a diferència de la seva contrapart desaturada de la que fins i tot hi havia diversos articles de revisió.⁶

Aquest creixent interès en la dihidroceramida es demostra per l'increment d'articles científics publicats aquest darrers anys referents a aquest tema (Figura 2).

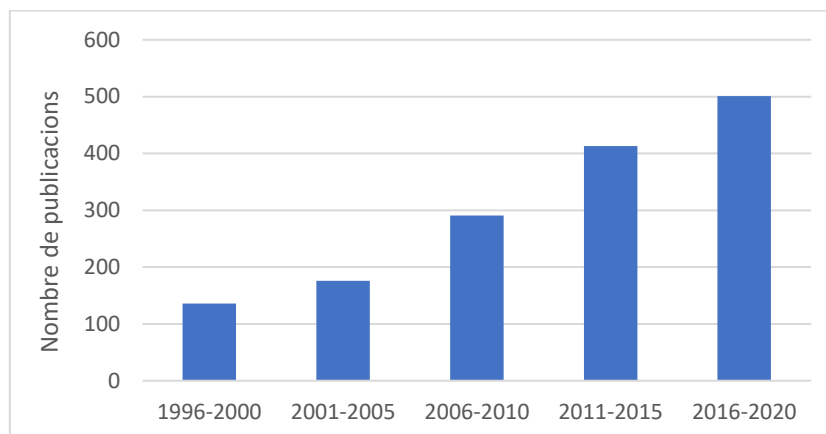


Figura 2: Nombre de publicacions que apareixen al cercar el terme "dihidroceramida" en la base de dades SciFinder en intervals de 5 anys

Aquest fet no només provava que la dihidroceramida era biològicament activa, sinó que era capaç de participar en el reòstat biològic de forma suficientment eficaç com per a ser considerada un dels principis actius d'una teràpia contra el càncer. S'acabava de descobrir una possible nova diana contra les malalties basades en la proliferació cel·lular: l'enzim Des1.⁷

Entre les possibles funcions de la dihidroceramida com a molècula biològicament activa se'n destaquen la regulació de l'estrès oxidatiu, hipòxia, inducció a l'autofàgia, regulació de la inflamació i reducció de la proliferació cel·lular i s'ha perfilat com una molècula amb potencial per tractar malalties com el càncer, la diabetis, malalties relacionades amb la inflamació, determinades malalties neurodegeneratives i l'VIH.^{8, 9, 10, 11}

⁶ Reynolds, C. P.; Maurer, B. J.; Kolesnick, R. N. Ceramide Synthesis and Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Lett.* **2004**, *206* (2), 169–180.

⁷ Fabriàs, G.; Muñoz-Olaya, J.; Cingolani, F.; Signorelli, P.; Casas, J.; Gagliostro, V.; Ghidoni, R. Dihydroceramide Desaturase and Dihydrosphingolipids: Debutant Players in the Sphingolipid Arena. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51* (2), 82–94.

⁸ Rodriguez-Cuenca, S.; Barbarroja, N.; Vidal-Puig, A. Dihydroceramide Desaturase 1, the Gatekeeper of Ceramide Induced Lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851* (1), 40–50.

⁹ Siddique, M. M.; Li, Y.; Chaurasia, B.; Kaddai, V. A.; Summers, S. A. Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (25), 15371–15379.

¹⁰ Vieira, C. R.; Munoz-Olaya, J. M.; Sot, J.; Jiménez-Baranda, S.; Izquierdo-Useros, N.; Abad, J. L.; Apellániz, B.; Delgado, R.; Martínez-Picado, J.; Alonso, A.; Casas, J.; Nieva, J. L.; Fabriàs, G.; Mañes, S.; Goñi, F. M. Dihydrosphingomyelin Impairs HIV-1 Infection by Rigidifying Liquid-Ordered Membrane Domains. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (7), 766–775.

¹¹ Pullmannova, P.; Maixner, J. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *Langmuir.* **2018**, *34*, 521–529.

1.3 Inhibidors esfingolípídics de la Des1 basats en el GT11

El primer i, fins al moment, el millor inhibidor de l'enzim Des1 amb estructura d'esfingolípíd va ser descrit el 2001 pel grup de Llebaria *et al.* Es tracta d'una C₈-ciclopropenil ceramida, anomenada GT11, i és la base de partida per a creació de múltiples anàlegs que tenen per objectiu la inhibició de l'enzim Des1, com és el cas d'aquest treball.

Només la C₈-ciclopropenil ceramida amb configuració en *anti* presenta una inhibició de l'enzim competitiva que depèn de la dosi amb una K_i de 6 μM i un IC₅₀ de 23nM. El GT11 mostra activitat tant *in vitro* com en cèl·lules intactes.¹²

Els anàlegs d'urea (**A**, Figura 3), tiourea (**B**, Figura 3) i α-cetoamida (**C**, Figura 3) del GT11 mantenen activitat inhibidora, tot i que amb menor potència, mentre que la *N*-metilació (**D**, Figura 3) del grup amida o la seva substitució per un carbamat (**E**, Figura 3) provoquen la desaparició de l'efecte inhibitori.¹³

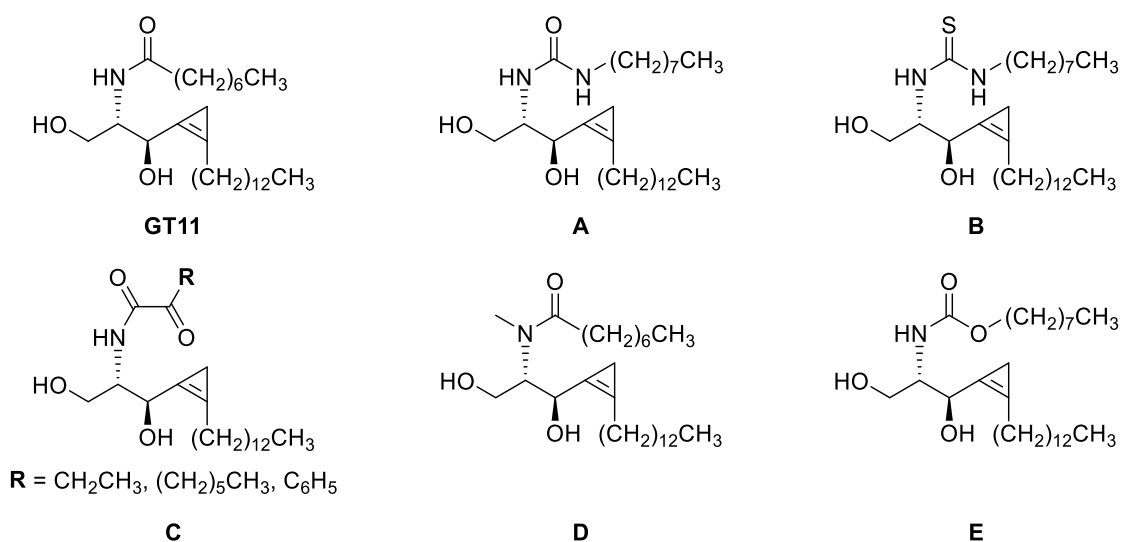


Figura 3: Estructura del GT11 i alguns dels seus anàlegs

D'entre els anàlegs del GT11 en els quals només s'ha modificat el nombre de carbonis de la cadena de l'amida (Figura 4) només presenten inhibició aquells amb 6 (IC₅₀ = 31μM) i 10 carbonis (IC₅₀ = 13μM).¹⁴

¹² Triola, G.; Fabriàs, G.; Llebaria, A. Synthesis of a Cyclopropene Analogue of Ceramide, a Potent Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase. *Angew Chem* **2001**, *40*, 1960–1962.

¹³ Bedia, C.; Llebaria, A. Analogs of the Dihydroceramide Desaturase Inhibitor GT11 Modified at the Amide Function: Synthesis and Biological Activities. *Org. BioMol. Chem.* **2005**, 3707–3712.

¹⁴ Triola, G.; Fabriàs, G.; Casas, J.; Llebaria, A. Synthesis of Cyclopropene Analogues of Ceramide and Their Effect on Dihydroceramide Desaturase. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (26), 9924–9932.

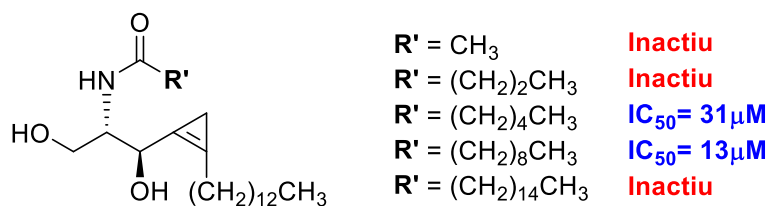


Figura 4: Estructura i activitat dels anàlegs del GT11 que difereixen en el nombre de carbonis de la cadena de l'amida

Cal destacar que actualment no es coneix l'estructura cristal·lina de la Des1, fet que dificulta la proposta i síntesi d'un inhibidor eficaç.

1.4 Antecedents

En el grup de recerca SINTCARB, en el que s'emmarca aquest treball, ja s'ha iniciat la síntesi d'anàlegs de la ceramida com a possibles inhibidors de la Des1, concretament de derivats de la ceramida que contenen un grup triazole en la posició del doble enllaç de la ceramida, mantenint el grup hidroxil primari i l'estereoquímica 2*S*,3*R* de l'aminoalcohol.¹⁵

Es van sintetitzar amb èxit tres productes finals que diferien el fragment *N*-acil entre si. L'elecció dels diferents fragments acil es va basar en la utilització d'aquelles cadenes alifàtiques que presenten una major inhibició en el GT11 (Figura 5).

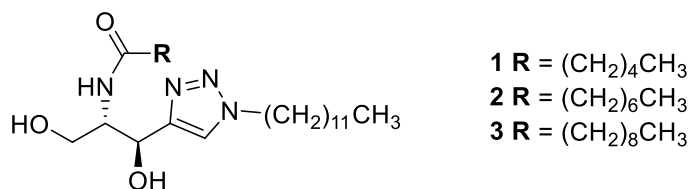


Figura 5: Anàlegs sintetitzats prèviament al grup SINTCARB

Els productes 1, 2 i 3 van ser obtinguts amb un rendiment global del 22%, 24% i 22%, respectivament.

La capacitat inhibidora va ser analitzada mitjançant el procediment descrit per Llebaria *et al.*¹² utilitzant microsomes de fetge de ratolins, emprant concentracions equimolars (50 μM) de substrat (*N*-octanoïlesfinganina) i els compostos sintetitzats. La formació de la ceramida es va controlar mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses dels derivats del trimetilsilil.¹⁶ Els assajos es van realitzar al laboratori de la Dra. Gemma Fabriàs (IQAC-CSIC, Barcelona).

¹⁵ Carla Martí, treball de fi de màster. Curs 2017-18.

¹⁶ Raith, K.; Darius, J.; Neubert R. H. H. Ceramide Analysis Utilizing Gas Chromatography – Mass Spectrometry *J. Chromatogr. A* **2000**, 876, 229-233.

Tot i que finalment els productes sintetitzats no van inhibir de manera efectiva l'enzim Des1 sí que es va poder extreure informació per a la síntesi de futurs anàlegs. Així doncs, és possible que no existís inhibició degut a que l'angle format per la cadena alifàtica unida al grup triazole i l'esquelet principal és molt semblant al de la ceramida, conseqüentment, l'enzim ho reconeixeria com a producte final i ho expulsaria del centre actiu. Un nou inhibidor hauria de presentar un angle més tancat en les cadenes unides al cicle.

Aquesta premissa han conduït a la proposta presentada en aquest treball de fi de grau.

1.5 Justificació de la molècula objectiu

Els estudis d'estructura-activitat (SAR) impliquen un treball iteratiu en el qual se sintetitzen molècules amb canvis estructurals en relació a una molècula inicial per tal de discernir com aquests afecten a les seves propietats biològiques.

A partir de la informació proporcionada pels inhibidors de l'enzim Des1 basats en esfingolípíd descrits fins l'actualitat i la síntesi de nous anàlegs d'aquests és possible entendre millor com funciona l'enzim Des1 i, per tant, acotar paulatinament les característiques que hauria de presentar un candidat per la seva inhibició.

A continuació es detalla el raonament rere l'elecció de cada fragment de la molècula objectiu (Figura 6).

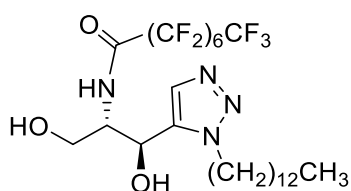


Figura 6: Molècula objectiu, **1**

Els estudis de relació estructura-activitat han demostrat que l'estereoquímica 2*S*, 3*R*, és a dir, l'aminodiol en configuració *anti*, i la presència d'un hidroxil lliure a en la posició 1 són essencials a l'hora de presentar inhibició.¹⁴

Considerant que els anàlegs del GT11 *N*-metilats no presenten activitat inhibidòria és raonable pensar que la formació d'enllaços d'hidrogen donadors amb aminoàcids de l'enzim per part de l'hidrogen de l'amida és un possible requisit. A fi d'explorar aquesta possibilitat la cadena de l'amida serà perfluorada, fet que augmentarà l'acidesa del protó del grup amida degut a l'alta electronegativitat del fluor, potenciant la seva capacitat donadora d'enllaços d'hidrogen.

L'elecció de la cadena perfluorada no és limitada només a aquest fet:

- La natura hidrofòbica que aporta la cadena perfluorada podria millorar la permeabilitat cel·lular de l'anàleg proposat, així com una millora d'hipotètiques interaccions hidrofòbiques entre l'anàleg i el centre actiu de l'enzim.¹⁷
- La incorporació d'àtoms de fluor dona accés a la possibilitat d'interaccions ortogonals amb carbonils pertanyents als aminoàcids, així com la capacitat d'acceptar enllaços d'hidrogen.¹⁸

S'ha escollit utilitzar una cadena de 8 carbonis en la cadena N-acilada donat que aquesta llargària es correspon amb la del GT11, que com s'ha indicat anteriorment, és el producte que presenta major inhibició d'entre els anàlegs sintetitzats fins el moment.¹⁴

D'altra banda, les característiques pròpies del grup 1,2,3-triazole el converteixen en una estructura molt atractiva des del punt de vista d'aquesta síntesi:

- Presenta un moment dipolar comprés entre els 0 i 5 Debyes, depenent de la substitució, fet que dona accés a la capacitat de generar enllaços d'hidrogen (podent actuar tant com a donador com acceptor) i interaccions π - π amb altres anells aromàtics, de fet, el seu índex d'aromaticitat és molt proper al del benzè.
- A banda de les interaccions clàssiques també té la possibilitat d'exhibir-ne d'altres de menor intensitat, però que s'han demostrat de gran importància, com per exemple: N-H $\cdots\pi$, O-H $\cdots\pi$, C-H \cdots O i C-H $\cdots\pi$, tot i que cal mencionar que són més freqüents en els triazoles substituïts en les posicions 1,4.^{19, 20}
- Tal i com s'ha comentat anteriorment, el fragment triazole presentarà una disubstitució en les posicions 1,5 per tal de canviar l'angle format entre les dues cadenes alifàtiques i ressemblar el produït per el GT11, evitant una hipotètica expulsió del centre actiu degut a una semblança excessiva amb la ceramida.

Finalment, i a diferència de la molècula sintetitzada en els antecedents, la cadena alifàtica unida al triazole constarà de 13 carbonis. Aquesta diferència és deguda a la decisió de mantenir una mida semblant entre la cadena alifàtica de l'anàleg i la del GT11, que consta de 13 carbonis. Així doncs, en la molècula presentada a Antecedents es va optar per escurçar-la 1 carboni per tal de compensar la llargària addicional que aportava la disubstitució en les posicions 1,4, fet que no és necessari quan la substitució es produeix en les posicions 1,5, com és en aquest cas.

¹⁷ Biffinger, J. C.; Kim, H. W.; Dimagno, S. G. The Polar Hydrophobicity of Fluorinated Compounds. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622–627.

¹⁸ Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5822–5880.

¹⁹ Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Grosso, E. Del; Grosa, G.; Sorba, G.; Cesare, G. Are 1,4- and 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles Good Pharmacophoric Groups? *ChemMedChem* **2014**, 2497–2508.

²⁰ Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. An Asian J.* **2011**, *6* (10), 2696–2718.

2 Objectiu del treball

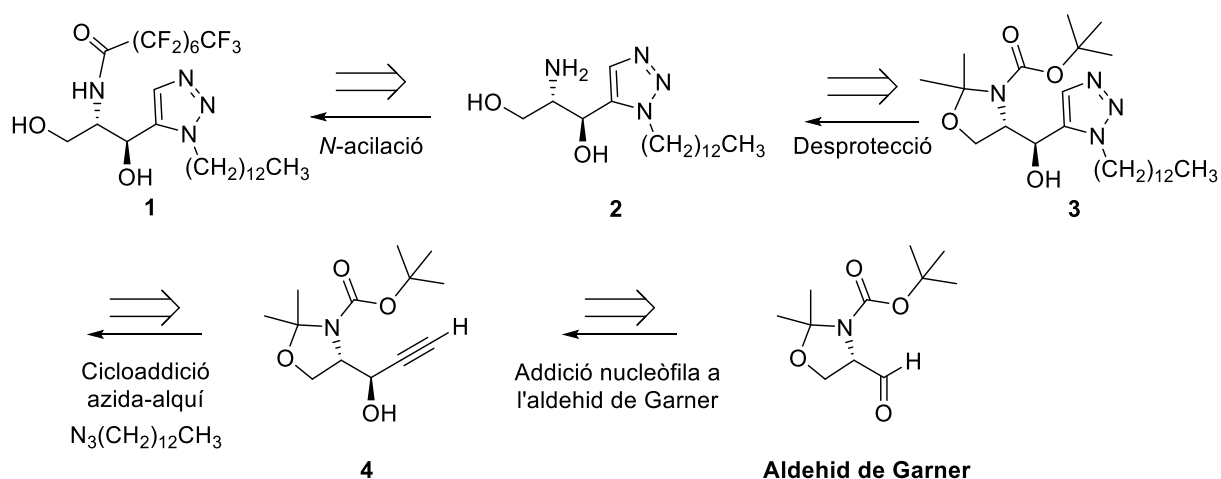
El descobriment d'un compost que inhibeixi de forma eficaç l'enzim Des1 representaria un pas important cap a la dilucidació dels mecanismes mitjançant els quals la dihidroceramida podria afectar sistemes biològics. Aquest fet podria ajudar a confirmar l'activitat d'una molècula que es creia inactiva i, en general, es reafirmaria el paper de la dihidroceramida en sistemes biològics com a un esfingolípíd bioactiu fins ara desconegut d'un reòstat capaç de modificar la proliferació cel·lular.

Per aquest motiu, l'objectiu general d'aquest treball de fi de grau és la síntesi estereoselectiva de l'anàleg perfluorat de l'esfingolípíd GT11 amb una estructura central tipus triazole 1,5-disubstituit, a fi de proposar un possible inhibidor de l'enzim Des1 com a diana terapèutica contra el càncer.

3 Discussió de resultats

L'estratègia retrosintètica seguida per a l'obtenció de la molècula objectiu (Esquema 3) ja ha estat explorada en el grup de recerca en el qual s'emmarca aquest treball.

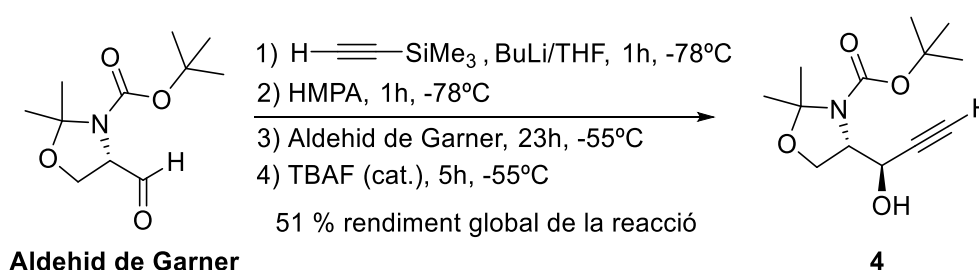
L'anàleg **1** s'obté a través d'una *N*-acilació que introduiria la cadena perfluorada al producte **2**, provinent de la desprotecció del producte **3**. L'anell triazole 1,5-disubstituït es constituïria mitjançant una cicloaddició azida-alquí al producte **4**, provinent d'un compost del "quiral pool", l'aldehid de Garner.



Esquema 3: Esquema retrosintètic general

En els últims anys l'aldehid de Garner s'ha perfilat com un bloc ideal per a l'obtenció de productes quirals amb funcionalitat 2-amino-1,3-diol,²¹ com és el nostre cas.

En el primer pas de la síntesi (Esquema 4) es pretén obtenir una estructura amb funcionalitat 2-amino-1,3-diol (protegits) en disposició *anti* a través d'un atac nucleòfil al carbonil de l'aldehid de Garner. La reacció permet introduir un triple enllaç al fragment de l'aldehid mitjançant una etinilació i desililació en un sol matràs. Aquesta reacció es va realitzar en medi anhidre.



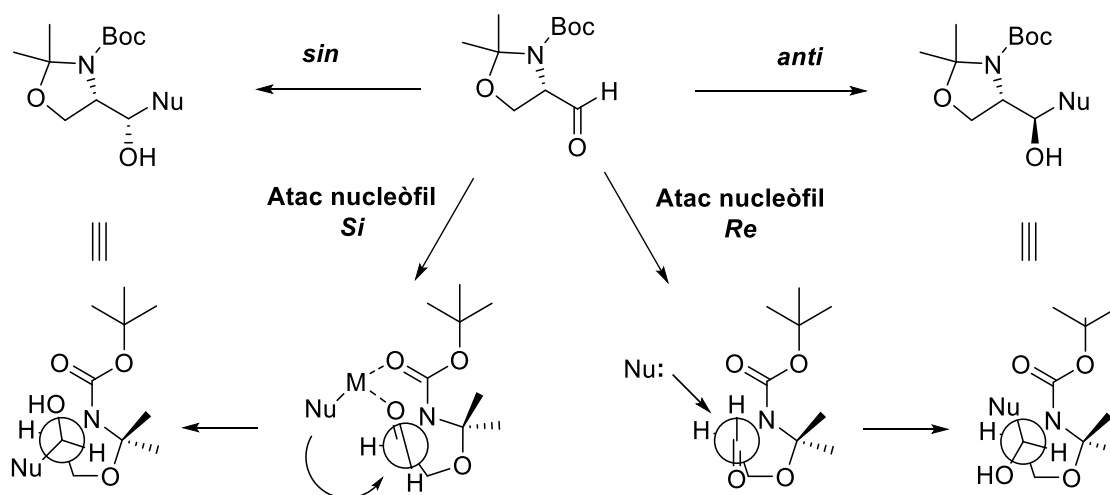
Esquema 4: Addició nucleòfila de l'etiniltrimetilsilà a l'aldehid de Garner

²¹ Passiniemi, M.; Koskinen, A. M. P. Garner's Aldehyde as a Versatile Intermediate in the Synthesis of Enantiopure Natural Products. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2641–2659.

En l'addició nucleòfila es poden produir dos diastereoisòmers diferents en funció de la cara del grup carbonil sobre la qual es duu a terme l'atac, fet que està directament relacionat amb l'impediment estèric de tal cara, determinada per la conformació preferida de l'aldehid a l'estat de transició. Segons els models proposats per explicar aquest tipus d'addicions, el substituent més voluminós unit al centre estereogènic es situa en posició ortogonal al carbonil.

Així doncs, sabent que el nucleòfil s'aproximarà en l'angle de Bürgi-Dunitz (105°) respecte el pla del carbonil en *anti* al grup voluminós i per la cara que presenti un impediment estèric menor, podem predir dos possibles successos en funció de la conformació preferida en cada cas (Esquema 5):

- Un metall oxòfil (per exemple Zn o Mg) coordina els carbonils (de l'aldehid i el carbamat) formant un quelat: la cara menys impedida és la *Si* i per tant el producte cinètic presentarà la estereoquímica *sin*. Aquest estat de transició s'anomena de Cram.²²
- Els carbonils no estan coordinats: la cara menys impedida és la *Re* i per tant el producte cinètic presentarà la estereoquímica *anti*. Aquest estat de transició de no-quelació s'anomena de Felkin-Ahn.²¹



Esquema 5: Explicació de l'estereoquímica resultant depenent de la cara per la qual es produeix l'atac nucleòfil a l'aldehid de Garner

Per tal d'afavorir la estereoquímica desitjada es va afegir hexametilfosforotriamida (HMPA) ja que trenca de forma eficaç els clústers de liti del nucleòfil al coordinar-se amb aquest catió, incrementant la nucleofília de l'alquí i afavorint la formació del producte cinètic *anti*.^{23, 24}

El control de la temperatura en aquesta reacció és fonamental per tal d'obtenir el producte desitjat. Al 2009 el grup de Melendezes va publicar la síntesi d'anàlegs de l'esfingosina partint de l'aldehid de Garner en el qual es va prescindir de l'ús d'HMPA, optant per exercir un control

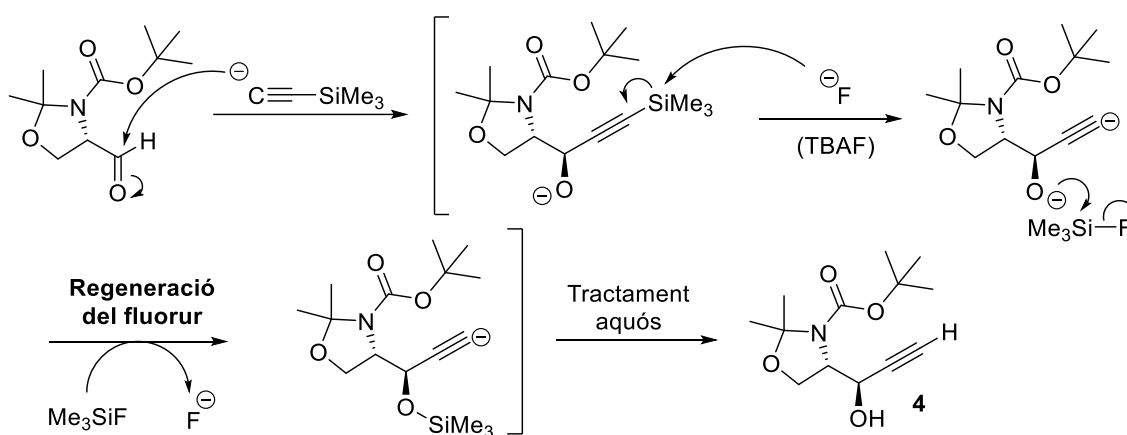
²² Cram, D. J.; Elhafez, F. A. A. Studies in Stereochemistry. X. The Rule of "Steric Control of Asymmetric Induction" in the Syntheses of Acyclic Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5828–5835.

²³ Herold, P. Synthesis of D-*erythro*- and D-*threo*-Sphingosine Derivatives from L-Serine. *Helvetica Chimica Acta* **1988**, *71*, 354–362.

²⁴ Gooch, J. W. Hexamethylphosphoric Triamide. *Encycl. Dict. Polym.* **2011**, 366–366.

sobre la relació entre diastereoisòmers a través de la regulació de la temperatura i els equivalents de butil liti (BuLi) utilitzats.²⁵ Està descrit que a la relació *sin/anti* dels productes és 1:9 a -50°C i emprant 1,16 equivalents de BuLi, mentre que per sobre dels 15°C i, independentment de la concentració de BuLi, només s'observa la estereoquímica *sin*. Aquest fet pot ser explicat degut a que a altes temperatures l'addició nucleòfila transcorre a través d'un estat de transició termodinàmic molt semblant al quelat.

La desilnilació de l'alquí terminal es va dur a terme utilitzant fluorur de tetrabutilamoni (TBAF) com a font de fluorur en quantitats catalítiques. L'ús catalític d'aquest reactiu es pot explicar considerant que una vegada el fluorur ha desprotegit l'alquí forma fluorur de trimetilsilil (Me₃SiF), que posteriorment, i degut a l'alta afinitat de l'oxigen per el silici, serà atacat per l'ió alcòxid en un atac nucleòfil al silici, formant èter de trimetilsilil i regenerant el fluorur en el procés²⁶ (Esquema 6).



Esquema 6: Mecanisme de la reacció d'alquiniació i desprotecció en un sol matràs

El rendiment global de la reacció d'addició-desililació va ser del 51%.

L'estructura del producte **4** obtingut es va confirmar mitjançant RMN de ¹H i ¹³C i espectroscòpia IR. L'assignació de les senyals s'ha dut a terme a través d'experiments COSY i HSQC (Annexes, Figures 18 i 19).

En ressonància magnètica nuclear de protó (Figura 7) es pot observar un singlet a δ 2.43 ppm pertanyent al protó de l'alquí terminal (H-5), sent aquest el pic més característic del producte. També es va constatar l'absència del protó corresponent al grup aldehyd del producte de partida. Per altra banda, és especialment interessant destacar el triplet a δ 4.10 ppm i el multiplet a δ 3.90 ppm corresponents als protons del carboni 1 ja que es tracta de dues senyals que provenen de protons diastereotòpics, és a dir, dos protons que tot i estar units al mateix carboni presenten desplaçaments químics diferents degut a la quiralitat de la molècula. Aquest fet també afecta

²⁵ Wong, L.; Tan, S. S. L.; Lam, Y.; Melendez, A. J. Synthesis and Evaluation of Sphingosine Analogues as Inhibitors of Sphingosine Kinases. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (12), 3618–3626.

²⁶ Wong, F. F.; Chuang, S. H.; Yang, S. chuan; Lin, Y. H.; Tseng, W. C.; Lin, S. K.; Huang, J. J. One-Pot Ethynylation and Catalytic Desilylation in Synthesis of Mestranol and Levonorgestrel. *Tetrahedron* **2010**, 66 (23), 4068–4072.

als protons dels metils del grup protector *N,O*-isopropiliden acetal, que presenten senyals a δ 1.59 ppm i 1.50 ppm.

Cal mencionar que els senyals immediatament adjacents als dels protons H-3 i H-2 són produïdes per confòrmers del grup protector Boc, així doncs, no s'apreciaria cap senyal pertanyent al diastereòmer *sin*. Per tant, aquest pas s'ha dut a terme de forma estereoespecífica.

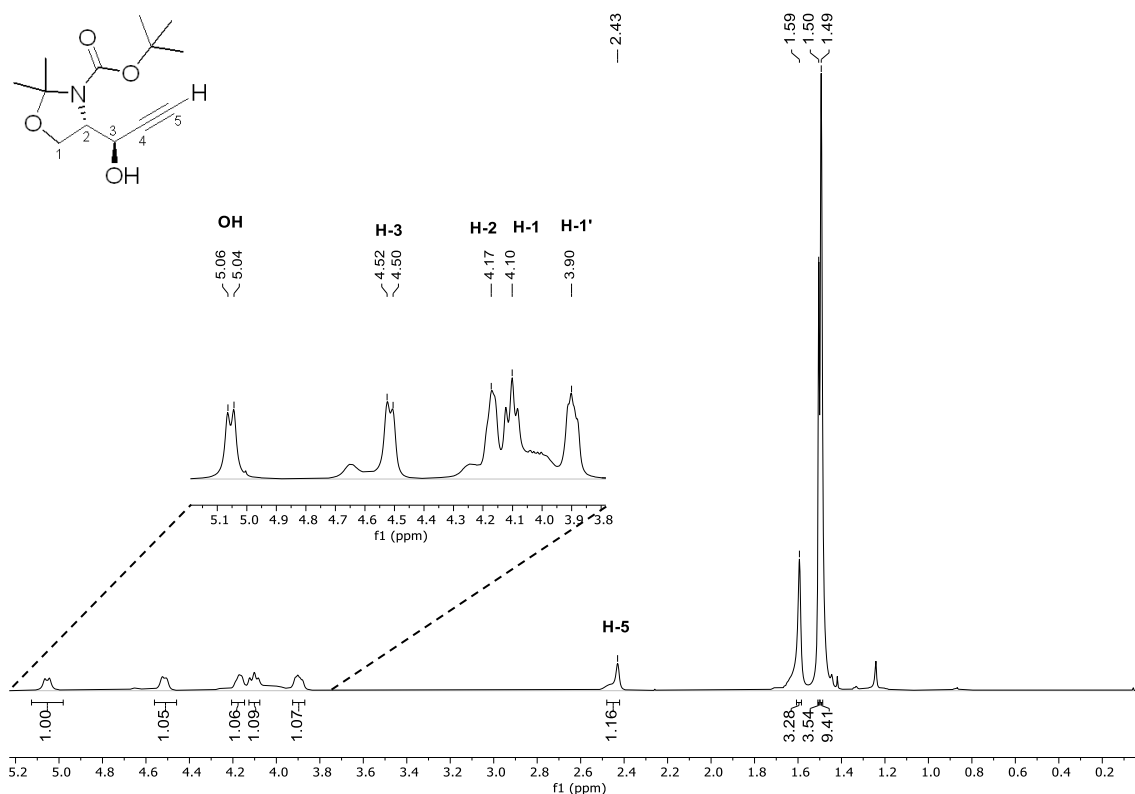


Figura 7: Espectre RMN ^1H del producte 4

En l'espectre de RMN ^{13}C (Figura 8) es poden observar els senyals que confirmen l'obtenció de producte. Els senyals més característics d'aquest producte són els produïts per els carbonis pertanyents al triple enllaç, C-4 i C-5, a δ 82.1 ppm i 74.1 ppm, respectivament, confirmant que s'ha produït l'addició. Com és esperable, el producte no s'ha desprotegit durant el transcurs de la reacció, fet demostrat per la presència del senyal situat a δ 154.5 ppm pertanyent al carbonil del grup protector *tert*-butoxicarbonil (Boc), juntament amb el senyal a δ 95.2 ppm pertanyent al carboni quaternari del *N,O*-isopropiliden acetal.

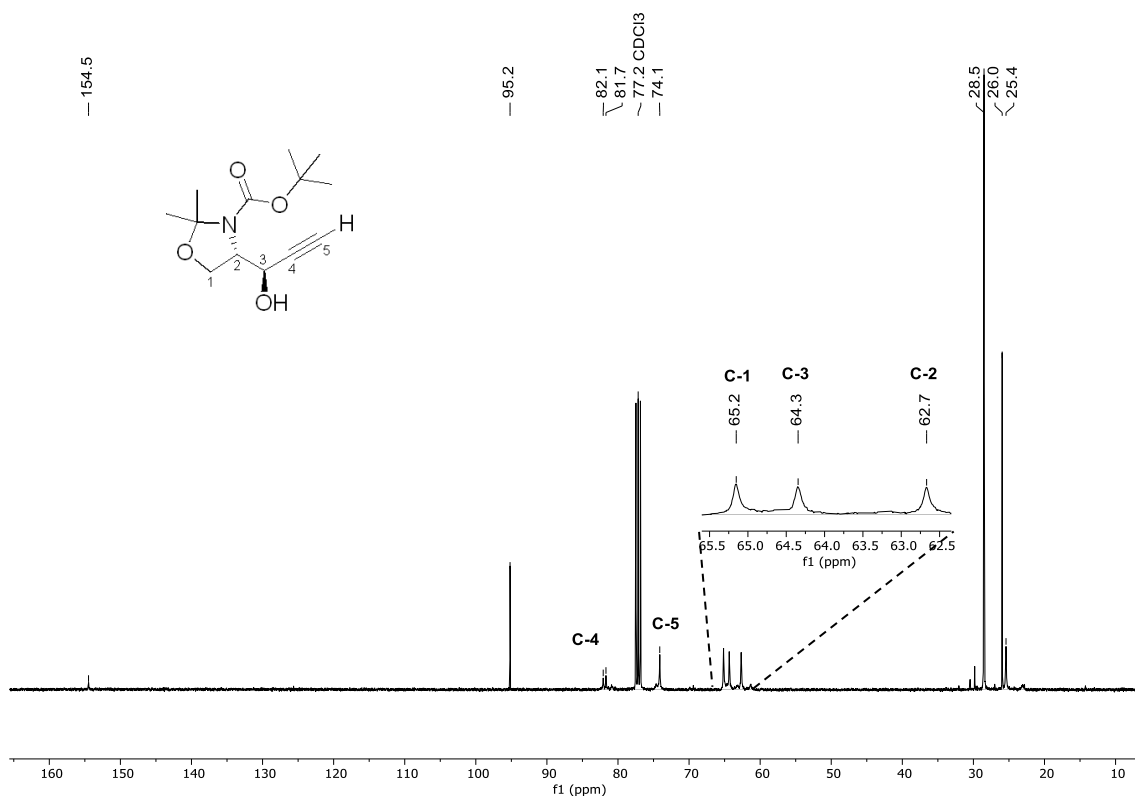


Figura 8: Espectre RMN ^{13}C del producte **4**

En l'espectre IR (Annexes, Figura 15) s'observa una ample banda de tensió O-H deguda a l'aparició de l'alcohol format a 3430 cm^{-1} com a banda més notable, així com una banda poc intensa a 2160 cm^{-1} , que pertany a la tensió de l'enllaç triple C-C. La banda de tensió del carbonil del grup protector Boc apareix a 1688 cm^{-1} .

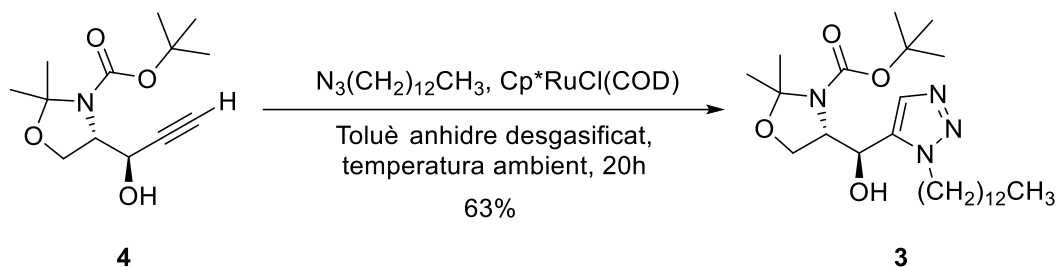
És interessant mencionar que s'ha pogut discernir fàcilment quin senyal correspon al protó de l'alcohol i quin a l'H-3 donat que aquest últim es troba enllaçat al C-3 i, per tant, apareixerà el senyal corresponent l'espectre HSQC (Annexes, Figura 19), a diferència del protó de l'alcohol, ja que a l'estar unit a un àtom d'oxigen no presentarà senyal.

En conjunt, aquestes dades permeten confirmar que s'ha obtingut el producte desitjat **4** i continuar amb la següent etapa de la síntesi que consisteix en la formació de l'estructura tipus triazole.

Tot i que ja es coneixien les reaccions 1,3-dipolars amb anterioritat no va ser fins el 2002 quan els grups de Medal i Sharpless van descobrir de forma simultània la possibilitat d'obtenir triazoles 1,4-disubstituïts en condicions suaus utilitzant catalitzadors de Cu (I), obrint una nova via de síntesi regioselectiva que ha estat àmpliament utilitzada aquests darrers anys. El 2005 el grup de Jia i Fokin van acabar de complementar aquest tipus de reaccions al canviar el

catalitzador de coure per un de ruteni, obrint la possibilitat d'obtenir heterocicles aromàtics de tipus 1,2,3-triazole 1,5-disubstituïts en condicions suaus.²⁷

El següent pas de la síntesi plantejada implica l'aplicació d'aquestes condicions emprant $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{COD})$ com a catalitzador en la obtenció regioselectiva del triazole derivat **3** (Esquema 7).



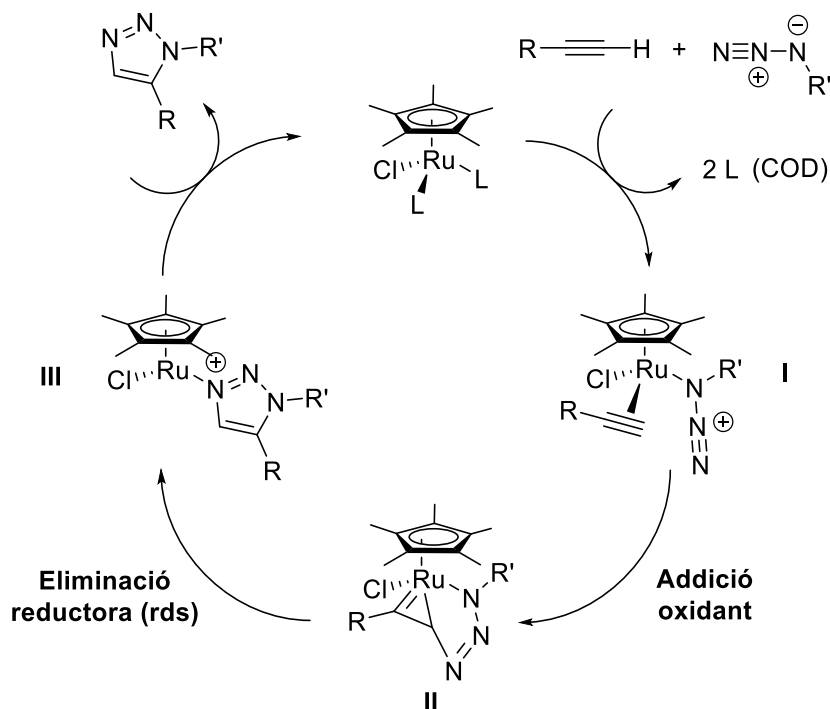
Esquema 7: Reacció de cicloadició azida-alquí

Cal mencionar que l'azida utilitzada en aquesta reacció va ser sintetitzada amb anterioritat en el grup de recerca SINTCARB al fer reaccionar 1-bromotridecà i azida de sodi, obtenint el producte desitjat via $\text{S}_{\text{N}}2$.

El cicle catalític de la reacció de cicloadició s'inicia amb el desplaçament del 1,5-ciclooctadiè (COD), que actua com a lligand espectador, generant el complex activat **I**, que és convertit en un metal·lacicle de 6 baules, **II**, a través de l'addició oxidant. Aquesta etapa determina la regioselectivitat degut a que el nou enllaç carboni - nitrogen format implica el carboni més electronegatiu i menys estèricament impedit de l'alquí (en aquest cas el terminal) i el nitrogen terminal de l'azida. Seguidament el metal·lacicle intermedi experimenta una eliminació reductora, produint **III**, sent aquesta la etapa que determina la velocitat de la reacció. Finalment s'allibera el producte final i es regenera el catalitzador (Esquema 8).²⁸

²⁷ Johansson, J. R.; Said, A.; Kann, N. Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction : Scope, Mechanism , and Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14726–14768.

²⁸ Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (28), 8923-8930.



Esquema 8: Cicle catalític de la cicloaddició catalitzada per ruteni

El producte desitjat **3** es va obtenir amb un rendiment del 63% i l'estructura del mateix es va confirmar mitjançant RMN de ^1H i ^{13}C i espectroscòpia IR. L'assignació de les senyals s'ha dut a terme a través d'experiments COSY i HSQC (Annexes, Figures 23 i 24).

En l'espectre de RMN ^1H (Figura 9) és especialment interessant veure els canvis produïts per la formació del grup conjugat triazole, sent els més notables la desaparició del senyal pertanyent al protó de l'alquí terminal i l'observació d'un nou senyal en forma de singlet a δ 7.56 ppm, corresponent al protó del nou grup aromàtic.

La introducció de la nova cadena alquíllica s'observa en forma d'increment substancial de la intensitat de senyal en la zona alifàtica, l'aparició de nous senyals corresponents als protons dels dos metilens més pròxims al triazole en forma de multiplet centrat a δ 4.42 ppm i de multiplet centrat a δ 1.95 ppm. Finalment es pot apreciar un triplet centrat a δ 0.87 ppm causat pels protons del metil terminal de la cadena.

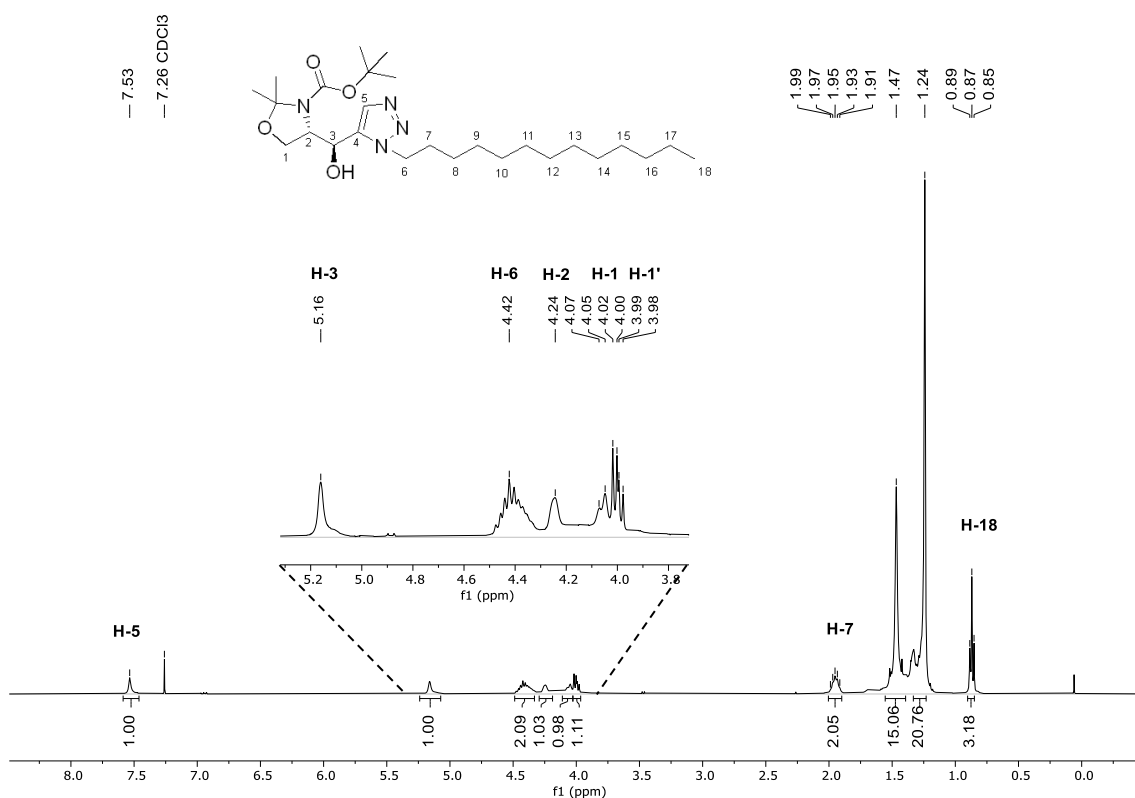


Figura 9: Espectre RMN ^1H del producte 3

A l'espectre de RMN ^{13}C (Figura 10) es poden apreciar els senyals corresponents al doble enllaç entre carbonis pertanyents al triazole a δ 136.9 ppm i 131.6 ppm, així com la desaparició de les senyals pertanyents al triple enllaç anteriorment situades a δ 82.1 ppm i 74.2 ppm. La cadena alquíllica apareix en forma de 13 senyals entre δ 49.4 ppm i 14.3 ppm, pertanyent aquestes al carboni de la cadena alquíllica més pròxim al grup triazole i el metil final de tal cadena, respectivament.

S'ha confirmat la formació del grup triazole disubstituint en les posicions 1,5 en observar el seu senyal característic a δ 131.6 ppm en l'espectre RMN de ^{13}C , és més, no s'ha detectat cap senyal propera als 119.5 ppm, desplaçament químic característic dels triazoles disubstituint en les posicions 1,4.²⁹

²⁹ Creary, X.; Anderson, A.; Brophy, C.; Crowell, F.; Funk, Z. Method for Assigning Structure of 1,2,3-Triazoles. **2012**, J. Org. Chem. 2012, 77, 8756–8761.

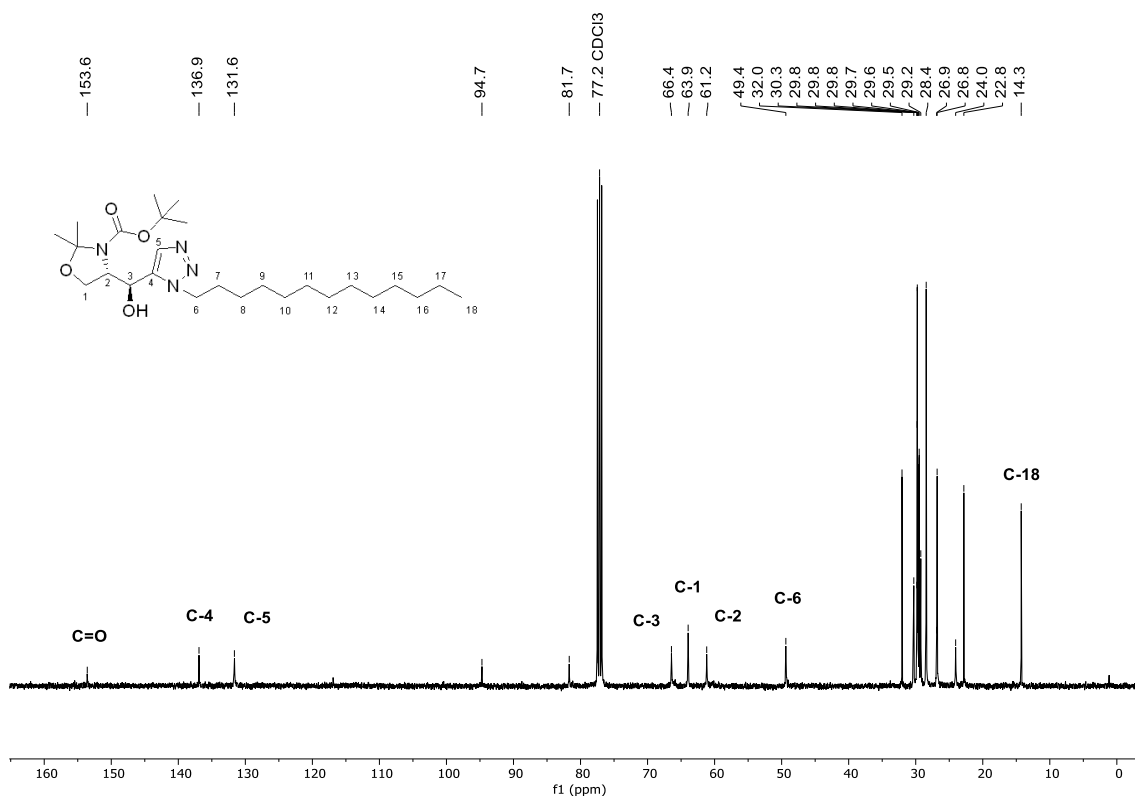
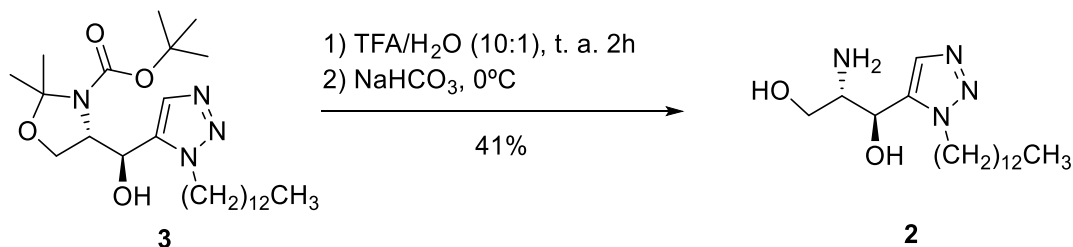


Figura 10: Espectre RMN ^{13}C del producte **3**

En l'espectre IR (Annexes, Figura 20) s'observen pocs canvis, sent el més destacable la desaparició de la banda pertanyent a la tensió de l'enllaç triple.

En conjunt, aquestes dades permeten confirmar que s'ha obtingut el producte desitjat i continuar amb la síntesi.

En el pas següent es va dur a terme la desprotecció dels grups protectors Boc i *N,O*-isopropiliden acetal del compost de forma simultània en medi àcid aquós utilitzant una solució d'àcid trifluoroacètic (TFA) i aigua (10:1)³⁰ (Esquema 9).

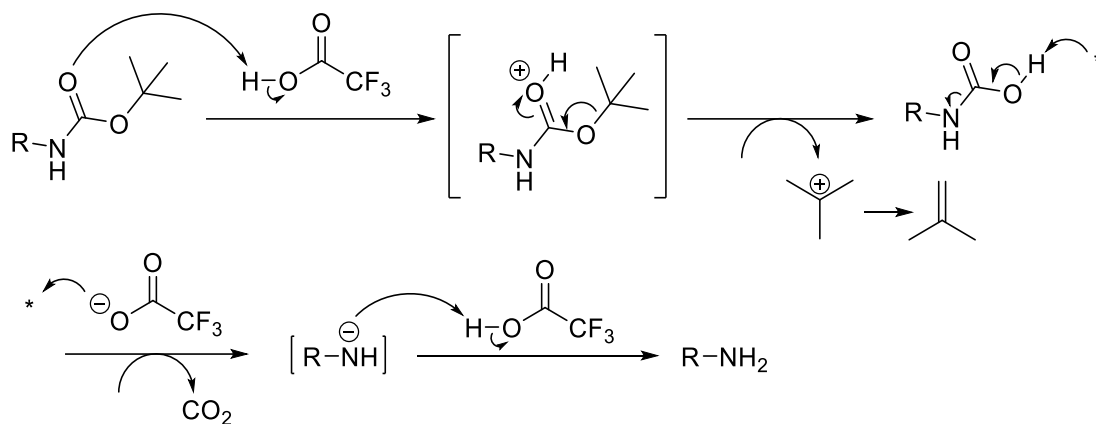


Esquema 9: Desprotecció dels grups protectors Boc i *N,O*-isopropiliden acetal

³⁰ Mun, J.; Onorato, A.; Nichols, F. C.; Morton, M. D.; Saleh, A. I.; Smith, M. B. Structural Confirmation of the Dihydrospinganine and Fatty Acid Constituents of the Dental Pathogen *Porphyromonas Gingivalis*. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3826–3833.

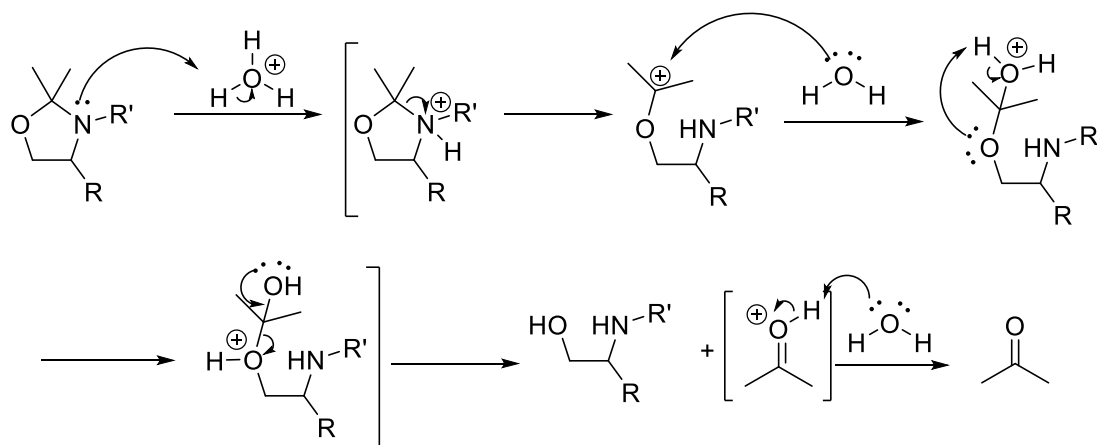
A fi de revertir la sal d'amoni formada a partir de l'amina i eliminar l'excés d'àcid trifluoroacètic, la solució es va neutralitzar amb una solució de NaHCO_3 a 0°C una vegada acabada la reacció.

En la reacció d'hidròlisi, el grup protector Boc és protonat per el TFA, generant àcid carbàmic i alliberant un carbocatió terciari que durà a terme una eliminació per produir isopropè. L'àcid carbàmic no es estable en les condicions en les que es duu a terme la reacció i descompon en forma de CO_2 i el producte desprotegit (Esquema 10).



Esquema 10: Mecanisme de desprotecció del grup protector Boc

En la hidròlisi de l'acetal, el parell d'electrons lliures de l'amina captarà un dels protons del medi generant un catió que causarà la seva alliberació. El nou carbocatió terciari serà atacat per una molècula d'aigua que, en desprotonar-se produirà un atac que acabarà generant cetona i el producte desprotegit (Esquema 11).



Esquema 11: Mecanisme de desprotecció del grup protector N,O-isopropilidè acetal

El producte totalment desprotegit **2** es va obtenir un rendiment del 41% i la seva estructura es va confirmar mitjançant RMN de ^1H i ^{13}C i espectroscòpia IR. L'assignació de les senyals s'ha dut a terme a través d'experiments COSY i HSQC (Annexes, Figures 28 i 29).

En l'espectre de RMN ^1H (Figura 11) es pot observar el canvi de desplaçament químic del senyal corresponent al protó H-2, que passa d'aparèixer a δ 4.26 ppm fins els 3.15 ppm degut al canvi del grup carbamat per una amina. També es constata la desaparició dels senyals pertanyents als grups metils del *N,O*-isopropiliden acetal i el grup Boc.

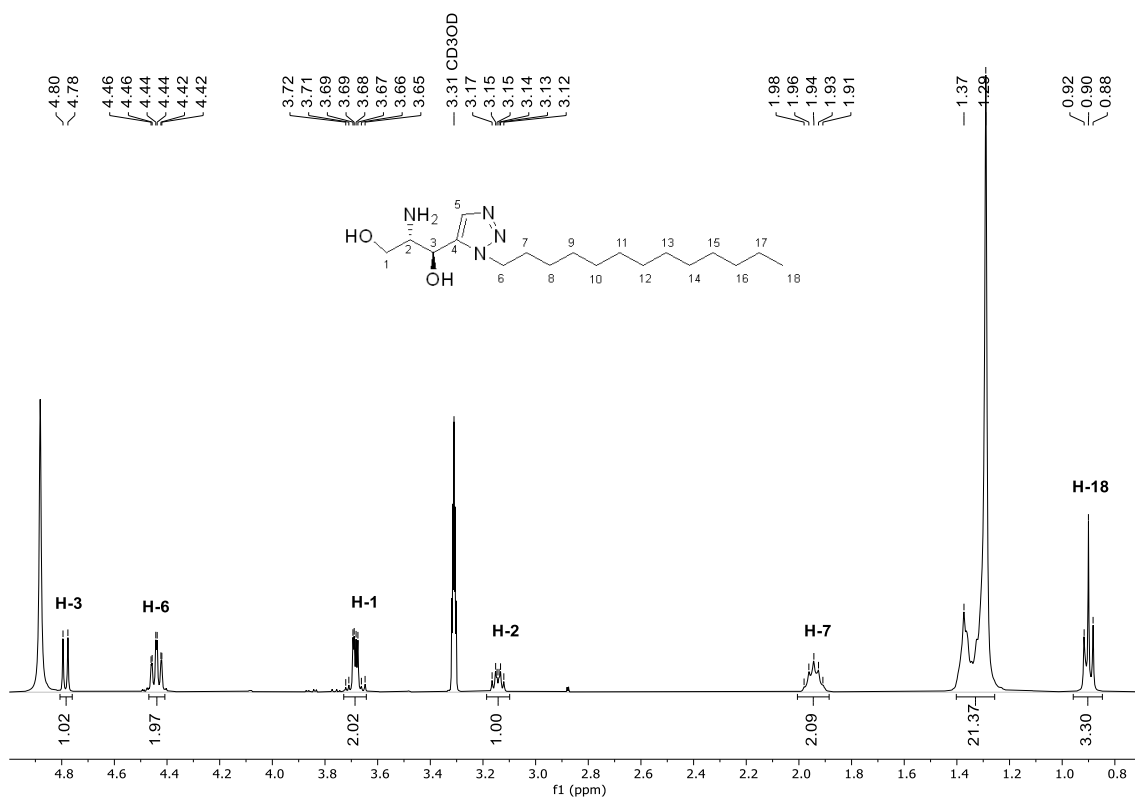


Figura 11: Espectre RMN ^1H del producte 2

En l'espectre RMN ^{13}C (Figura 12) es pot observar com desapareixen els senyals corresponents als carbonis dels grups protectors, sent els més característics el pics anteriorment situats a δ 153.6 ppm corresponent al carbonil del Boc i els carbonis quaternaris del del *N,O*-isopropiliden acetal i el Boc, que apareixien a δ 94.7 ppm i 81.7 ppm, respectivament.

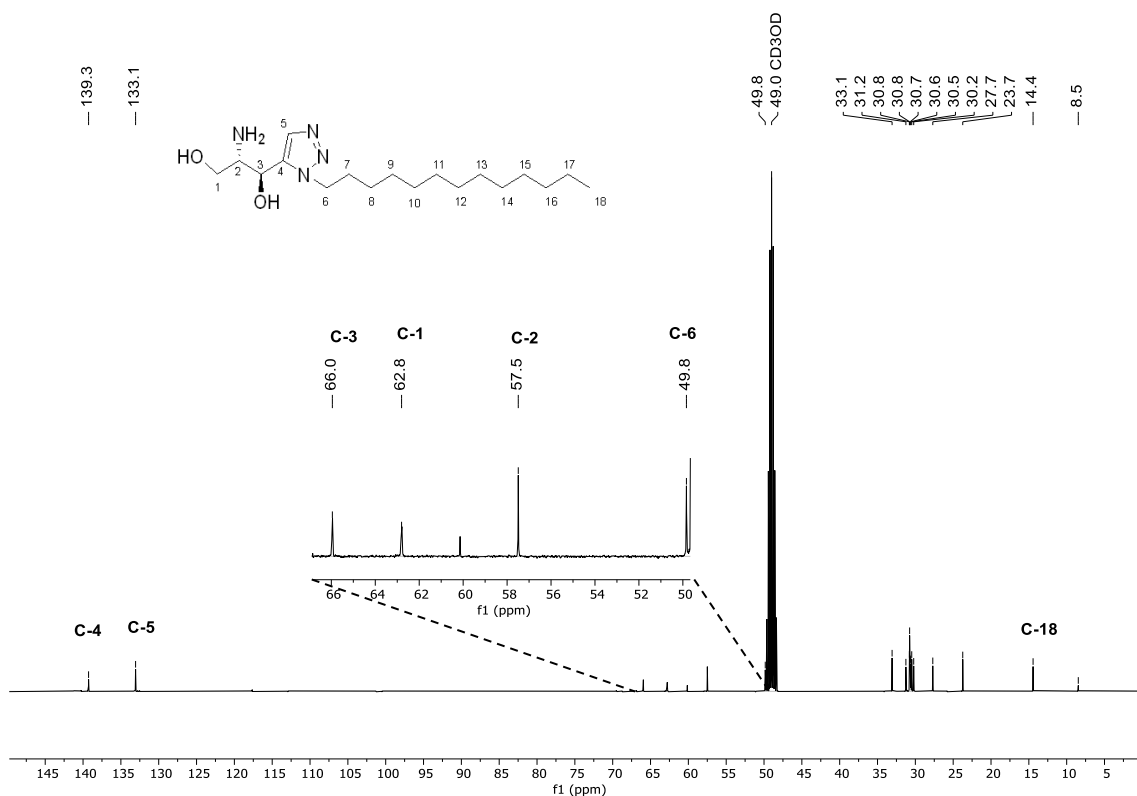
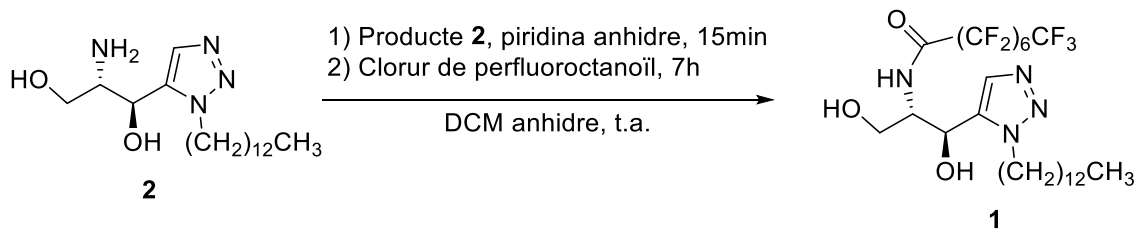


Figura 12: Espectre RMN ^{13}C del producte 2

En l'espectre IR (Annexes, Figura 25) s'observa la desaparició de les bandes anteriorment situades a 1698 cm^{-1} (banda de tensió del carbonil) i 1365 cm^{-1} (banda de tensió de l'enllaç C-O del carbamat) degut a la desprotecció del grup Boc. Per altra banda, es poden intuir dos pics situats a 3341 cm^{-1} i 3277 cm^{-1} pertanyents a la tensió N-H asimètrica i simètrica del grup amina.

En conjunt, aquestes dades permeten confirmar que s'ha obtingut el producte desitjat i continuar amb la síntesi.

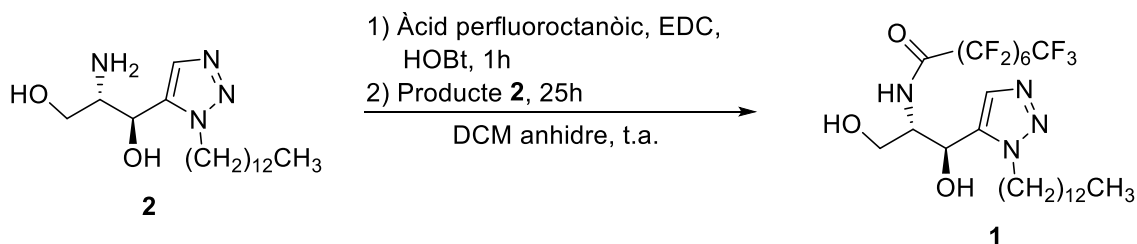
El pas final de la via sintètica proposada preveu la *N*-acilació del producte desprotegit per tal de formar l'amida amb la cadena perfluorada i aconseguir el producte desitjat. Per tal d'aconseguir-ho inicialment es va proposar la utilització del clorur de perfluoroctanoïl com agent acilant, que permetria generar el producte final ràpidament aprofitant l'alta reactivitat d'aquest tipus de compostos, potenciada per l'elevat efecte inductiu generat per la cadena perfluorada. Es va utilitzar piridina anhidre per neutralitzar l'HCl generat. La reacció és va dur a terme en condicions anhidres (Esquema 12).



Esquema 12: N-acilació a través del clorur de perfluorooctanoïl

Lamentablement, per RMN de ^1H es va constatar que l'acilació no havia tingut lloc, probablement degut a que el clorur de perfluorooctanoïl emprat es trobava en un avançat estat d'hidròlisi.

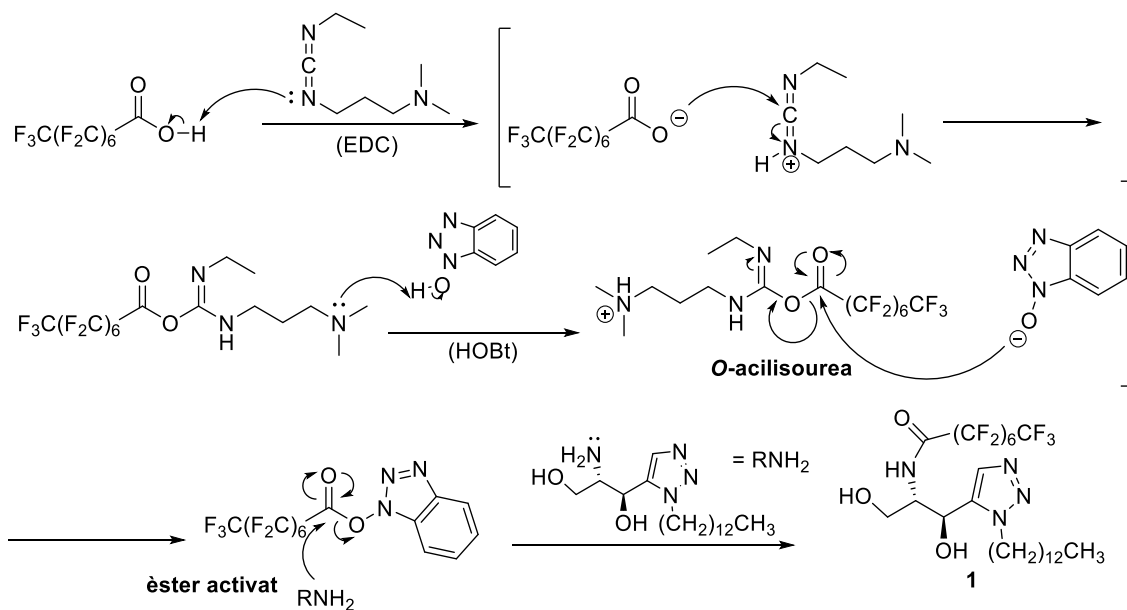
Com alternativa es va dur a terme la reacció de N-acilació emprant N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) com a reactiu d'acoblament³¹ i el corresponent àcid carboxílic perfluorat per generar l'O-acilisourea, que al seu torn és transformada en un ester activat per reacció amb l'hidroxibenzotriazole (HOBT)³² (Esquemes 13 i 14).



Esquema 13: N-acilació a través de l'àcid perfluorooctanoïc mitjançant reactius d'acoblament

³¹ Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 606–631.

³² Joullié, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of Amide Bond Formation. *Arkivoc* **2010**, 2010 (8), 189–250.



Esquema 14: Mecanisme de reacció de la N-acilació amb reactius d'acoblament

Cal mencionar que el producte final presenta molts problemes de solubilitat que no han pogut ser solucionats després de múltiples proves, fet que no ha permès obtenir bons espectres RMN de ^1H i ^{13}C que permetessin confirmar de forma indubtable l'estructura del producte obtingut.

Tot i aquestes dificultats, a continuació es mostren dades que permetrien intuir que, efectivament, es tractaria del producte desitjat, analitzant els espectres RMN de ^1H i ^{19}F realitzats en el millor dels dissolvents dels que s'ha assajat: $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ (1:1).

Així, tot i la baixa intensitat de senyal i la possible presència d'alguna impuresa, l'espectre RMN ^1H (Figura 13) permetria apreciar a δ 7.70 ppm la senyal característica del protó unit al grup triazole, H-5 (anteriorment en forma de singlet a δ 7.72 ppm), així com un pic ample a δ 7.40 ppm que podria pertànyer al protó de l'amida perfluorada.

En la zona entre 4.4 ppm i 3.6 ppm, podem observar senyals que podrien correspondre als protons H-6, a δ 4.27 ppm i 4.29 ppm (que anteriorment es situaven a δ 4.44 ppm).

D'altra banda, s'observa un multiplet a δ 3.97 ppm que podria pertànyer al protó H-2. Aquest fet és especialment rellevant, ja que indicaria que l'H-2 hauria experimentat un gran desapantallament (quasi 1 ppm) en relació al producte de partida com a conseqüència de l'acilació de l'amina.

Els protons diastereotòpics H-1 i H-1' apareixerien en forma de triplet a δ 3.81 ppm i 3.69 ppm (anteriorment en forma de multiplet centrat a δ 3.68 ppm).

Finalment es poden apreciar senyals que podrien correspondre al protó H-7 a δ 1.99 ppm (anteriorment a δ 1.94 ppm) i al protó H-18, en forma de triplet a δ 0.85 ppm (anteriorment a δ 0.90 ppm).

Les integrals dels senyals mencionats donarien suport a aquestes suposicions.

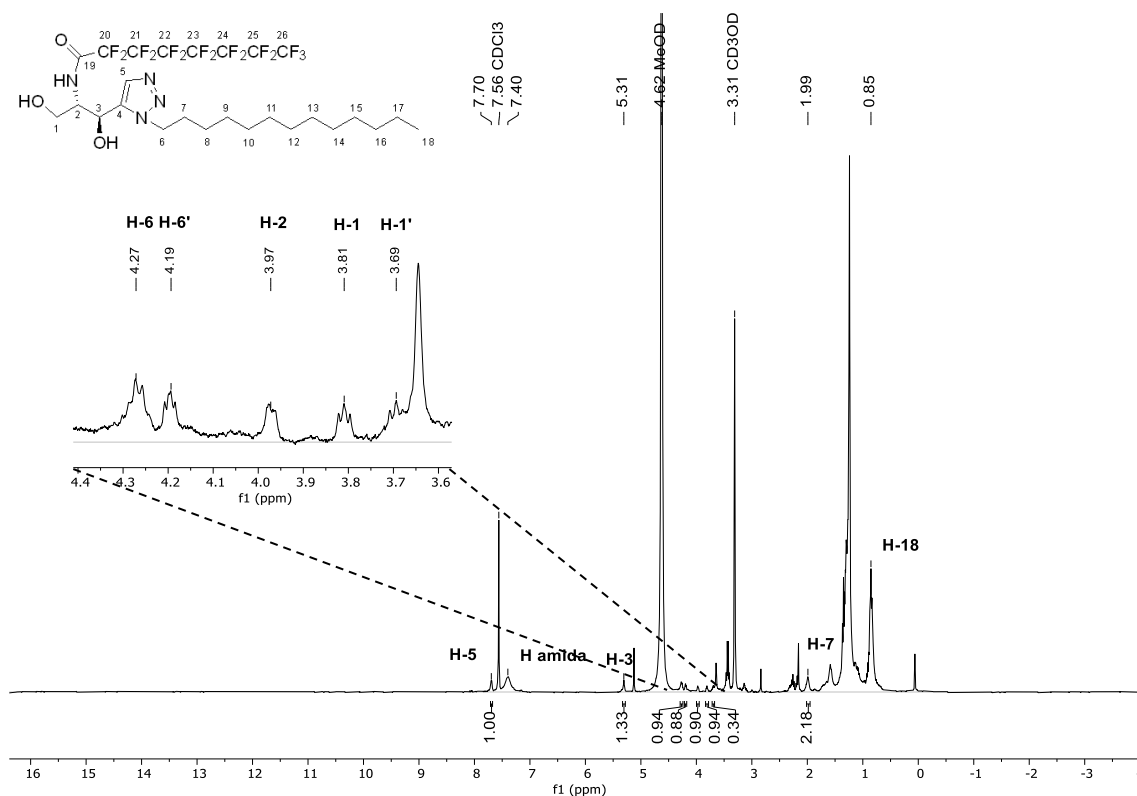


Figura 13: Espectre RMN ^1H del producte **1**

Per tal de confirmar la presència de la cadena perfluorada es va dur a terme un espectre de RMN ^{19}F (Figura 14) on es pot apreciar clarament 7 senyals que correspondrien als 7 tipus de fluors no-equivalents que presenta la cadena perfluorada que es volia introduir a la molècula. Són especialment remarcables el triple triplet situat a δ -77.84 ppm i el triplet a δ -113.81 ppm, ja que podrien pertànyer als àtoms de fluor del carboni terminal i del grup difluorometilè situat al costat del grup carbonil, respectivament.³³

³³ Newmark, R. A. Vicinal Fluorine – Fluorine Coupling Constants in Perfluoropropyl Groups. *Journal of fluorine chemistry* **2009**, *130*, 389–393.

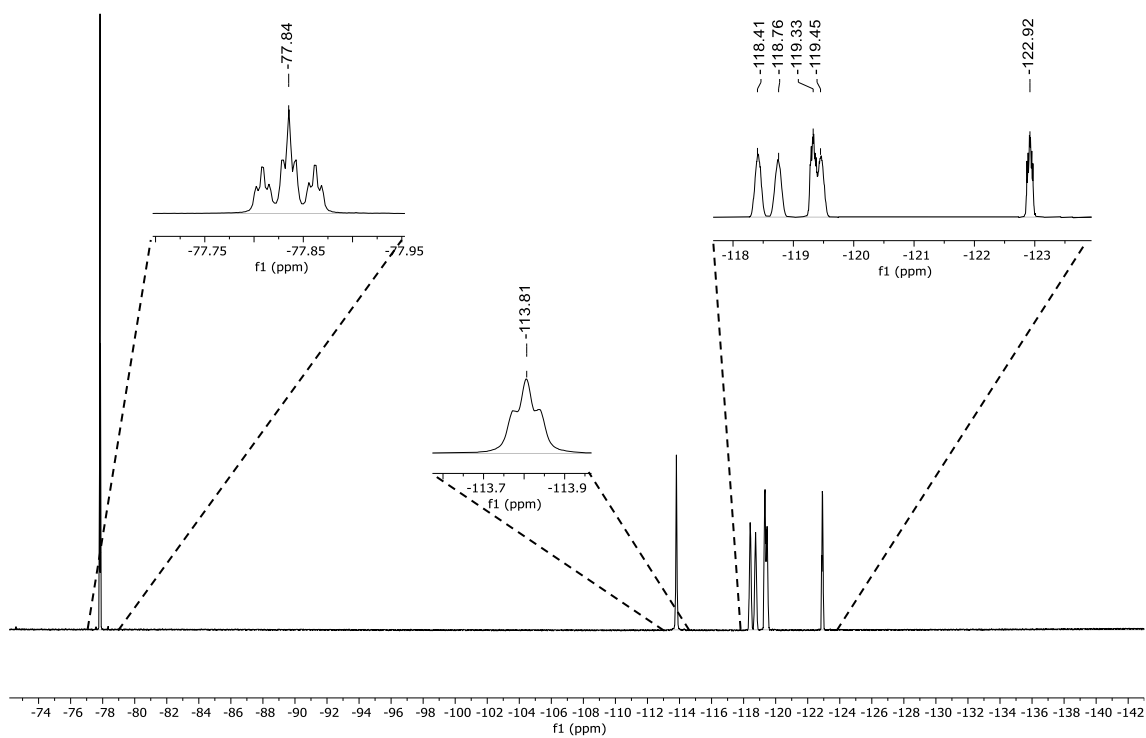


Figura 14: Espectre RMN ^{19}F del producte 1

Així doncs, les dades disponibles en el moment d'entrega d'aquest treball de fi de grau podrien indicar que la síntesi ha estat un èxit

4 Part experimental

4.1 Mètode general

Totes les reaccions sensibles a l'aire i/o a la humitat es van dur a terme en condicions anhidres: efectuant cicles de buit-argó als matrassos que s'anaven a utilitzar, prèviament assecats a l'estufa, així com transferint els reactius i els dissolvents amb cànules o xeringues purgades prèviament amb argó.

Es va desgasificar toluè al deixar-lo en agitació sota un borbolejat d'argó durant 1 hora.

Els espectres IR han estat obtinguts amb l'espectrofotòmetre d'infrarojos JASCO FT/IR-680 plus amb transformada de Fourier i visualitzats amb el programa SpectraManager (JASCO®).

Els espectres RMN de ^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY i HSQC han estat obtinguts amb un Varian Mercury VX 400 i visualitzats amb el programa MestreNova (MestreLab®).

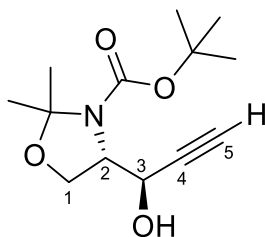
Les constants d'acoblament (J) es descriuen en Hz utilitzant les següents abreviacions: s = singlet, d = doblet, t = triplet, t ap = triplet aparent m = multiplet, dd = doblet de doblets, dt = doble triplet, tt = triple triplet. Tots els espectres s'han referenciat en relació al senyal residual del solvent deuterat emprat.

Les cromatografies de capa prima es van dur a terme sobre plaques d'alumini E. Merck® de 0.25 mm recobertes amb 60 F₂₅₄ de sílice, utilitzant com a revelador *p*-anisaldehyd o KMnO₄ segons s'indica a continuació. Les columnes cromatogràfiques es van realitzar al passar corrent a pressió del solvent indicat a través de sílica gel 60 (230-400 mesh) de Fluka® o Merck®.

Durant tot el transcurs d'aquest treball de fi de grau s'han respectat les mesures de seguretat i prevenció de riscos previstes segons la normativa vigent. Per altra banda, tots els residus generats han estat eliminats d'acord amb els estàndards del grup de recerca SINTCARB.

4.2 Procediment de síntesi i caracterització dels productes

Cal mencionar que, per claredat, la numeració dels compostos sintetitzats correspon a la utilitzada en els esfingolípids i no la que segueix la nomenclatura de la IUPAC.

(S)-4-((R)-1-hidroxi-2-propin-1-il)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilat de *tert*-butil,³⁴ 4

Es van dissoldre 0.25 mL d'etniltrimetilsilà (1.79 mmol) en 8.4 mL de THF anhidre i seguidament la solució es va refredar fins -78°C . Es va afegir 0.7 mL de BuLi (2.5M en hexà, 1.72 mmol) a la solució anterior i aquesta es va agitar durant 1 hora a -78°C . Una vegada transcorregut aquest temps es van addicionar 0.40 mL de HMPA anhidre (2.30 mmol) i la solució es va deixar en agitació 1 hora a -78°C . A continuació es van addicionar 254 mg d'aldehid de Garner (S) (1.11mmol) en 1 mL de THF anhidre, es va augmentar la temperatura fins els -55°C (aquesta temperatura es mantindrà fins el final de la reacció) i la solució es va deixar en agitació les següents 23 hores.

Una vegada transcorregut aquest temps es van afegir 0.2 mL de TBAF (1M, 0.2 mmol) i es va començar a controlar l'evolució de la reacció mitjançant cromatografia de capa fina utilitzant Hexà/AcOEt (8:2) com a fase mòbil i *p*-anisaldehyd com a revelador. Transcorregudes 4 hores es van afegir 0.1 mL de TBAF (1M, 0.1 mmol), i al cap d'una hora, 0.1 mL (1M, 0.1 mmol) addicionals. Es va deixar l'agitació 1 hora i a continuació es va procedir a la recuperació de la reacció.

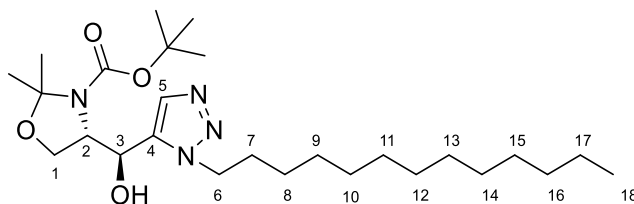
La solució es va neutralitzar amb 11 mL de NH_4Cl (aq.) i es va deixar reposar a temperatura ambient fins que es va temperar. La sal formada es va dissoldre afegint 10 mL de solució saturada de NaCl i es van realitzar extraccions de la fase aquosa utilitzant Et_2O (4 x 20 mL). La fase orgànica es va assecar mitjançant l'ús de Na_2SO_4 anhidre i, després de filtrar, es va retirar el solvent aplicant buit, obtenint un cru sòlid lleugerament viscos de color vermell fosc.

El cru es va purificar per cromatografia mitjançant una columna de sílice utilitzant Hexà/AcOEt (9:1) i (8:2) com a fase mòbil.

Finalment es van obtenir 145 mg de producte pur **4**, fet que suposa un rendiment del 51%. El producte és un sòlid blanc.

Rf = 0.33 (Hexà/AcOEt, 8:2). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ en ppm** 5.05 (d, $J_{\text{OH},3} = 8.0$ Hz, 1H, OH), 4.51 (d, $J_{3,\text{OH}} = 8.0$ Hz, 1H, H-3), 4.19-4.16 (m, 1H, H-2), 4.10 (t ap, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-1), 3.91-3.89 (m, 1H, H-1'), 2.43 (s, 1H, H-5), 1.59 (s, 3H, *N,O*-isopropiliden acetal), 1.50 (s, 3H, *N,O*-isopropiliden acetal), 1.49 (s, 9H, Boc). **^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ en ppm** 154.5 (grup carbonil del Boc), 95.2 (C quaternari del *N,O*-isopropiliden acetal), 82.1 (C-4), 81.7 (C quaternari del Boc), 74.1 (C-5), 65.2 (C-1), 64.3 (C-3), 62.7 (C-2), 28.5 (metils del Boc), 26.0 (metil del *N,O*-isopropiliden acetal), 25.4 (metil del *N,O*-isopropiliden acetal). **IR en cm^{-1}** 3430 (ν_{OH}), 2978 (ν_{CH}), 2160 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1682 ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 1367 ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$).

³⁴ D'Aniello, F.; Mann, A.; Schoenfelder, A.; Taddei, M. Stereoconvergent Synthesis of (2S,3S,8S,9S,4E,6E)-N-Boc-ADDA Starting from (S)-Serine and (S)-Phenyllactic Acid. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1447-1456.

(S)-4-((S)-hidroxi(1-tridecil-1*H*-1,2,3-triazol-5-il)metil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilat de *tert*-butil, 3

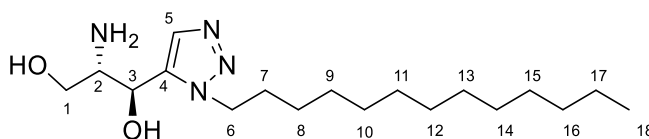
Es van dissoldre 10 mg de Cp**RuCl*(COD) (0.027 mmol) en 3.0 mL de toluè anhidre desgasificat. Es van pesar 178 mg d'1-azidotridecà (0.79mmol) que juntament amb 145 mg del producte **4** (0.57 mmol) es van addicionar al matràs de fons rodó que contenia el catalitzador de ruteni utilitzant 2 mL de toluè anhidre. La solució es va deixar en agitació les següents 23 hores a temperatura ambient.

Transcorregut aquest temps es va detectar que la reacció no avançava per cromatografia de capa fina utilitzant Hexà/AcOEt (1:1) com a fase mòbil *p*-anisaldehid com a revelador i, donat que encara hi havia producte de partida, es van afegir 35 mg d'azida (0.016 mmol) i 1.5 mg de catalitzador (0.004 mmol) addicionals i es va deixar agitant les següents 20 hores. La solució presenta un marcat color vermell fosc.

Quan es va detectar que la reacció havia finalitzat, es va realitzar un filtrat amb celita fent rentats amb DCM i seguidament es va evaporar el dissolvent per obtenir un cru de reacció que va ser purificat mitjançant una columna de sílice utilitzant una solució d'Hexà/AcOEt (7:3) com a fase mòbil.

Finalment es van obtenir 174 mg de producte **3** (0.359 mmol), fet que suposa un 63% de rendiment. El producte és un sòlid blanc.

R_f = 0.33 (Hexà/AcOEt, 8:2). **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ en ppm** 7.53 (s, 1H, H-5), 5.16 (s, 1H, H-3), 4.48-4.34 (m, 2H, H-6), 4.26 (s ample, 1H, H-2), 4.08-4.04 (m, 1H, H-1), 4.00 (dd, *J*_{gem} = 9.6 Hz, *J*_{1'-2} = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 1.99-1.91 (m, 2H, H-7), 1.50-1.45 (m, 15H, 6H pertanyen al *N,O*-isopropiliden acetal, 9H al Boc), 1.29-1.22 (m, 20H, H-8 - H-17), 0.87 (t, *J*₁₈₋₁₇ = 6.7 Hz, 3H, H-18). **¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ en ppm** 153.6 (carbonil del Boc), 136.9 (C-4), 131.6 (C-5), 94.7 (C quaternari del *N,O*-isopropiliden acetal), 81.7 (C quaternari del Boc), 66.4 (C-3), 63.9 (C-1), 61.2 (C-2), 49.4 (C-6), 32.0 (CH₂), 30.3 (C-7), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.4 (metils del Boc), 26.9 (metil del *N,O*-isopropiliden acetal), 26.8 (CH₂), 24.0 (metil del *N,O*-isopropiliden acetal), 22.8 (CH₂), 14.3 (C-18). **IR en cm⁻¹** 3282 (νOH), 2919 (νCH), 1698 (νC=O), 1365 (νC-O).

(1S,2S)-2-amino-1-(1-tridecil-1H-1,2,3-triazol-5-il)propan-1,3-diol, 2

Es van dissoldre 174 mg de producte **3** (0.36 mmol) en 3.7 mL TFA/H₂O (10:1) i es va deixar la solució amb agitació a temperatura ambient durant les següents 3 hores.

Per tal d'evitar una possible sobrepressió es va introduir una agulla a mode de sortida de gasos degut a que en les condicions plantejades l'àcid carbàmic no és estable i es descompon alliberant l'amina i generant CO₂.

Una vegada transcorregut aquest temps es va comprovar que el reactiu de partida s'hagués consumit amb una TLC utilitzant Hexà/AcOEt (1:1) com a fase mòbil i que aparegués un producte a l'R_f esperat utilitzant com a fase mòbil DCM/MeOH/NH₄OH (9:1:0.1) i KMnO₄ com a revelador. Després de confirmar-ho, el contingut del matràs de reacció es va afegir gota a gota a una solució aquosa saturada de NaHCO₃ (80 mL) en un bany de gel. Es va comprovar que tot l'àcid hagués estat neutralitzat amb una tira de paper de pH.

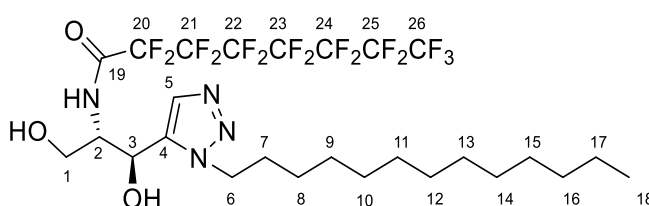
Es van realitzar quatre extraccions amb AcOEt de la suspensió resultant (4x55 mL), es van assecar les fases orgàniques amb Na₂SO₄ i, finalment, es va concentrar la solució al buit.

Davant la constatació que la desprotecció del producte inicial era parcial es va repetir la reacció sobre el cru mantenint les condicions mencionades anteriorment.

El cru va ser purificat en una columna de sílice que prèviament havia estat neutralitzada utilitzant una solució DCM/MeOH/NH₄OH (9:1:0.1) com a fase mòbil.

Finalment es van obtenir 50 mg de producte **2** (0.147 mmol), fet que suposa un 41% de rendiment. El producte és un sòlid blanc.

R_f = 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 9:1:0.1). **¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ en ppm** 7.72 (s, 1H, H-5), 4.79 (d, *J*_{3,2} = 7.4 Hz, 1H, H-3), 4.44 (t, *J*_{6,7} = 7.2 Hz, 2H, H-6), 3.72-3.65 (m, 2H, H-1), 3.17-3.12 (dt, *J*_{2,3} = 7.3 Hz, *J*_{2,1} = 5.2 Hz, 1H, H-2) 1.98-1.90 (m, 2H, H-7), 1.38-1.29 (m, 20H, H-8 - H-17), 0.90 (t, *J*_{18,17} = 6.7 Hz, H-18). **¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ en ppm** 139.3 (C-4), 133.1 (C-5), 66.0 (C-3), 62.8 (C-1), 57.5 (C-2), 49.8 (C-6), 33.1 (CH₂), 31.2 (C-7), 30.79 (CH₂), 30.76 (CH₂), 30.68 (CH₂), 30.6 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.2 (CH₂), 27.7 (CH₂), 23.7 (CH₂), 14.44 (C-18), 8.46 (CH₂). **IR en cm⁻¹** 3341 (νNH), 3277 (νNH), 3150 (νOH), 2920 (νCH).

(1S,2S)-2-amino-1-(1-tridecil-1H-1,2,3-triazol-5-propan-1,3-dihidroxipropan-2-il)perfluoroctanamida, 1

- Procediment experimental utilitzant clorur d'acil:

Es van afegir 2 mL de DCM anhidre i 0.15 mL de piridina anhidre (1.85 mmol) en un matràs de fons rodó que contenia 33 mg de producte **2** (0.098 mmol) i es va deixar la dissolució en agitació 15 minuts a temperatura ambient. Una vegada transcorregut aquest temps es va disminuir la temperatura de la solució fins 0°C amb un bany de gel, es van afegir 0.04 mL de clorur de perfluorooctanoïl (0.161 mmol) i es va deixar en agitació a temperatura ambient les següents 7 hores, temps en el qual es van afegir 0.04 mL addicionals en la 3a, 5a i 6a hora.

Una vegada es va confirmar que la reacció ja no avançava mitjançant una TLC utilitzant DCM/MeOH/NH₄OH (8.5:1.5:0.1) com a fase mòbil i KMnO₄ com a revelador es va procedir a la recuperació de la reacció.

El clorur d'acil sobrant es va hidrolitzar amb 10 mL d'aigua i es va deixar reposar la solució a temperatura ambient fins que es va temperar. Es van realitzar extraccions de la fase aquosa utilitzant DCM (4 x 10 mL). La fase orgànica es va assecar mitjançant l'ús de Na₂SO₄ anhidre i després de filtrar es va retirar el solvent aplicant buit, obtenint un sòlid de color blanc.

El cru es va purificar en una columna de sílice que prèviament havia estat neutralitzada utilitzant una solució DCM/MeOH/NH₄OH (8.5:1.5:0.1) com a fase mòbil.

El fet de no detectar les senyals esperades en RMN ¹H, juntament amb la sospita que indicava que el clorur de perfluorooctanoïl es podria trobar en un avançat estat d'hidròlisi i/o contingües impureses van provocar que es descartés el producte d'aquest procediment.

- Procediment experimental utilitzant reactius d'acoblament:

Es van dissoldre 57 mg de EDC (0.30 mmol), 42 mg HOBt (0.31 mmol) i 122 mg d'àcid perfluorooctanoic (0.29 mmol) en 13.2 mL de DCM anhidre i la solució es va deixar en agitació durant 1 hora. Seguidament es va traspasar el contingut del matràs a un altre matràs de fons rodó que contenia 50 mg de producte pur **2** (0.15 mmol) dissolt en 4.5 mL de DCM anhidre i es va deixar en agitació les següents 26 hores a temperatura ambient.

Una vegada es va confirmar que la reacció ja no avançava mitjançant una TLC utilitzant DCM/MeOH/NH₄OH (8.5:1.5:0.1) com a fase mòbil i KMnO₄ com a revelador, es va procedir a la recuperació de la reacció.

Es va neutralitzar la solució amb 90 mL de solució saturada de NaCl i es va deixar reposar a temperatura ambient fins que es va temperar. Es van realitzar extraccions de la fase aquosa utilitzant DCM (4 x 70 mL). La fase orgànica es va assecar mitjançant l'ús de Na₂SO₄ anhidre i, després de filtrar, es va retirar el solvent aplicant buit, obtenint un sòlid de color blanc.

El cru va ser purificat en una columna de sílice que prèviament havia estat neutralitzada utilitzant una solució DCM/MeOH/Et₃N (9:1:0.1) com a fase mòbil.

Finalment es van obtenir 45 mg de producte en forma de sòlid blanc.

Rf = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 8.5:1.5:0.1). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD:MeOD (1:1)) δ en ppm 7.70 (s, 1H, H-5), 7.70 (s ample, 1H, NH), 5.31 (s, 1H, H-3), 4.27-4.26 (m, 1H, H-6), 4.21-4.18 (m,

1H, H-6'), 3.99-3.95 (m, 1H, H-2), 3.81 (t ap, $J = 5.0$ Hz, 1H, H-1), 3.71-3.67 (m, 1H, H-1'), 1.99 (s, 2H, H-7), 0.85 (t, 3H, H-18). **^{19}F RMN (376 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{MeOD}$ (1:1)) δ en ppm** -77.84 (tt, $^4J_{20,22} = 9.9$, $^5J_{20,23} = 2.5$ Hz, CF_3), -113.81 (t, $J = 11.0$ Hz, CF_2 adjacent al carbonil), -118.41 (s, CF_2), -118.76 (s, CF_2), -119.33 (s, CF_2), -119.45 (s, CF_2), -122.92 (m, CF_2).

5 Conclusions i treball futur

Català

Les conclusions del treball són les següents:

- La utilització de l'aldehid de Garner com a bloc quiral de partida ha resultat efectiva per tal de dur a terme la reacció d'etnilació-desililació en un sol matràs amb la finalitat d'obtenir la estereoquímica 2*S*,3*R* desitjada en el producte final, via una addició estereoespecífica.
- La formació regioespecífica del grup 1,2,3-triazole 1,5-disubstituit mitjançant una cicloaddició azida-alquí catalitzada per Ru ha estat exitosa, sense observar la formació del producte 1,4-disubstituit, com era esperable en base al mecanisme proposat per aquesta reacció.
- La desprotecció simultània dels dos grup protectors ha estat factible emprant TFA/H₂O.
- La *N*-acilació amb reactius d'acoblament per formar l'amida perfluorada ha resultat més efectiva que la reacció amb el corresponent clorur d'àcid, tot i que en un futur caldrà repetir la reacció per tal de confirmar l'obtenció del producte desitjat i millorar-ne el rendiment.

Un cop obtingut en un futur el producte desitjat, està previst realitzar l'avaluació de la seva activitat biològica per tal d'intentar discernir com han afectat els canvis estructurals introduïts. Esperem que els resultats obtinguts puguin incrementar el coneixement sobre les característiques que hauria de presentar un inhibidor de l'enzim Des1, així com aportar més llum en l'elucidació del possible mecanisme d'inhibició d'aquest enzim.

Anglès

The conclusions of the work are as follows:

- The use of Garner's aldehyde as a starting chiral block has been effective to carry out the ethinylation-desilylation reaction in one-pot in order to obtain the desired 2*S*, 3*R* stereochemistry in the final product, via a stereospecific addition.
- The regioselective formation of the 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole moiety by Ru-catalysed azide-alkyne cycloaddition has been successful, without observing the formation of the 1,4-disubstituted product, as expected based on the mechanism proposed for this reaction.
- Simultaneous deprotection of the two protecting groups has been feasible using TFA/H₂O.
- *N*-acylation with coupling reagents to form the perfluorinated amide has been more effective than the reaction with the corresponding acid chloride, although in the future it will be necessary to repeat the reaction in order to confirm the obtention of the desired product and improve the overall yield.

Once the desired product has been obtained in the future, it is planned to evaluate its biological activity in order to try to discern how the structural changes introduced have affected. We hope that the results obtained could increase knowledge about the characteristics that a Des1 enzyme inhibitor should have, as well as shed more light on the elucidation of the possible mechanism of Des1 inhibition.

Annexes

En aquest apartat es mostren els espectres complets RMN de ^1H , ^{13}C i ^{19}F i espectroscòpia IR utilitzats per dur a terme la caracterització dels productes, així com els COSY i HSQC consultats en la assignació dels senyals (Figures 15 fins 31).

- **Producte 4**

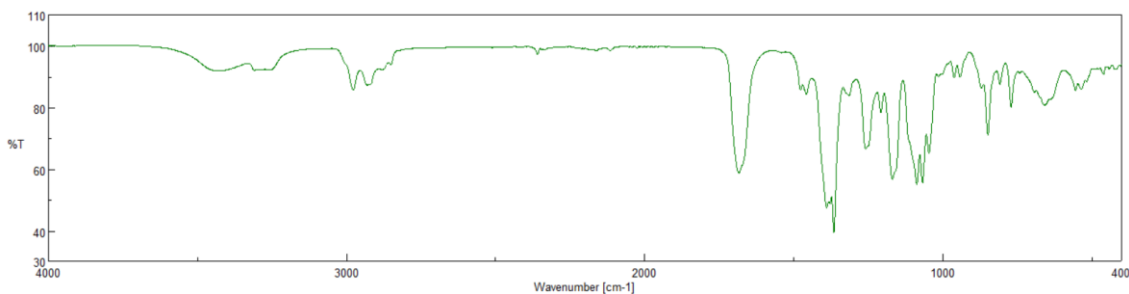


Figura 15: Espectre IR del producte 4

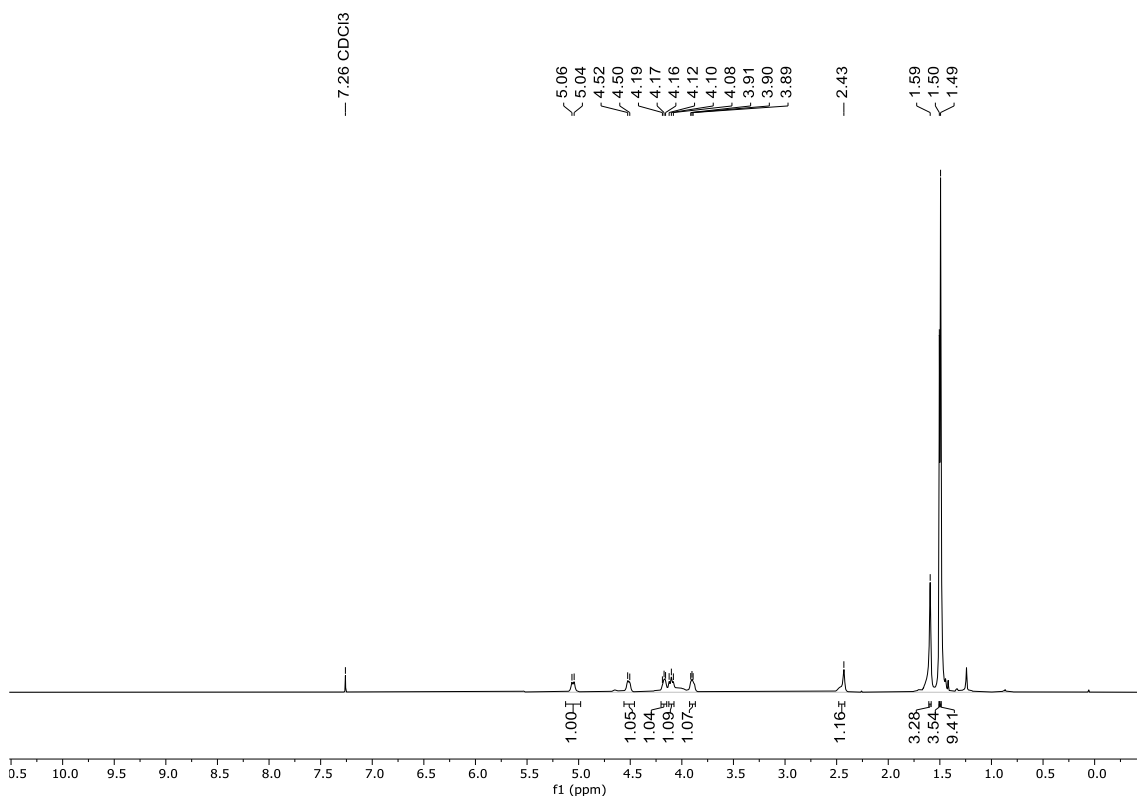


Figura 16: Espectre RMN ^1H complet del producte 4

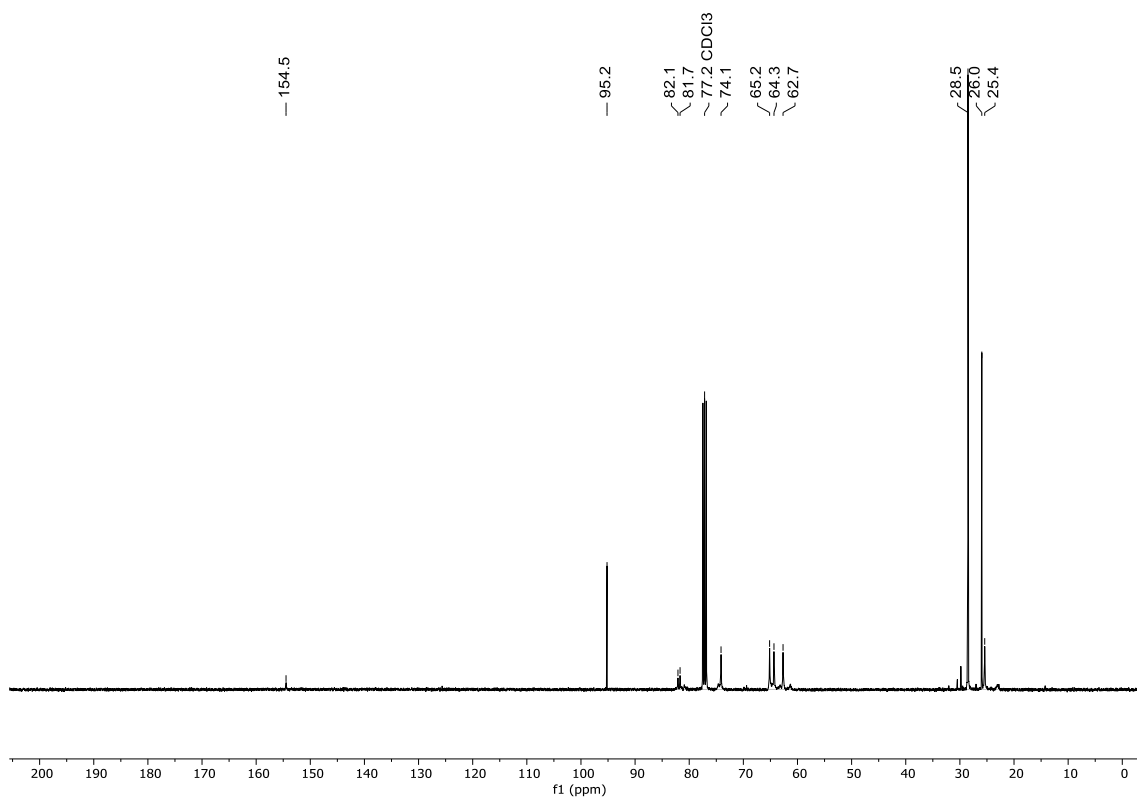


Figura 17: Espectre RMN ^{13}C complet del producte 4

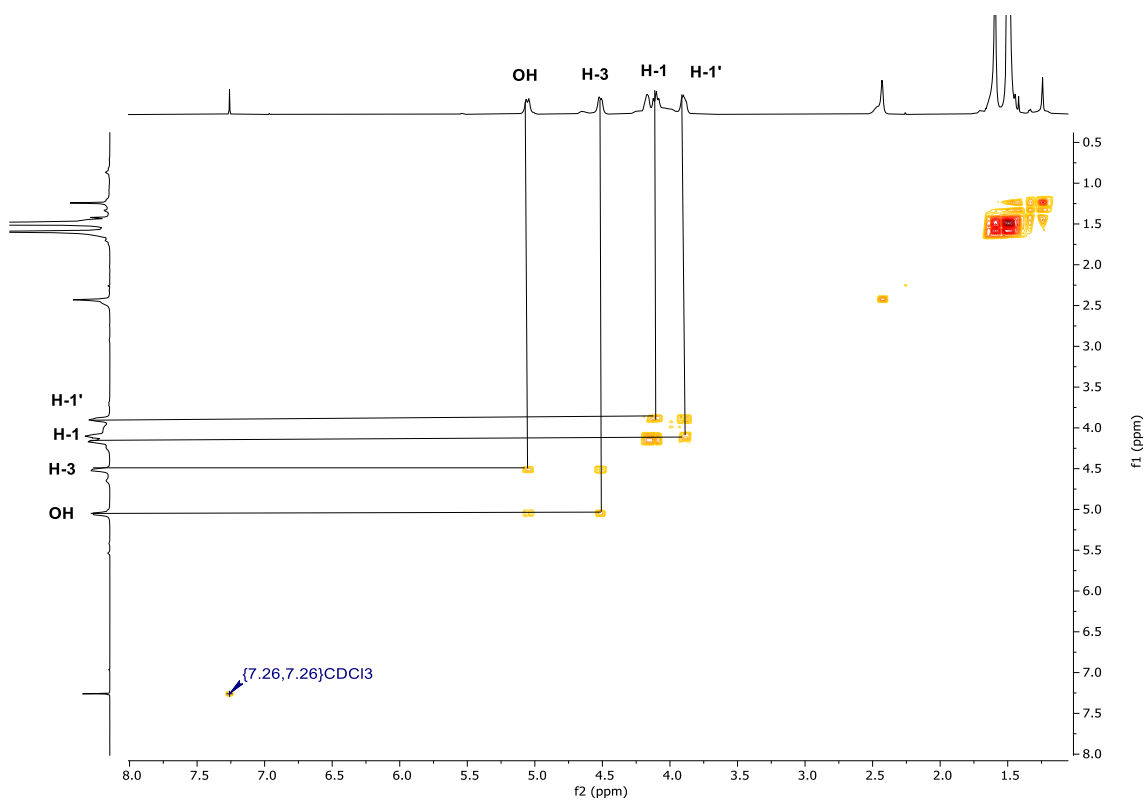


Figura 18: Espectre COSY del producte 4

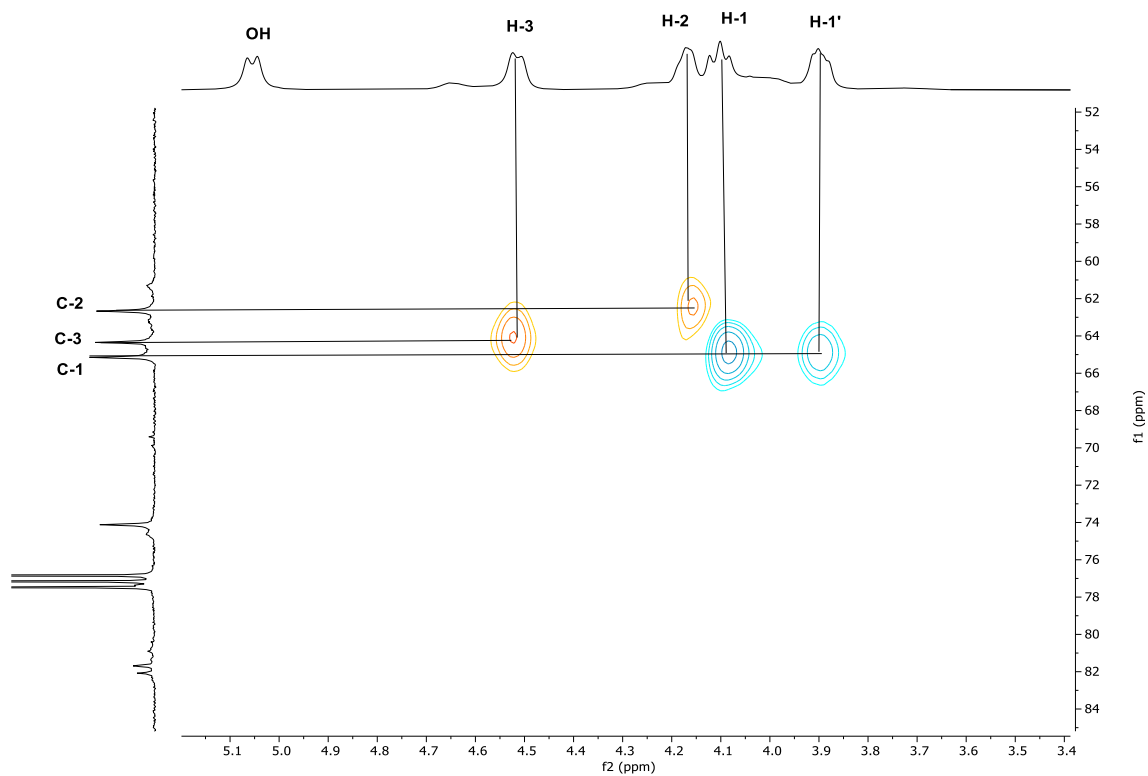


Figura 19: Espectre HSQC del producte 4

- **Producte 3**

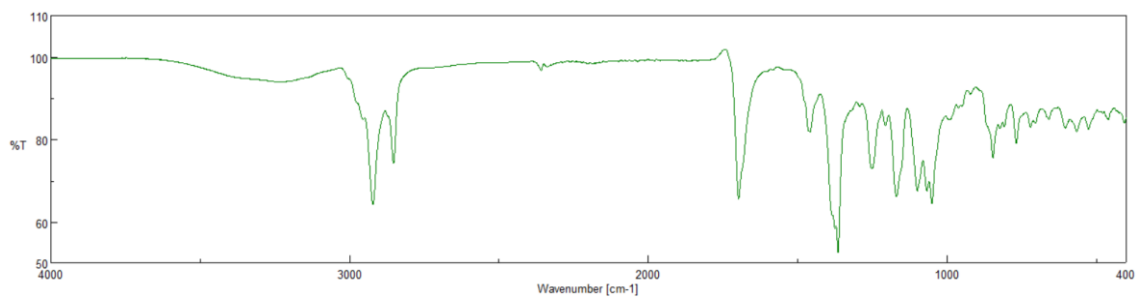


Figura 20: Espectre IR del producte 3

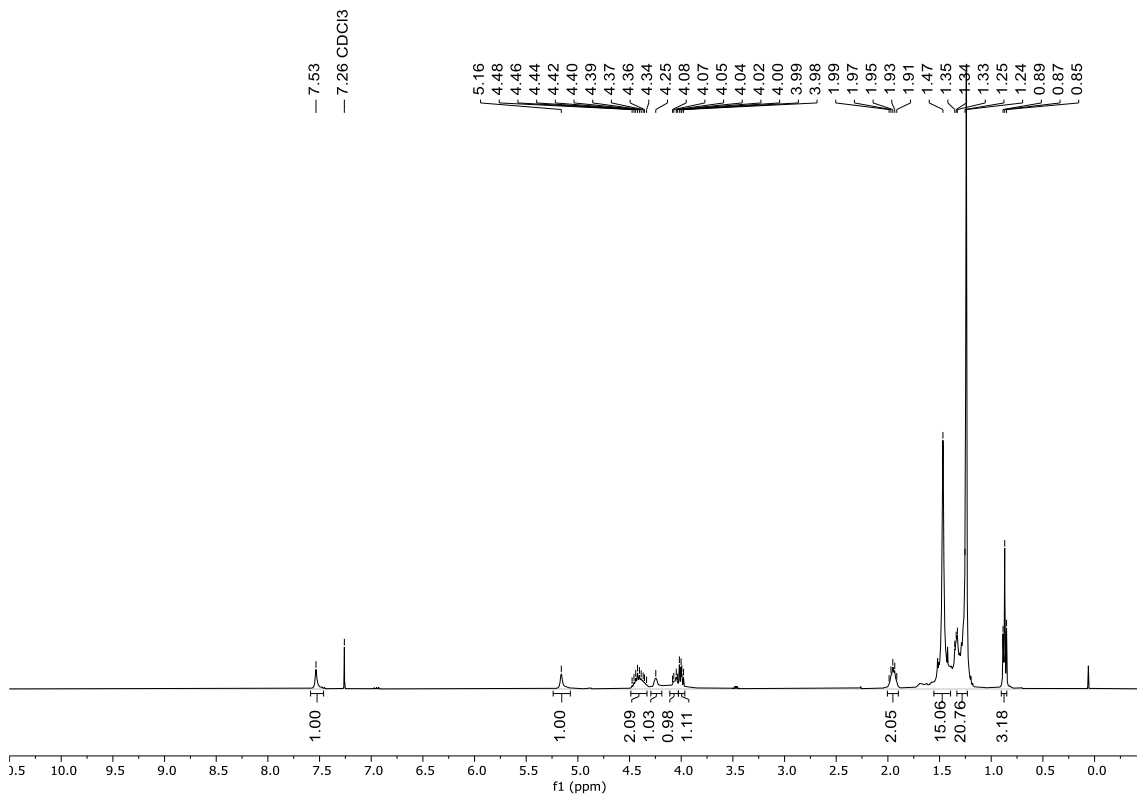


Figura 21: Espectre RMN ^1H complet del producte 3

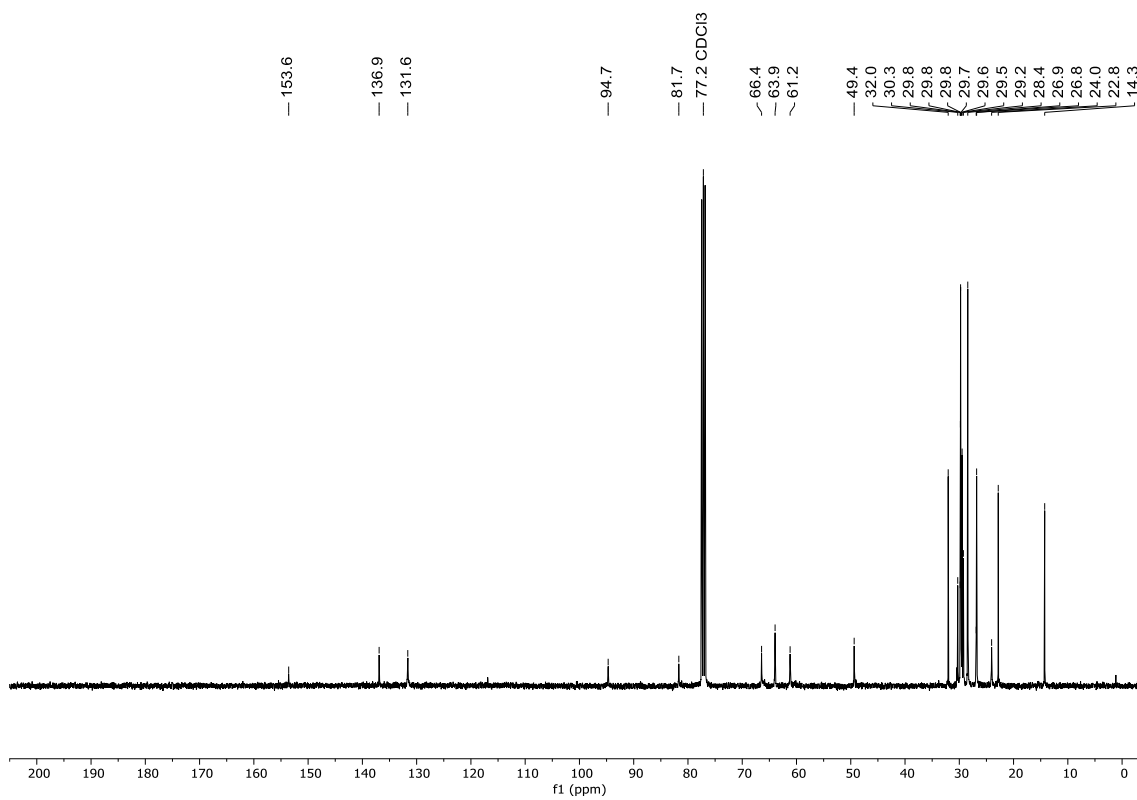


Figura 22: Espectre RMN ^{13}C complet del producte 3

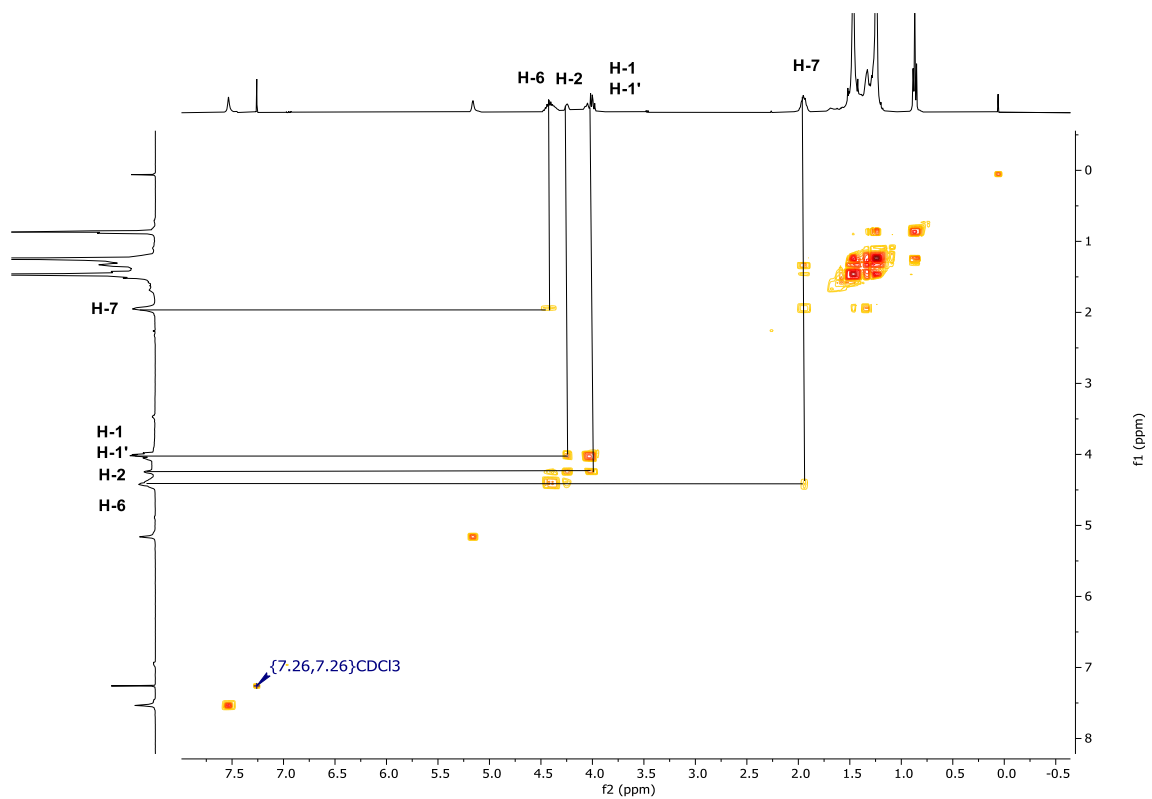


Figura 23: Espectre COSY del producte 3

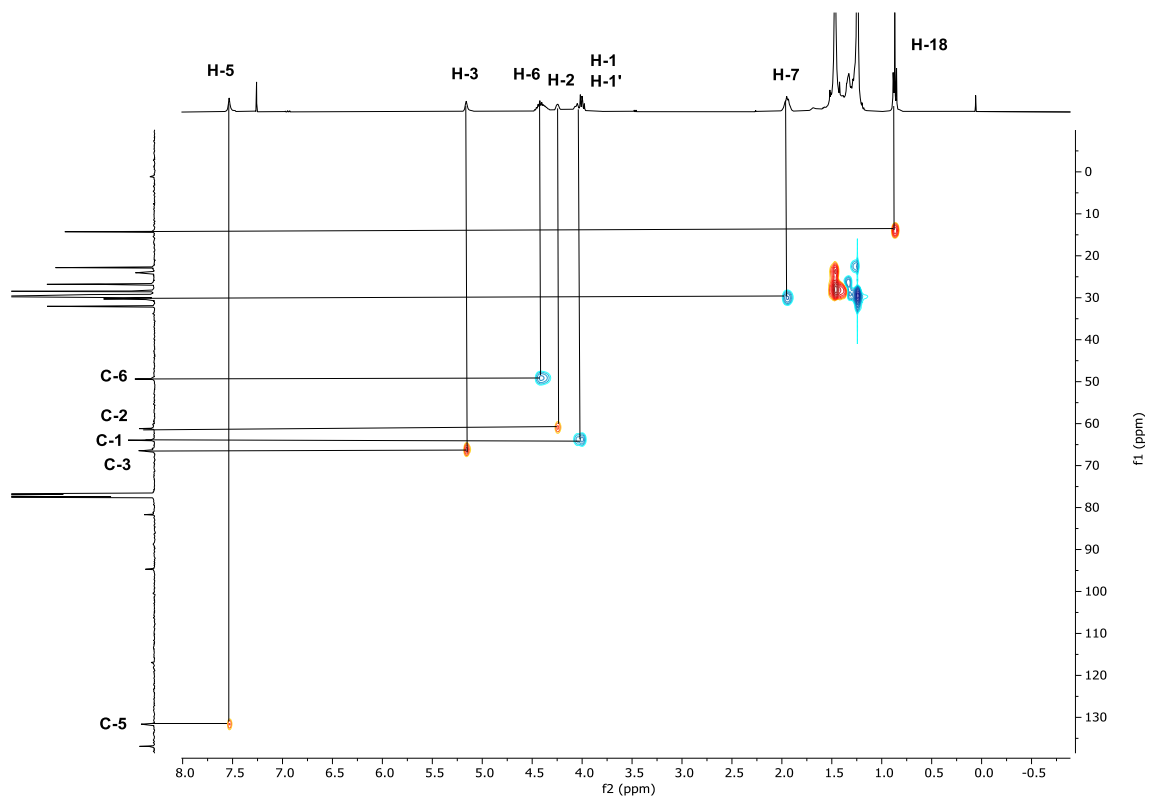


Figura 24: Espectre HSQC del producte 3

● Producte 2

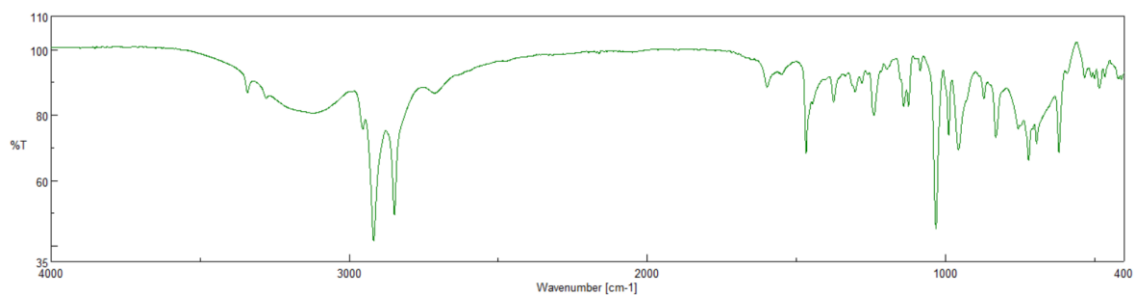


Figura 25: Espectre IR del producte 2

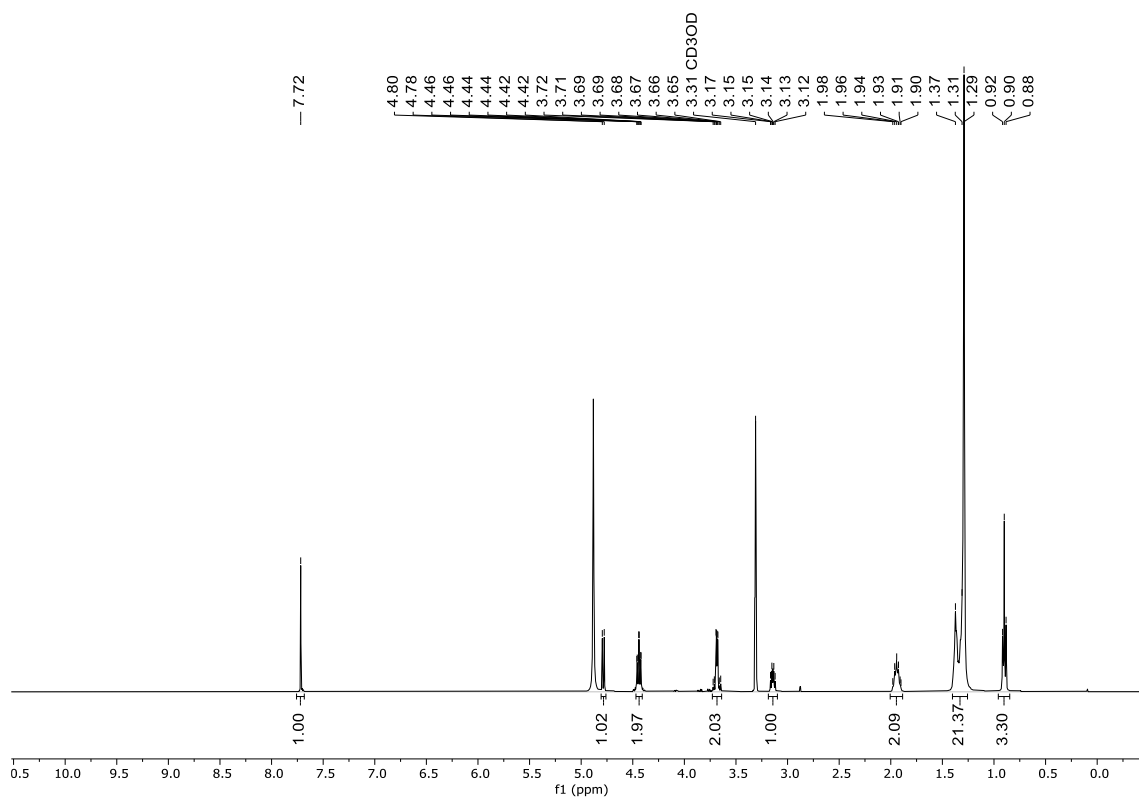


Figura 26: Espectre RMN ¹H complet producte 2

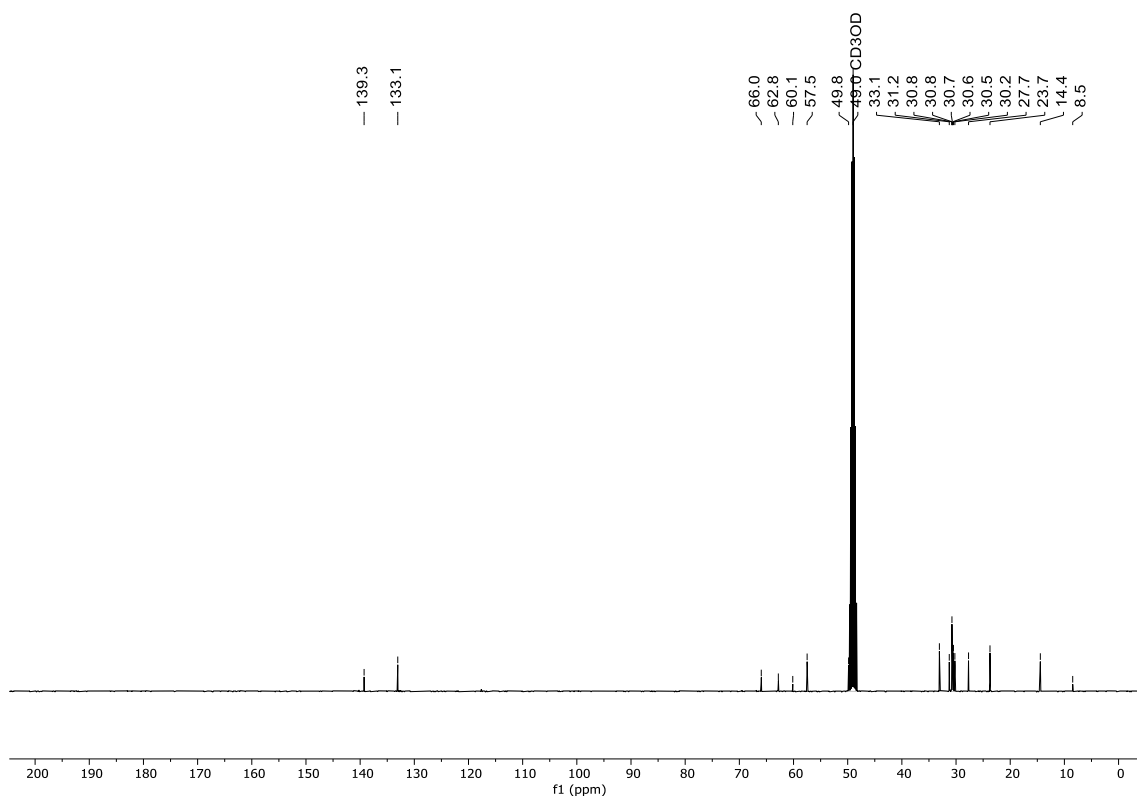


Figura 27: Espectre RMN ^{13}C complet del producte 2

Els espectres RMN ^1H i ^{13}C i COSY i HMBC es van realitzar amb mostres del producte 2 diferents i, per tant, poden presentar subtils diferències entre ells.

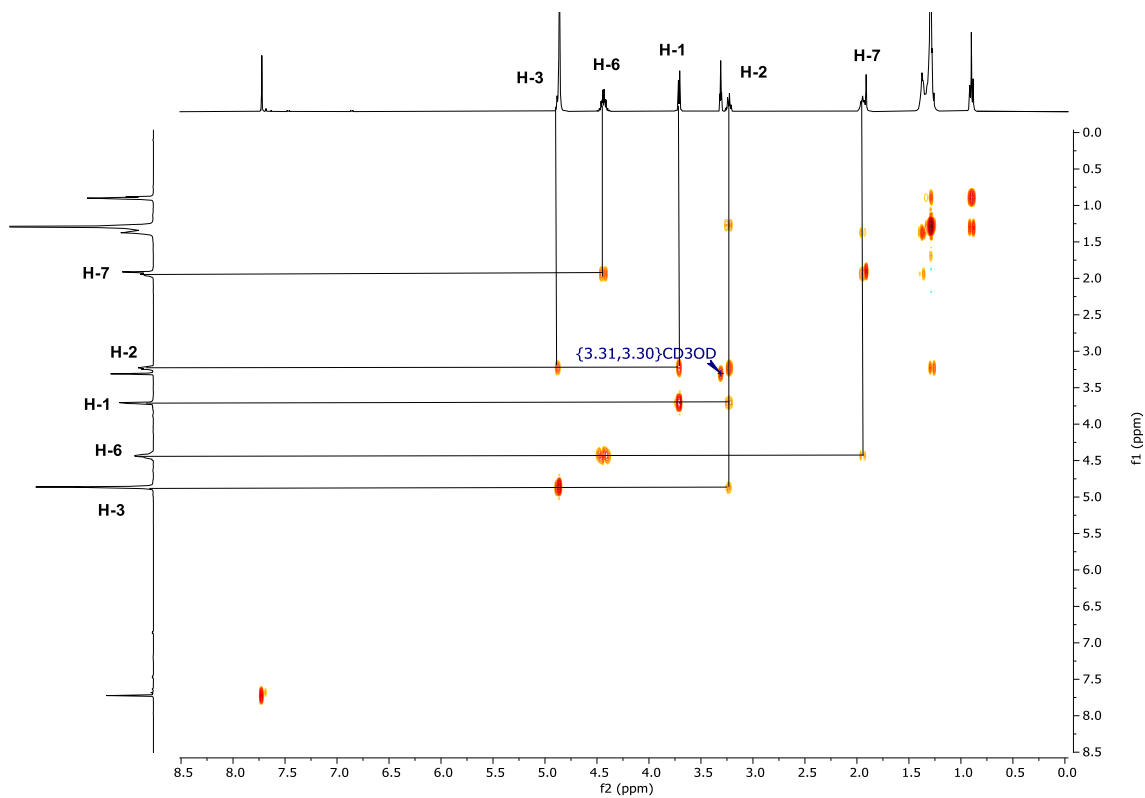


Figura 28: Espectre COSY del producte 2

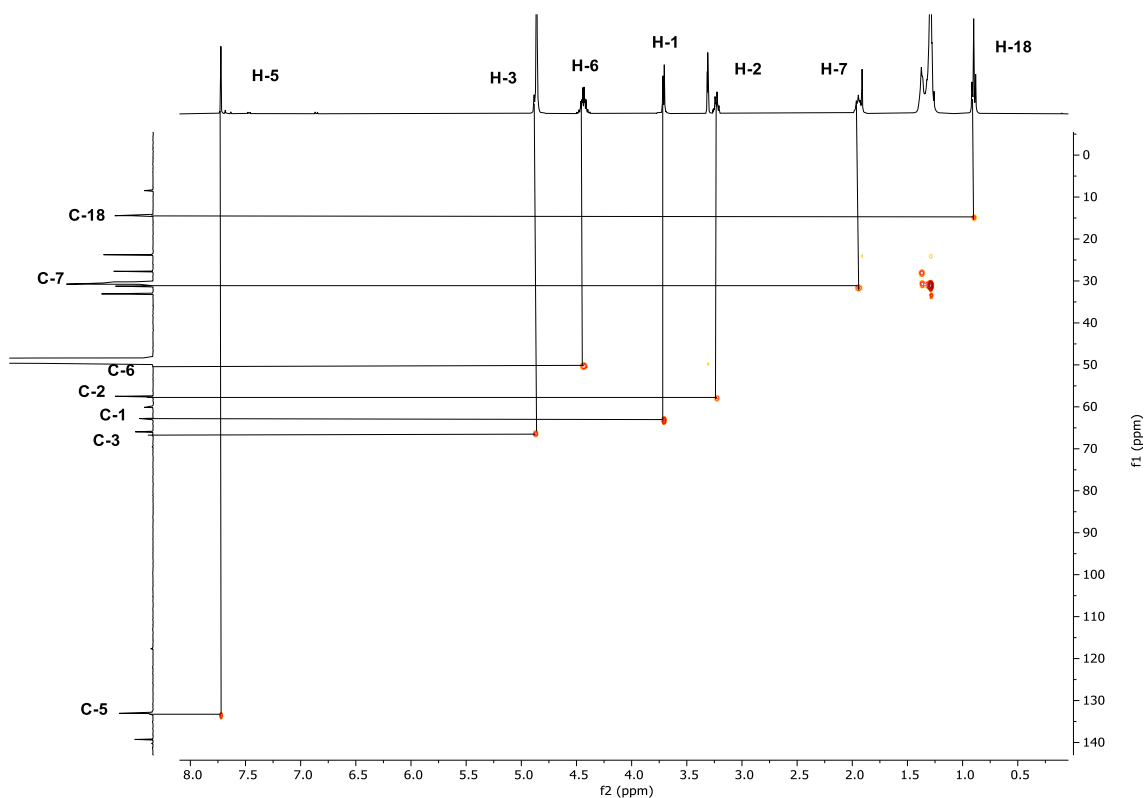


Figura 29: Espectre HSQC del producte 2

- Producte resultant de la reacció de N-acilació

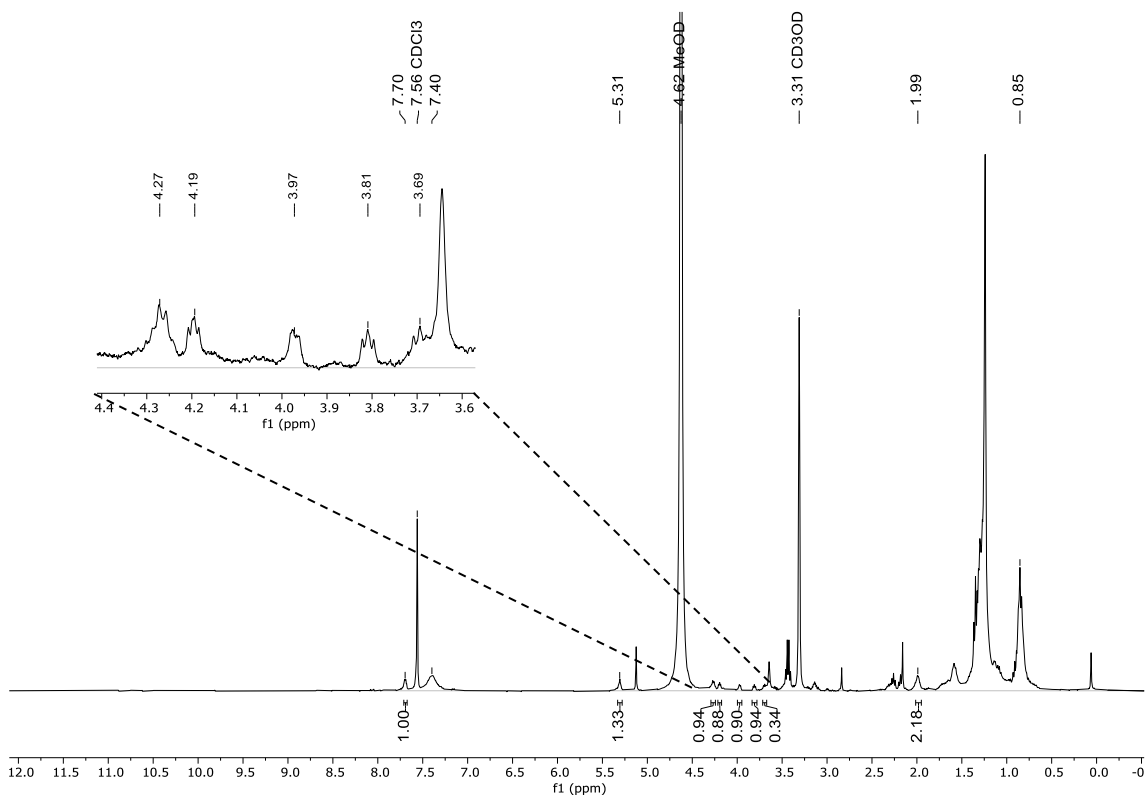


Figura 30: Espectre RMN ^1H complet del producte resultant de la reacció de N-acilació

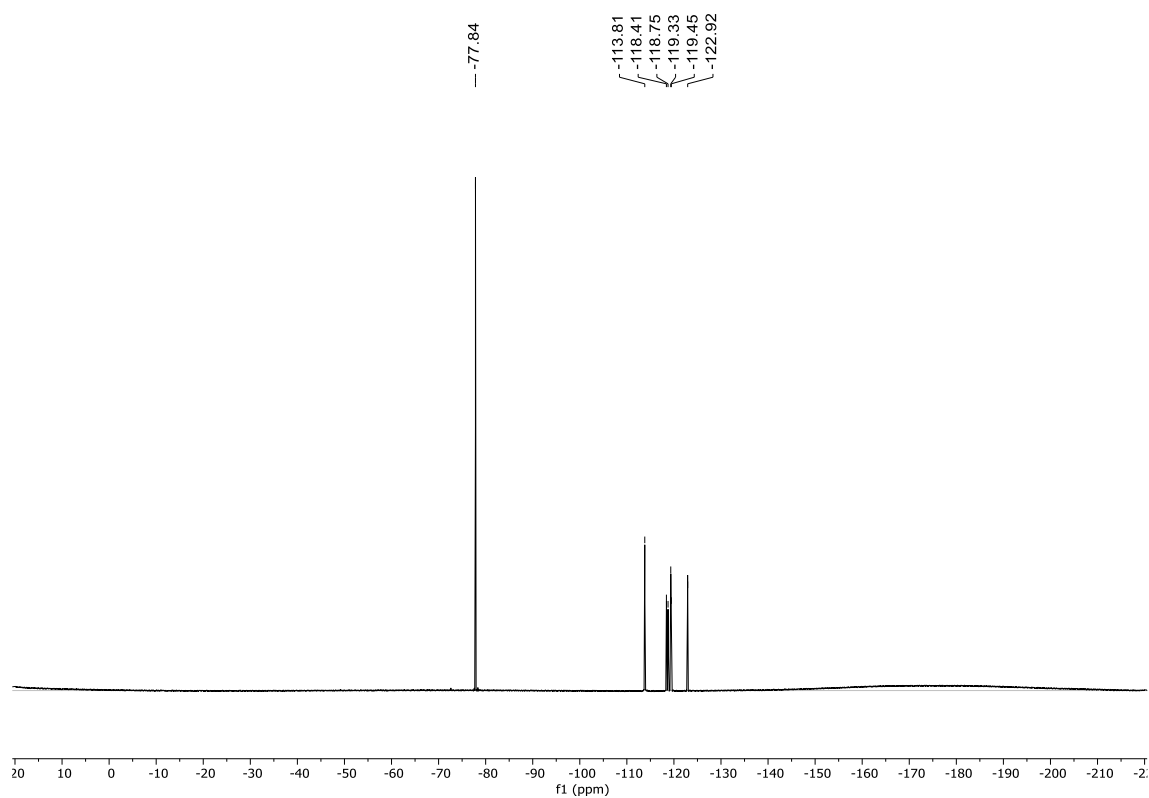


Figura 31: Espectre RMN ^{19}F complet del producte resultant de la reacció de N-acilació